

# UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



**Identificación de serovares de *Leptospira spp* presentes en ratas y ratones sinantrópicos de tres cantones del municipio de Tecoluca, San Vicente, El Salvador.**

**POR:**

**BR. JACQUELINE CAROLINA ELIAS RAMIREZ.**

**BR. THAISSA MARIA RODAS RODRIGUES.**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, 21 DE AGOSTO DE 2018**

# **UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA**



**Identificación de serovares de *Leptospira spp* presentes en ratas y ratones sinantrópicos de tres cantones del municipio de Tecoluca, San Vicente, El Salvador.**

**POR:**

**BR. JACQUELINE CAROLINA ELIAS RAMIREZ.**

**BR. THAISSA MARIA RODAS RODRIGUES.**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, 21 DE AGOSTO DE 2018**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

**ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO**

**SECRETARIO GENERAL**

**CRISTÓBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**DECANO**

**ING. AGR. MSc. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA**

**SECRETARIO**

**ING. AGR. MSc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO**

**JEFA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA**

F. \_\_\_\_\_

**M.V.Z. M.Sc. Rosy Francis Alvarenga Artiga**

**DOCENTES DIRECTORES**

F. \_\_\_\_\_

**M.V.Z. MRA. Carlos David López Salazar**

F. \_\_\_\_\_

**M.V.Z. M.Sc. Luis Ernesto Romero Pérez**

F. \_\_\_\_\_

**M.V.Z. M.Sc. Verónica Roxana Aguilar**

**COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN**

F. \_\_\_\_\_

**M.V.Z. M.Sp. María José Vargas Artiga**

## Título

Identificación de serovares de *Leptospira spp* presentes en ratas y ratones sinantrópicos de tres cantones del municipio de Tecoluca, San Vicente, El Salvador.

### Resumen

La investigación se llevó a cabo en ratas y ratones de las especies *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* y *Mus musculus* de los cantones de San Carlos Lempa, Las Mesas y Las Anonas del municipio de Tecoluca, San Vicente, en el periodo comprendido entre Diciembre 2016 a Julio del 2017. El propósito fue evidenciar la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Leptospira spp* en ratas y ratones de la zona, para dicha finalidad se capturaron los roedores mediante trampas sherman y trampas artesanales, utilizándose un total de 32 unidades productivas, ubicándose 11 en San Carlos Lempa, 13 en Las Mesas y ocho en Las Anonas; los especímenes capturados fueron trasladados a la Red de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), para la toma de muestra sanguínea por vía intracardiaca; siendo así analizadas por medio de la prueba de aglutinación microscópica (MAT) según el protocolo establecido por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para el diagnóstico serológico de *Leptospira*.

El número a utilizar de roedores fue establecido según un periodo de tiempo determinado para su recolección. De acuerdo a los resultados obtenidos de 150 muestras recolectadas, 88 fueron adecuadas para su análisis en la prueba de MAT, obteniéndose en la investigación 20 muestras que fueron seropositivas a uno o más serovares; mientras que de los 68 resultados negativos, no indican que al momento de la toma de muestra los roedores se encontraran libres de la bacteria, únicamente puede indicar un caso temprano de la infección o un título que ha disminuido, lo cual no permite descartar la circulación actual de la leptospirosis en la zona de estudio.

**Palabras clave:** *Leptospira spp*, leptospirosis, zoonosis, aglutinación microscópica.

### Summary

The research was carried out in rats and mice of the species *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* and *Mus musculus* of the cantons of San Carlos Lempa, Las Mesas and Las Anonas of the municipality of Tecoluca, San Vicente, in the period from December 2016 to July 2017. The purpose was to demonstrate the presence or absence of antibodies against *Leptospira spp* in rats and mice in the area, for this purpose rodents were captured by Sherman traps and craft traps, using a total of 32 productive units, placing 11 in San Carlos Lempa, 13 in Las Mesas and eight in Las Anonas; the captured specimens were transferred to the Veterinary Laboratories Network of the Ministry of Agriculture and Cattle Raising (MAG), for intracardiac blood sampling; being analyzed by the microscopic agglutination test (MAT) according to the protocol established by the World Organization for Animal Health (OIE) for the serological diagnosis of *Leptospira*.

The number to use of rodents was established according to a period of time determined for the collection. According to the results obtained from 150 samples collected, 88 were suitable for analysis in the MAT test, obtaining in the research 20 samples that were seropositive to one or more serovars; while of the 68 negative results, do not indicate that at the time of sampling the rodents were free of the bacteria, it can only indicate an early case of infection or a titer that has decreased, which does not rule out the current circulation status of leptospirosis in the study area.

**Key words:** *Leptospira spp*, leptospirosis, zoonosis, microscopic agglutination.

## **Agradecimientos**

A Dios por darme la vida, sabiduría, la fuerza y conocimiento para vencer los obstáculos que se presentaron a lo largo de la carrera y principalmente por permitirme realizar uno de los sueños más importantes de mi vida.

A mis padres Ana Nohemy Ramírez Romero y Jorge Alberto Elías Navas por el apoyo incondicional que me han brindado en todo momento para que pueda alcanzar mis metas, por corregirme en los momentos precisos, darme la oportunidad de seguir estudiando, por su gran amor y consejos que me motivan cada día a seguir adelante a pesar de los obstáculos, son mi eterna inspiración para seguir luchando por mis sueños, Los amo.

A mi abuela María Leonor Ramírez Gracias por tu paciencia, por estar a mi lado durante toda mi carrera, por tus consejos, regaños y el amor que me has dado. Puedo decir plenamente que eres además de mi abuela, mi segunda madre, y los valores que me has inculcado para mi vida son simplemente invaluable, gracias por tu apoyo incondicional durante toda mi vida.

A mi tía Maria Erlinda Martir por su gran apoyo y motivación para seguir luchando por todo lo que quiero. Por estar siempre dispuesta a escucharme y ayudarme en cualquier momento.

A mis hermanos por su apoyo, cariño y comprensión a la hora de realizar el trabajo de tesis en casa.

A mi novio y amigo Fabrizio Inestroza Osorio por su ayuda, ánimos y apoyo incondicional no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida, por ser una gran motivación e inspiración para mí, sin ti hubiera sido difícil este camino.

A mis asesores Dr. Carlos David López Salazar, Dr. Luis Ernesto Romero y la Dra. Verónica Aguilar por su orientación, conocimiento y apoyo durante todo el desarrollo de este proyecto de investigación, sin ustedes no hubiera sido posible la realización de este estudio.

A los docentes que me enseñaron, y me instruyeron lo mejor posible para ser excelente tanto en el ámbito profesional, como en el personal y humano. Me hicieron exigirme a mí misma para ser cada vez mejor.

A mi compañera de tesis Thaisa Maria Rodas Rodrigues Gracias por tu paciencia y apoyo, fue una verdadera aventura y experiencia esta investigación, me alegra mucho a verlo compartido a tu lado, eres una hermana para mí y gracias por acompañarme en toda la carrera.

Gracias a todos aquellos que no están aquí, pero me ayudaron a que este gran esfuerzo se volviera realidad y por último, pero no menos importante, gracias a mis mascotas, y a todos aquellos animales con los que practique en el transcurso de mi carrera, serán eternamente mi fuente de inspiración

Jacqueline Carolina Elías Ramírez.

## **Agradecimientos**

Ante todo, dar gracias a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por brindarme la fortaleza requerida para alcanzar una de las más grandes metas de mi vida y vencer todos los obstáculos que se presentaron a lo largo de este camino, y por permitirme conocer personas tan maravillosas en su transcurso.

A mi madre y padre, Inez de Rodas y Edgard Rodas, por ayudarme a cumplir mis sueños, por su apoyo, cariño y comprensión recibida durante toda mi formación profesional, porque siempre estuvieron preocupados por mi carrera y desarrollo de esta tesis y que la pudiera terminar con éxito, porque me motivan constantemente para ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanas, Luana y Elaine, por siempre estar brindándome su apoyo cuando las dificultades parecían opacar las cosas buenas, por siempre saber cómo sacarme una sonrisa y brindarme todo su cariño, y porque siempre confiaron en que podía lograrlo.

A José Chopin, por ser una parte muy importante de mi vida, por haberme apoyado en todo momento cuando parecía que me iba a rendir, por preocuparte de mí en cada momento, por su paciencia, por siempre buscar la manera de ayudarme, calmarme y que yo diera lo mejor de mí, por su amor incondicional, por tantos aportes no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida; eres mi inspiración y mi motivación.

A mi compañera de tesis, Jacqueline Elías, por toda su paciencia, apoyo y fortaleza a lo largo de la fase de campo e investigación y servir de apoyo moral mutuo, para poder culminar este proyecto juntos a pesar de todas las dificultades que se nos presentaron, por ser más que una amiga, por ser como una hermana, y sobre todo a su familia, una familia para mí.

A mis asesores Dr. Carlos David López, Dr. Luis Ernesto Romero y la Dra. Verónica Roxana Aguilar, por orientarnos pacientemente durante el desarrollo de este proyecto de investigación, porque sin sus conocimientos y apoyo, no habría sido posible llegar a la culminación de esta fase.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional, a las que me encantaría agradecerles por su amistad, apoyo, animo, consejos y compañía, y aprovecho para desearles éxitos a lo largo de su vida.

De corazón, a todos, Muchas gracias.

Thaissa Maria Rodas Rodrigues

## **Dedicatoria**

Esta investigación está dedicada a todas las personas que han colaborado con el mismo, empezando por nuestros padres, hermanos, novios, amigos, asesores y docentes. Este trabajo es dedicado a todos aquellos que nos alentaron a seguir hasta cumplir nuestro objetivo: conseguir un Título profesional.

Jacqueline Carolina Elías Ramírez.

Thaissa Maria Rodas Rodrigues

## Índice general

Resumen.....	iv
Agradecimientos.....	v
Dedicatoria.....	viii
1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica.....	2
2.1 Antecedentes.....	2
2.2 Etiología.....	3
2.3 Patogenia.....	4
2.4 Epidemiología.....	5
2.4.1 Hábitat de la rata y el ratón.....	5
2.4.2 Especies afectadas.....	6
2.5 Sintomatología (Signos clínicos).....	6
2.6 Técnicas de diagnóstico.....	7
2.6.1 Identificación del agente.....	7
2.6.2 Pruebas serológicas.....	8
2.7 Prevención y control.....	8
3. Materiales y métodos.....	9
3.1 Descripción del estudio.....	10
3.2 Metodología de campo.....	10
3.2.1 Captura de ratas y ratones.....	10
3.2.2 Toma de Muestra.....	11
3.2.3 Materiales a utilizar.....	11
3.2.4 Georreferenciación.....	12
3.3 Metodología de laboratorio.....	12
3.3.1 Técnica de Microaglutinación en Placa.....	12
3.3.2 Interpretación.....	13
4. Resultados y Discusión.....	14
5. Conclusiones.....	21
6. Recomendaciones.....	22
7. Bibliografía.....	23
8. Anexos.....	28

## Índice de Cuadro

Cuadro A-1. Grado de reacción interpretado por estimación de % de <i>Leptospiras</i> aglutinadas.....	12
Cuadro A-2. Seroprevalencia por cantón.....	19

## Índice de Figuras

Figura A-1. Porcentaje de seroprevalencia de <i>Leptospira spp</i> en ratas y ratones sinantrópicos de la zona de estudio.....	14
Figura A-2. Porcentaje de especie por muestra analizada.....	16
Figura A-3. Seroprevalencia de <i>Leptospira spp.</i> según la especie de ratas y ratones sinantrópicos de la zona de estudio.....	17
Figura A-4. Seroprevalencia por serovares de <i>Leptospira spp.</i> en ratas y ratones sinantrópicos de la zona de estudio.....	17
Figura A-5. Porcentaje de seropositividad de serovares en ratas y ratones capturados.....	18
Figura A-6. Serovares encontrados por cantón.....	20
Figura A-7. Georreferenciación de roedores seropositivos y seronegativos a <i>Leptospira spp.</i> en la zona de estudio.....	20

## Índice de Anexos.

Anexo A-1. Especies afectadas y sus principales serovares.....	28
Anexo A-2. Diagrama de la ubicación de las trampas.....	28
Anexo A-3. Trampa Sherman.....	28
Anexo A-4. Trampa Artesanal.....	29
Anexo A-5. Placas de poliestireno con fondo en U.....	29
Anexo A-6. Resultados de las muestras positivas a serovares de <i>Leptospira spp</i> en el cantón San Carlos Lempa.....	30
Anexo A-7. Resultados de las muestras positivas a serovares de <i>Leptospira spp</i> en el cantón Las Anonas.....	32
Anexo A-8. Resultados de las muestras positivas a serovares de <i>Leptospira spp</i> en el cantón Las Mesas.....	34
Anexo A-9. Georreferenciación de las muestras analizadas en el estudio.....	36
Anexo A-10. Georreferenciación de roedores positivos y negativos a <i>Leptospira spp.</i> en la zona de estudio.....	36

Anexo A-11. Casos de <i>L. icterohaemorrhagiae</i> en los cantones en estudio.....	37
Anexo A-12. Casos de <i>L. pyrogenes</i> en los cantones en estudio.....	37
Anexo A-13. Casos de <i>L. tarassovi</i> en los cantones en estudio.....	38
Anexo A-14. Casos de <i>L. sejroe</i> en los cantones en estudio.....	38
Anexo A-15. Casos de <i>L. hebdomadis</i> en los cantones en estudio.....	39

## 1. Introducción

La leptospirosis es una zoonosis de origen bacteriano de distribución mundial que afecta la mayoría de los mamíferos domésticos y silvestres, incluido el ser humano. La enfermedad es ocasionada por una espiroqueta patógena del género *Leptospira*, sus distintas cepas patógenas pueden afectar potencialmente a los mamíferos, donde algunos actuarán como hospederos de mantenimiento o accidental, en función del serovar considerado. Es más común en los trópicos donde las condiciones para su transmisión son favorables (Arango *et al.* 2001).

Dicha bacteria coloniza de manera persistente los túbulos renales de hospederos susceptibles. Las fuentes de contaminación con la espiroqueta pueden ser el contacto directo con tejidos u orina de animales infectados o el contacto indirecto con alimentos, aguas y suelos contaminados con orina de animales portadores de la bacteria; esto es debido, a la capacidad que tienen las especies patógenas de *Leptospira* de sobrevivir por períodos variables en ambientes húmedos.

Los animales silvestres son portadores y vectores de *Leptospira*, siendo los roedores los principales reservorios para este agente infeccioso, debido a su amplia distribución y por su carácter de excretoras de *Leptospira* de por vida, al ser su orina la fuente más común de contagio para el ser humano y por tanto la causa de la aparición de la enfermedad, jugando un papel epidemiológico relevante como reservorios. La temperatura y humedad elevadas, al igual que el pH alcalino o neutro del suelo, favorecen la supervivencia del microorganismo en el ambiente. El hombre es un huésped accidental de la cadena de transmisión que se desarrolla de animal a animal, infectándose en forma directa o, más frecuentemente, de modo indirecto por su contacto y exposición a animales o al agua contaminada durante actividades recreativas o laborales.

En el municipio de Tecoluca, en octubre del 2011 se registró una inundación en el cantón San Carlos Lempa y sus alrededores (SNET 2011), posiblemente esto contribuyó a la diseminación de la enfermedad en la zona, donde se ha reportado un incremento de casos de Leptospirosis en humanos (MINSAL 2016) y bovinos.

En El Salvador, la Leptospirosis es una enfermedad que actualmente ha incrementado en el número de casos en bovinos, según la base de datos epidemiológicos de sanidad animal del MAG; en el Municipio de Tecoluca fueron reportados 38 casos en el año 2014, cuatro casos durante el año 2015, tres en el año 2016, desconociéndose desde esa fecha el número de casos confirmados en la actualidad. La Leptospirosis tiene importancia al ser de declaración obligatoria para el Servicio Veterinario del MAG y el Ministerio de Salud (MINSAL), quien asocia al roedor como el diseminador de los casos detectados en humanos en el país (MINSAL 2015), sin embargo aún no se registran datos que permitan establecer la situación epidemiológica de la *Leptospira* en roedores en la zona rural, por lo que fue realizado este estudio para establecer evidencia epidemiológica sobre el papel de las ratas y ratones sinantrópicos como fuente potencial de la infección y diseminador de la bacteria tanto al humano como a otras especies susceptibles.

## 2. Revisión bibliográfica

### 2.1 Antecedentes

La Leptospirosis es una zoonosis importante a nivel mundial, los principales diseminadores o fuentes de contaminación son las ratas y ratones, debido que al infectarse no muestran signos clínicos y de esta manera pueden esparcir la enfermedad por un tiempo prolongado infectando a otros individuos, en este punto radica la importancia del roedor en la transmisión de la Leptospirosis (Siuce 2013). Esta enfermedad en humanos se puede encontrar tanto en área urbana (Sepúlveda *et al.* 2002) como en área rural (Gómez 2008), y se asocia en el área urbana por la presencia de un elevado número de ratas, mientras que en la población rural a la infección por actividades de recreación, bañarse en ríos contaminados con las excretas de los reservorios y por labores de trabajo de mayor riesgo como: trabajadores de arrozales 38%, trabajadores de labores pecuarias 19.9%, y matarifes desde 20.8% hasta el 72.2%, entre otros (González 2014).

En relación a la gama de serogrupos informada de Leptospirosis en roedores, varía en diferentes países; en Malasia de un total de 357 roedores se logró el aislamiento de *Leptospira* en el 11.0% de ratas capturadas, identificando a los serogrupos: *L. javanica* y *L. bataviae*, 16 de los aislamientos se identificaron en el serogrupo *javanica*, mientras que 23 de los aislamientos pertenecen al serogrupo *bataviae* (Benacer *et al.* 2016). En el Sudeste de Asia se encontró: *L. borgpetersenii* y *L. kirschneri* (Cosson *et al.* 2014). En Italia fue el serogrupo *L. icterohaemorrhagiae*. En Barbados fue el serogrupo *L. icterohaemorrhagiae* (Suepaul *et al.* 2014). En Latinoamérica otros serogrupos reportados en Brasil como predominantes incluyen a: *L. autumnalis* y *L. copenhageni* (Batista *et al.* 2005). En Yucatán, México y Panamá se reportan: *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae* (Jiménez-Coello *et al.* 2010).

Por otro lado la gama de serovares detectada en: Angola: *L. icterohaemorrhagiae* y *L. ballum* mediante un estudio que incluyó a 37 roedores donde fueron aisladas las *Leptospiras* en 10.8% de los roedores (Fortes-Gabriel *et al.* 2016). En China predominan: *L. icterohaemorrhagiae* y *L. grippityphosa*. Mientras que en Tailandia: *L. pyrogenes* y *L. sejroe*. En Francia: *L. icterohaemorrhagiae*. En Latinoamérica, Colombia, Chile y Argentina reportaron *L. icterohaemorrhagiae* en los distintos países, además en Colombia también se reportó *L. grippityphosa*, así como en Chile *L. pomona* (Santos 2014).

En Egipto se realizó un estudio donde se muestrearon 70 ratas, 168 perros, 625 vacas, 99 ovejas, 175 humanos y 45 fuentes de agua; se encontró que el roedor es el principal transmisor de seis serovares: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. canicola*, *L. grippityphosa*, *L. celledoni* y *L. pyrogenes*, el porcentaje de animales positivos fue: en ratas de 75.9%, perros el 58.3%, vacas el 37.6%, ovejas el 45.5%, humanos el 49.7% y en fuentes de agua 22.2%, de los cuales fueron positivos a uno o más de los serovares analizados. La rata noruega y los perros han sido considerados como los principales reservorios y se cree que los seres humanos pudieron infectarse al entrar en contacto con estos animales o sus excrementos contaminados (Samir *et al.* 2015).

En El Salvador la presentación de la enfermedad ha cambiado con el tiempo, ya que se ha detectado un aumento gradual de los casos reportados de la enfermedad. Durante el periodo del 2010 al 2016, el Servicio Veterinario del MAG reportó 410 casos de *Leptospira* en

bovinos, equinos, porcinos y caprinos a nivel nacional, siendo el bovino la especie más afectada<sup>1</sup> debido a que no aplican las medidas profilácticas y de manejo adecuadas.

Según la evidencia científica en ratas y ratones son 16 los serovares de *Leptospira* mayormente reportados a nivel mundial, de los cuales los serovares: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. copenhageni*, *L. grippityphosa*, *L. tarassovi*, *L. pomona*, *L. canicola*, *L. autumnalis* y *L. hardjo*, son los más importantes en América, encontrándose todos disponibles para el diagnóstico en el país, a excepción de *L. copenhageni*, *L. ballum*, *L. wolfii* y *L. javanica*; en El Salvador, el diagnóstico de *Leptospira* en roedores en la Red de Laboratorios Veterinarios no se realiza de manera rutinaria, debido a que no se busca como fuente primaria de contaminación en las unidades productivas a la hora de existir casos sospechosos de la enfermedad. No obstante el único estudio en nuestro país de Leptospirosis en ratas capturados en tres mercados del área metropolitana de San Salvador, realizado en el año 2008 presentó resultados negativos a los siguientes serovares: *australis*, *autumnalis*, *ballum*, *grippityphosa*, *hebdomadis*, *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona* y *patoc* (Ayala y Zelaya 2008) por lo que se debe tomar en consideración que no hay estudios realizados a nivel rural en las ratas y ratones, las cuales se cree que forman parte de la diseminación de la enfermedad en el territorio, por tanto la importancia de la investigación radica en contar con los serovares específicos a nivel latinoamericano al momento de realizar la prueba en ratas y ratones, para determinar si los roedores del área de estudio juegan un papel en la epidemiología de la enfermedad.

## 2.2 Etiología

La Leptospirosis es una enfermedad transmisible de los animales y los seres humanos causada por la infección con cualquiera de los miembros patógenos del género *Leptospira* (OIE 2014).

Es una enfermedad infecciosa causada por una bacteria patógena llamada *Leptospira*, que pertenece al orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae* y género *Leptospira*, que comprende 2 especies: *Leptospira interrogans* y *Leptospira biflexa* (González 2014).

Las *Leptospiras* son bacterias helicoidales, con extremos libres que terminan en forma de ganchos; son móviles, aerobios, cultivables y de unos 6 a 20 micras de largo por 0.1 micras de diámetro. Se reconocen dos especies *L. interrogans* y *L. biflexa*, la primera es patógena para el hombre y para los animales, mientras que *L. biflexa* es de vida libre y se encuentra en superficies y raramente está asociada a infecciones en los mamíferos (Acha y Szyfres 2003).

Antes de 1989, todas las cepas patógenas pertenecían a la especie *L. interrogans* y todos los organismos no patógenos en *L. biflexa*. El género *Leptospira* desde entonces ha sido reclasificado, utilizando técnicas genéticas, en 21 especies. Las especies que se han detectado en los casos clínicos incluyen *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. inadai*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* y *L. wolffii*. Por desgracia, las cepas de *Leptospiras* pueden intercambiar material genético con frecuencia y la correlación entre la tipificación serológica y clasificación genética en especies pueden ser pobre (CFSPH 2013).

---

<sup>1</sup> Quintanilla, E. 2016. Casos de leptospirosis. Ministerio de Agricultura y Ganadería (Comunicación personal). El Salvador.

## 2.3 Patogenia

**Patogenia en humanos:** Los seres humanos se infectan por contacto directo o indirecto con la orina o la sangre de animales infectados. Las *Leptospiras* ingresan en el huésped a través de las lesiones de la piel, las mucosas o las conjuntivas. Las infecciones se pueden adquirir en el hogar y en ambientes de recreación u ocupacionales. Las *Leptospiras* invaden el torrente sanguíneo después de su ingreso y diseminan a todos los sitios del cuerpo, como sistema nervioso central y a los riñones (Forbes *et al.* 2009).

**Patogenia en animales:** La bacteria penetra a través de piel lacerada, en ocasiones los organismos pueden entrar por inhalación, ingestión o contacto con animales portadores (Odrizola 2001). La penetración puede producirse también por las mucosas sobre todo la ocular o mucosa nasal. No muy frecuentemente la piel íntegra puede servir como puerta de entrada, salvo que la exposición al agua sea prolongada. La movilidad que el microorganismo posee, lo capacitan para penetrar en los tejidos. Después de la penetración por la piel, la *Leptospira* invade el torrente sanguíneo y se disemina por todo el cuerpo incluyendo el sistema nervioso central y el humor acuoso. Parece ser que existe tropismo por algunos órganos como el hígado, riñones, corazón y músculo esquelético. La causa principal de la lesión tubular parece ser la hipoxemia o algún efecto tóxico directo de las *Leptospiras*. Las alteraciones inflamatorias en el riñón pueden observarse en los estadios más tardíos del desenvolvimiento de la lesión renal llegando a causar insuficiencia renal en la especie afectada (Gamarra 2009).

En ratas la *Leptospira* coloniza el túbulo contorneado proximal, formando densos agregados de bacterias. A pesar de la colonización bacteriana cortical, el tejido renal mantiene su arquitectura, presentando ligera nefritis intersticial y un pequeño grado de degeneración celular. La colonización persistente indica que el riñón es un sitio inmune-privilegiado que promueve la supervivencia de las bacterias (Santos *et al.* 2015). No obstante existen ciertos serovares que tiene hospederos específicos y se mantiene en los riñones como el caso del serovar *icterohaemorrhagiae* en ratas que al diseminarse en el torrente sanguíneo y alcanzar la colonización en los túbulos proximales de los riñones no se ve afectada a comparación de la enfermedad aguda, debido a que la bacteria se adapta y se disemina por la orina sin causar daño al portador (Richer *et al.* 2015).

Como la mayoría de las enfermedades infecciosas, el resultado de la exposición a las *Leptospiras* depende de la dosis, la virulencia y la susceptibilidad del hospedero (Gamarra 2009). La presentación de la enfermedad puede ser:

- Forma aguda: Hemorragias petequiales en la mucosa a causa de daño capilar, también ocurre daño vascular en el riñón cuando la hemólisis es intensa. Se suman a esta lesión vascular básica, anemia y nefrosis hemoglobinúrica. El animal puede morir de septicemia, anemia hemolítica o por combinación de ambas. La muerte se deberá a una uremia causada por nefritis intersticial.
- Forma subaguda: Es similar a la forma aguda excepto porque la reacción es menos grave.
- Forma crónica: Una secuela frecuente es el aborto provocado por la muerte del feto, con degeneración placentaria o sin ella, en ambos casos, se trata de los efectos resultantes de la invasión al producto durante la fase septicémica de la enfermedad (Gómez 2008).

## 2.4 Epidemiología

La Leptospirosis es una enfermedad reemergente, su prevalencia es en las regiones tropicales y es un problema de salud pública mundial. Durante los últimos años las condiciones ambientales tales como las lluvias abundantes, el desborde de las aguas residuales durante las inundaciones, los suelos no ácidos y húmedos así como las altas temperaturas, se consideran factores que favorecen la transmisión de esta enfermedad (Gamarra 2009). Pero también es consecuencia de la probabilidad de que personas y animales entren en contacto con ambientes contaminados con *Leptospira* debido a viviendas con inadecuada disposición de residuos o desechos domiciliarios, convivencia con animales infectados, lo cual da lugar a diferentes fuentes de infección por fuentes de aguas residuales o suelos contaminados con orina de roedores infectados o de otros animales domésticos y silvestres, y puede potencialmente constituir una enfermedad grave aunque susceptible de ser tratada; en algunos países la Leptospirosis es endémica y la infección es más frecuente que la propia enfermedad clínica, por lo que las pérdidas económicas son menores, aunque su importancia radica en la transmisión al hombre (Gómez 2008).

Debido a que hay un número grande de potenciales fuentes de infección y diferentes oportunidades para la transmisión, los grupos en riesgo pueden diferir de un área a otra, dependiendo tanto de las características ambientales como sociales, mencionadas anteriormente (McBride *et al.* 2005).

Los ratones y las ratas, son la fuente de transmisión más importante en la infección humana en ambientes urbanos, dentro de esta especie los serovares más importantes son *L. icterohaemorrhagiae* y *L. grippotyphosa*. (Santos 2014). Las ratas y ratones más importantes en América Latina son:

- *Rattus norvegicus*: La Rata Noruega conocida como rata gris o rata de alcantarilla.
- *Rattus rattus*: La Rata Negra, llamada también rata de techo o rata de barco.
- *Mus musculus*: El ratón doméstico o ratón casero (Ayala y Zelaya 2008).

En otros países se ha reportado que la influencia de la temporada lluviosa en la presentación de la enfermedad es significativamente mayor en ratas durante la estación húmeda, tal es el caso en los estados de Pahang, Penang y Perak (Malasia) que concuerda con otros estudios realizados a nivel mundial. Las fuertes lluvias, el aumento de la humedad y la disponibilidad de los cuerpos de agua más fresca facilitan la diseminación de bacterias transmitidas por el agua, incluyendo *Leptospira spp* (Benacer *et al.* 2016). En El Salvador si bien es cierto el fenómeno de “el niño” ha ejercido influencia en los últimos años, anteriormente se ha demostrado que la zona de estudio, debido a sus características hidrográficas la humedad no se ve afectada, conservando una humedad del 89% en la actualidad (SNET 2016). La combinación de estos factores puede conducir a un entorno más favorable para la supervivencia de *Leptospira* (Benacer *et al.* 2016).

### 2.4.1 Hábitat de la rata y el ratón.

Están distribuidos por todo el mundo, a excepción de los polos. Es un animal de hábitos nocturnos, son terrestres o arbóreas y aunque su especie prefiere un hábitat determinado, son capaces de sobrevivir en otro tipo de entornos; generalmente se asientan en lugares húmedos y oscuros, siendo más común las alcantarillas, los pozos, las orillas de los ríos y las bodegas. También en sitios donde la basura se acumula más de un día. Actualmente viven en lugares de población humana, siendo un problema en el tema de la sanidad, ya que son portadoras de graves enfermedades (Guharay 2003).

## 2.4.2 Especies afectadas

La Leptospirosis afecta a más de 150 especies de mamíferos, entre los que figuran animales de compañía y de producción. Algunos serotipos se asocian con determinados animales, el serotipo *icterohaemorrhagiae* y *copenhageni* con las ratas, el *grippotyphosa* con los ratones campestres, el *hardjo* con el ganado bovino, el *canicola* con los perros y el *pomona* con los cerdos, pero también pueden presentarse en otros animales (CFSPH 2013) (Anexo A-1).

El roedor puede actuar como transmisor primario de *L. icterohaemorrhagiae* para los perros y como transmisor accidental de *L. pomona* para los bovinos, equinos, caprinos (Gonzales 2014).

## 2.5 Sintomatología (Signos clínicos)

La enfermedad en los animales:

**Rumiantes:** La enfermedad se manifiesta por una fiebre de 4 a 5 días, anorexia, conjuntivitis, diarrea. La leptospiremia empieza a desaparecer cuando se forman los anticuerpos y las Leptospiras desaparecen del todo de la corriente sanguínea en aproximadamente una semana, gracias a la inmunidad humoral. Las Leptospiras sobrevivientes se alojan después en los túbulos del riñón y la infección pasa a una fase crónica. Luego elimina al medio exterior enormes cantidades de Leptospiras, especialmente en los primeros meses de infección; después disminuye o cesa del todo. En los casos de infección crónica, los signos quedan restringidos a reabsorción embrionaria, momificación, mortinatos y abortos, el cual puede ocurrir seis meses después de la infección (CFSPH 2005).

**Porcinos:** Los lechones presentan detención en el desarrollo, fiebre, anorexia, depresión, diarrea, ictericia, hemoglobinuria y desórdenes intestinales (SAG s.f.). En adultos la infección produce síntomas tales como abortos y la aparición de lechones débiles, los serovares son *pomona*, *tarassovi* y *canicola* (CFSPH 2005).

**Equinos:** En la fase aguda puede haber fotofobia, lagrimeo, edema de conjuntiva ocular, miosis e iritis. En la fase crónica, se observan adherencias anteriores y posteriores, cuerpo vítreo turbio, formación de cataratas, uveítis y otras anomalías oftalmológicas. Puede haber abortos en yeguas infectadas (CFSPH 2005).

**Perros:** La forma más grave es la hemorrágica, se instala repentinamente por fiebre por 3 a 4 días, rigidez y mialgias en los miembros posteriores, y hemorragias en la cavidad bucal con tendencia a necrosis y faringitis. Puede haber gastroenteritis hemorrágica y nefritis aguda. En gatos la enfermedad se presenta raramente (CFSPH 2005).

**Animales silvestres:** entre ellos los roedores, están perfectamente adaptados a las Leptospiras y no manifiestan síntomas o lesiones (CFSPH 2005).

En el ser humano la bacteria sigue un ciclo similar al que realiza en los otros hospederos, luego de un período de incubación promedio de 10 días (se han observado casos con un período de incubación de 1 hasta 30 días). Se distinguen diferentes formas clínicas:

- a) Leptospirosis anictérica (90% de los casos), que se presenta como un síndrome febril inespecífico.
- b) Leptospirosis ictérica o Síndrome de Weil (5-10%), que presenta diversos grados de compromiso sistémico: insuficiencia renal, meningitis, neumonía, manifestaciones hemorrágicas, miocarditis con arritmias.
- c) Síndrome pulmonar hemorrágico grave, el compromiso pulmonar puede manifestarse como una neumonía aguda, o en su forma más grave como hemorragia pulmonar

(OMS 2003).

## 2.6 Técnicas de diagnóstico

Debido a la diversidad de manifestaciones clínicas que se presentan y por su similitud con otras patologías, es esencial contar con una buena anamnesis y con el apoyo de pruebas de laboratorio que permitan conducir hacia el diagnóstico definitivo. En nuestro país se utiliza la prueba de aglutinación microscópica o microaglutinación, esta emplea distintas serovariedades de *Leptospiras* que circulan de manera prevalente en una región determinada. Y de acuerdo a la recomendación de la OMS el Ministerio de Salud utiliza 20 serovares en humanos (MINSAL 2015). En nuestro país el Ministerio de Agricultura y Ganadería utiliza 12 serovares siendo los siguientes: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa*, *L. tarassovi*, *L. pomona*, *L. canicola*, *L. pyrogenes*, *L. autumnalis*, *L. hardjo*, *L. australis*, *L. bataviae*, *L. sejroe*, y *L. hebdomadis*<sup>2</sup>, los cuales serán evaluados durante nuestra investigación.

### 2.6.1 Identificación del agente

El aislamiento a partir de la sangre no es siempre satisfactoria, porque la bacteriemia es pasajera y no siempre se acompaña de síntomas clínicos. La demostración de la presencia de *Leptospiras* en el tracto genital, los riñones o la orina sólo debe interpretarse considerando en conjunto los síntomas clínicos y los resultados serológicos, ya que puede que estos hallazgos solo indiquen que el animal era portador. La imposibilidad de detectar la presencia de *Leptospiras* en la orina de un animal no es suficiente para descartar la posibilidad de que este sea portador renal crónico; solo indica que el animal no excretaba cantidades detectables de *Leptospiras* en el momento del examen (OIE 2014).

#### 2.6.1.1 Aislamiento de *Leptospira*

Es uno de los métodos más específicos de demostración de su presencia, siempre que no haya residuos de antibióticos, que no haya autólisis avanzada del tejido, que los tejidos se manejen con rapidez para realizar cultivos después de su recogida y en el caso de la orina, que tenga un pH adecuado (OIE 2014).

#### 2.6.1.2 Técnica de tinción inmunoquímicas

La inmunofluorescencia y diversas técnicas inmunohistoquímicas son útiles para diagnosticar la infección en material patológico que es inadecuado para la realización de cultivos o donde se requiere un diagnóstico rápido, depende del número de microorganismos presentes, son menos apropiadas para diagnosticar el estado de portador crónico (OIE 2014).

#### 2.6.1.3 Métodos de detección de ácido nucleico

Se emplean cada vez más para detectar *Leptospiras* en tejidos y líquidos corporales de animales debido a la sensibilidad percibida y a la capacidad de dar un diagnóstico temprano. En la actualidad se cuenta con pruebas más específicas como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la cual tiene alta especificidad (Gómez 2008). Con las pruebas de la PCR no se identificó el serotipo infectante (OIE 2014).

---

<sup>2</sup> Cabrera, C. 2016. Serovares de leptospirosis. Ministerio de Agricultura y Ganadería (Comunicación personal). El Salvador.

## **2.6.2 Pruebas serológicas**

Las pruebas serológicas constituyen el procedimiento de laboratorio utilizado con más frecuencia para confirmar el diagnóstico clínico, para determinar la prevalencia en el rebaño y para realizar los estudios epidemiológicos. Se ha descrito una amplia variedad de pruebas serológicas que muestran grados variables de especificidad de serogrupo y de serotipo. La prueba de la aglutinación microscópica (MAT) y el enzimoimmunoanálisis (ELISA) (OIE 2014).

### **2.6.2.1 Prueba de aglutinación microscópica**

Es la prueba serológica estándar. Los antígenos seleccionados para su utilización en la MAT deben incluir las cepas representativas de los serogrupos que existen en la región concreta, además de aquéllos que se sabe que persisten en otra región en la especie hospedadora objeto de estudio. La MAT se utiliza principalmente para diagnosticar la enfermedad en individuos y en rebaños. Para su realización se emplea suero problema a diferentes diluciones, cultivo de diversas cepas de referencia de *Leptospira*, así como microscopio de campo oscuro para evaluar el grado de la aglutinación. Esta prueba permite determinar el título del suero para cada antígeno probado. Generalmente es positiva entre los 10 a 12 días después de la presentación de los primeros síntomas y signos clínicos. Sin embargo, puede ocurrir seroconversión entre el quinto y séptimo día después de la aparición de la enfermedad (OIE 2014). Tiene excelente especificidad, pero menor sensibilidad, para obtener una sensibilidad óptima deben emplearse antígenos representativos de todos los serogrupos conocidos que existen en la región, procedentes de aislamientos locales y preferiblemente, cepas que representen a todos los serogrupos conocidos (Santos 2014).

### **2.6.2.2 Enzimoimmunoanálisis**

En general, los ELISA son bastante sensibles, pero no tienen la especificidad de serotipo de la MAT. La prueba puede detectar IgM durante la primera semana de la enfermedad antes que la MAT, aunque puede llegar a ser negativa más tempranamente. Los animales que han sido vacunados frente al serotipo pertinente pueden dar resultados positivos en algunos ELISA, dificultando de esta manera la interpretación de los resultados (OIE 2014).

## **2.7 Prevención y control**

Las vacunas contra la Leptospirosis están disponibles para porcinos, bovinos y caninos. Si bien las vacunas previenen la enfermedad, no previenen completamente la infección ni la excreción de los organismos. Los animales vacunados pueden infectarse sin mostrar signos clínicos, y pueden tener leptospiuria, aunque en menor grado que los animales no vacunados. Las vacunas protegen únicamente contra las serovariedades incluidas en su composición o las serovariedades relacionadas estrechamente. El tratamiento profiláctico de animales expuestos con antibióticos también puede prevenir la enfermedad. No se debe permitir a los animales beber aguas contaminadas o ingresar en ellas. Los animales de reemplazo deben seleccionarse de rodeos (hatos) negativos a la Leptospirosis. En caso de no saber si los animales están libres de *Leptospira*, deben ponerse en cuarentena por 4 semanas y ser muestreados antes de ingresarlos al hato (CFSPH 2005).

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) sugiere para la prevención y control de ratas y ratones:

- Evitar su acceso a las fuentes de alimentos, el agua y los elementos que sirven de refugio para los ratones.

- Educación a la población respecto a la enfermedad su forma de transmisión y el papel que juegan en ella los animales infectados, así como las actividades de riesgo.
- Limpieza diaria de las fuentes de alimentos y lugares de anidamiento de ratas y ratones (colocar alimentos en recipientes de plástico con tapas herméticas).
- Mantener granos y alimentos para animales de producción sellados o en recipientes de plástico en sitios elevados: Si existe almacenamiento de basura y residuos de alimentos dentro del hogar, hacerlo en recipientes cerrados.
- Control mecánico: el empleo de trampas alrededor de la casa para ayudar a reducir la población de ratones.
- Rodenticidas: un cebo envenenado contiene un agente tóxico y un alimento, los cebos frescos son los más aceptados por ratas y ratones (CDC 2010).

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1 Descripción del estudio**

El estudio fue realizado en el Departamento de San Vicente, Municipio de Tecoluca, en los cantones San Carlos Lempa, Las Mesas y las Anonas.

Las condiciones climatológicas de la zona se caracterizan por tener entre 1,700 a 1,800 mm de lluvia al año, con una temperatura promedio de 26.8°C y una humedad relativa promedio de 73%. La georreferencia de la parte más baja es de -1 msnm (metros sobre el nivel del mar) con 88°45'0" O y 13°16'59.88" N y la zona más alta es de 19 msnm con 88°48'0" O y 13°22'59.88" N (Protección Civil 2013).

Para la investigación se utilizaron un mínimo de 32 unidades experimentales (UE), el tamaño establecido de la población de ratas y ratones capturados en el lugar de estudio, fueron 90 ejemplares, sin embargo el número a utilizar de muestras fue establecido según un periodo de tiempo determinado para la recolección de roedores, la captura final fue de 150 roedores, de los cuales solo 88 fueron aptos para la obtención de muestras y su análisis en la Red de Laboratorios Veterinarios del MAG ubicado en el Cantón Matazano, Municipio de Soyapango.

#### **3.2 Metodología de campo**

##### **3.2.1 Captura de ratas y ratones**

La unidad de estudio fueron ratas y ratones procedentes de tres cantones del municipio de Tecoluca en San Vicente, dicha captura fue realizada en un periodo de ocho meses, siendo en total de 88 ratas y ratones de las siguientes especies: *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* y *Mus musculus*. Los cantones fueron elegidos debido al incremento en el número de casos reportados de *Leptospira* en bovinos, equinos, suinos y caprinos (OIE 2016), siendo un mínimo de 32 unidades productivas, 11 se encontraron localizadas en San Carlos Lempa, 13 en Las Mesas y ocho en Las Anonas.

La captura de las ratas y ratones se realizó mediante trampas sherman y trampas artesanales, utilizando el protocolo de Lau *et al.* 2003, las cuales fueron identificadas con un número correlativo con plumón permanente, se colocaron a distancias de aproximadamente cinco metros entre sí, para mantener intervalos constantes entre las trampas, siendo más fácil de retirarlas a la mañana siguiente, dichas trampas fueron señalizadas con carteles para evitar que las personas las activaran. Las trampas se colocaron en los lugares con más probabilidad de encontrar ratas y ratones como lo fueron: zonas de reservas de alimentos, basureros, depósitos con almacenamiento de agua, lugares de resguardo de los animales, comederos, bebederos y aquellas zonas en las que fue visualizado excremento o anidación de roedores. Las trampas que fueron ubicadas dentro de las viviendas, se colocaron paralelamente a las paredes y otras superficies verticales, como los armarios, detrás de aparatos, muebles, y sobre estantes más altos que el piso, prestando especial atención a las áreas donde haya evidencias de actividad de roedores (Lau *et al.* 2003) (Anexo A-2), colocándose de cuatro a seis trampas por unidad productiva, utilizando como referencia la actividad de roedores en cada propiedad según lo indicado por los propietarios de las viviendas, las trampas fueron colocadas en horas tempranas y retiradas al siguiente día a su colocación, cada trampa fue revisada para verificar la captura de roedores, al existir capturas, los roedores fueron transportados hasta las instalaciones del MAG, realizando posteriormente la toma de muestra el mismo día y llevada a la Red de Laboratorios

Veterinarios para su posterior diagnóstico. A pesar de que el cebo más utilizado según la literatura consultada fue mantequilla de maní y pan, por ser el que mayores resultados ha generado según Benacer *et al.* 2016, a lo largo del periodo de muestreo, fueron utilizados otros cebos como: elote con jamón del diablo, pupusa, pepino, semillas de girasol, tomate y pan con queso, siendo este último el que mejores resultados presentó durante las capturas.

### 3.2.2 Toma de Muestra

A continuación se presenta los pasos a seguir para el manejo de las muestras:

1. Recolección de las trampas con las ratas y ratones.
2. Transporte de roedores el mismo día a las instalaciones de la Red de Laboratorios del Ministerio de Agricultura y Ganadería, Centro Agropecuario El Matazano.
3. Se ocupó el equipo de protección: filipina, guantes de cuero, mascarilla especial para gas, botas de trabajo.
4. Se introdujo cada roedor en la cámara de sacrificio.
5. Se colocó un algodón impregnado con cloroformo hasta que perdieran la conciencia.
6. Se desinfectó la zona a puncionar con un algodón con alcohol.
7. Se realizó la toma de la muestra de sangre por vía intracardiaca por medio de una jeringa de 3cc con aguja de 1½ x 21, cerca del área del diafragma en dirección craneal para poder extraer de 0.5 a 1ml de sangre desde el corazón.
8. La sangre extraída se depositó en tubos de ensayo sin anticoagulante de 2 ml con tapón de goma (Suepaul *et al.* 2014). Los tubos fueron colocados de forma inclinada a 30° en una gradilla hasta la obtención del suero.
9. Se dejó el tubo de 2 ml en reposo a temperatura ambiente para la retracción del coágulo por 15 o 20 minutos.
10. Cada muestra se identificó conforme al cantón al que pertenecía y su número correlativo.
11. El suero se almacenó para su manejo, conservación y posterior utilización, el suero queda bajo la disposición del Ministerio de Agricultura y Ganadería.

### 3.2.3 Materiales a utilizar

- 45 Trampas de tipo Sherman (Anexo A-3)
- 15 Trampas tipo artesanales (Anexo A-4).
- 1 Cámara de sacrificio
- 1 Galón de Cloroformo
- 2 Máscaras especiales para gases.
- 2 Pares de guantes de cuero.
- Botas de trabajo
- 1 Caja de guantes de látex de 100 unidades
- 1 Litro de alcohol al 90 %
- 2 Bolsas de algodón
- 2 Cajas de jeringas de 3cc.
- 2 Cajas de jeringas de 1cc.
- 1 Caja de 100 tubos de ensayo con tapón de goma sin anticoagulante con capacidad para 2 ml
- 2 Gradillas de aluminio para 24 tubos
- 1 Litro de desinfectante.
- 1 Litro de detergente.
- Papel toalla.

- Cinta adhesiva
- Bolsas negras.
- Cebos.
- Incubadora
- Centrifuga
- Congelador
- Cámara de Flujo Laminar
- Micropipetas
- Beaker de descarte
- Placas
- Puntas
- Vórtex
- Cámara fotográfica

### 3.2.4 Georreferenciación

Se tomaron las coordenadas geográficas en cada unidad productiva (latitud, longitud y altitud) a través de GPS Garmin Etrex. El mapa fue realizado con el programa ArcVIEW.

### 3.3 Metodología de laboratorio

El procesamiento de las muestras fue desarrollado en la Red de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Agricultura y Ganadería, Centro Agropecuario El Matazano, Soyapango. El método serológico utilizado fue la prueba de aglutinación microscópica (MAT).

#### 3.3.1 Técnica de Microaglutinación en Placa

La sangre fue coagulada a temperatura ambiente y posteriormente centrifugada a 1,100 rpm x 10 minutos. Luego se separó el suero y fue congelado para su posterior análisis.

Se utilizó un cepario con los serovares mayormente mencionados por la literatura consultada: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa*, *L. tarassovi*, *L. pomona*, *L. canicola*, *L. pyrogenes*, *L. autumnalis*, *L. hardjo* (Jiménez-Coello *et al.* (2008), Samir *et al.* (2015), Benacer *et al.* (2016)). Además con los que cuenta el MAG: *L. australis*, *L. bataviae*, *L. sejroe*, *L. hebdomadis*.

**El procedimiento de la técnica se realizó como se describe a continuación.**

- 1) Se trasladó del cultivo de medio líquido una pequeña cantidad a tubos de ensayo, previamente rotulados con el número de identificación del antígeno correspondiente. Luego fueron centrifugados dichos antígenos a 1,100 rpm x 10 minutos. Se colocó según número de muestras, a cada tubo de ensayo 1.25 ml de Solución Amortiguada con Fosfato (SAF) y 25 µl del suero a analizar, para obtener una dilución de 1:50.
- 2) Se utilizó placas de poliestireno con fondo en U, y se hizo el plan de distribución en la placa, colocando previamente el control.
- 3) En la primera columna se colocó el control negativo de cada antígeno a usar, desde la segunda columna a la 12ª se coloca muestras.
- 4) Se llenó los pozos de la primera columna con 50 µl de SAF, en las columnas restantes se colocó 50 µl de la dilución SAF- SUERO 1:50 correspondiente a cada muestra.
- 5) Se agregó 50 µl de cultivo de *Leptospira*, previamente centrifugado, en su fila respectiva (Anexo A-5)

- 6) Se mezcló suavemente y se cubrió con parafilm, se colocó en la incubadora durante 2 horas a 29 +/- 1° c.

### 3.3.2 Interpretación

Un título de 1:100 se considera positivo a los efectos del comercio internacional, pero dada la alta especificidad de la MAT, pueden tomarse títulos menores como indicio de exposición previa a *Leptospira* (OIE 2014). En el caso de esta investigación se utilizó un título de 1:50 lo cual difiere con lo establecido por la Red de Laboratorios Veterinarios del MAG en El Salvador, el cual se rige por el Manual Terrestre de la OIE, en la que se establece un punto de corte de 1:100 como muestra positiva para todas las especies mamíferas; dado que no se tiene un estándar para roedores, se estableció una comunicación personal con doctores miembros del centro de referencia de la OIE, de países como: Nueva Zelanda, Argentina y Australia, para constatar los puntos de corte utilizados en roedores silvestres en el diagnóstico de leptospirosis en sus países, obteniéndose como respuesta una consideración de un título de 1:50 como resultado seropositivo a la prueba del MAT.

La interpretación del resultado para establecer el título de una muestra debe ser de punto final como la dilución más alta de suero que muestra un 50% de aglutinación, dejando libres un 50% de las células en comparación con un cultivo control diluido a la mitad en solución salina tamponada con fosfato. El resultado de la prueba puede indicarse como el punto final de la dilución del suero (por ejemplo, como 1/50 o 1/400) (OIE 2014). Para su confirmación se requiere de una segunda muestra (no antes de dos semanas posteriores) en la cual el título debe aumentar cuatro veces más que el inicial (Odriozola 2001). Este punto es difícil en nuestro caso, ya que los roedores silvestres eran sacrificados posterior a la toma de muestra.

### Lectura de resultados

Se examinó mediante microscopía de campo oscuro para observar si la muestra presentaba aglutinación de las bacterias (formación de grumos), siempre y cuando el suero-muestra presente anticuerpos; de lo contrario se observarían en el campo *Leptospiras* libres. Para comprobarlo se depositó una pequeña gota uniforme de cada pozo sobre un portaobjetos de vidrio limpio, se examinó por el microscopio con el objetivo 10X. Colocando primero el control negativo de cada serovar.

**Cuadro A-1.** Grado de reacción interpretado por estimación de % de *Leptospiras* aglutinadas.

NIVEL DE AGLUTINACION	GRADOS DE REACCION
Aglutinación con 0-25% células libres	++++
Aglutinación con 25% de células libres	+++
Aglutinación con 50% de células libres	++
Aglutinación con 75% de células libres	+
Sin aglutinación e idéntico al antígeno de control	Negativo

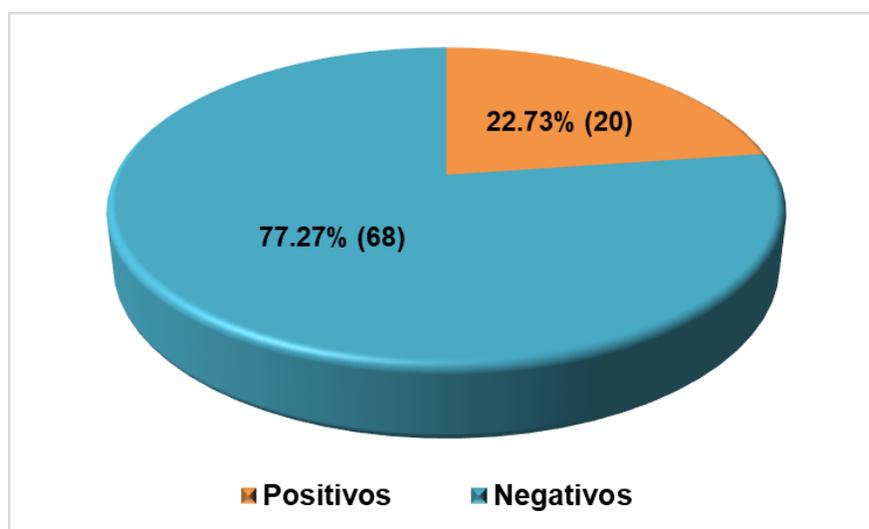
Todos los sueros que en la prueba de selección preliminar (dilución 1:50) se observe la reacción de aglutinación del 50% (++) o mayor frente a uno o más antígenos; deberá ser

titulado haciendo diluciones dobles del suero comenzando desde la dilución 1:50 ha la dilución 1: 12,800 o más.

#### 4. Resultados y Discusión

En este estudio se recolectaron 150 muestras de ratas y ratones sinantrópicos procedentes de tres cantones (San Carlos Lempa, Las Mesas y Las Anonas) del Municipio de Tecoluca, San Vicente, El Salvador, durante el período comprendido de diciembre del 2016 a julio del 2017. Un panel de 12 serovares fue utilizado para la prueba MAT, los cuales fueron seleccionados según la epidemiología de serovares de *Leptospira* obtenida de diferentes investigaciones realizadas en el continente Americano. De las muestras recolectadas, 88 fueron adecuadas para su análisis en la prueba de MAT (Anexo A-6, A-7, A-8).

La seroprevalencia de *Leptospira* obtenida en la presente investigación fue de 22.73% (20/88), con muestras que fueron seropositivas a uno o más serovares (Figura A-1), resultando menor a las seroprevalencias presentadas en diversos estudios realizados a nivel mundial con títulos de 1:50. Por ejemplo, en África, Egipto reporta seroprevalencia de 26.7% (Samir *et al.* 2015); mientras que en el continente Americano se reportó en Argentina seroprevalencias desde el 30.1% al 52.3%, Chile 37.8% y México 50% (Marder *et al.* 2006, Scialfa *et al.* 2010, Zamora *et al.* 1999, Méndez *et al.* 2013). En la región Centroamericana existe un único estudio realizado en Nicaragua, el cual reportó una seroprevalencia del 30% (Cardoza y Gonzales 2011). Es importante reconocer con respecto al porcentaje de seronegatividad obtenido en este estudio, que los resultados negativos no garantizan que al momento de la toma de muestra los roedores se encontraran libres de la bacteria, únicamente podría indicar que al momento de la toma de muestra, los roedores no tenían los títulos suficientes para expresar la enfermedad, por lo tanto resultarían negativos animales con un caso temprano de la infección o un título antiguo que ha disminuido, y debido a que en el momento de la toma de las muestras los roedores fueron sacrificados, no fue posible realizar una segunda prueba MAT para verificar la titulación en cada una de estas.



**Figura A-1.** Porcentaje de seroprevalencia de *Leptospira spp* en ratas y ratones sinantrópicos de la zona de estudio.

En El Salvador, el único estudio del que se tiene información sobre la búsqueda de serovares de *Leptospira* en roedores, es el de Zelaya (2008), en el que se evaluaron tres mercados del municipio de San Salvador, analizándose 171 muestras en dos especies de roedores (*R. rattus*, *M. musculus*); no detectándose la presencia de anticuerpos contra ninguno de los serovares utilizados. La diferencia de resultados obtenidos en el presente estudio comparado con el de Zelaya puede deberse a que en el estudio de los mercados, se empleó un punto de corte para MAT de 1:100; además, no existían reportes de casos positivos a leptospirosis en el área donde se realizó el estudio; también es importante considerar que en la investigación de Zelaya la procedencia de los roedores era de mercados ubicados en la zona urbana, mientras que la presente investigación fue realizada en una zona rural que reúne las características climáticas y ambientales ideales para el contacto del agente infeccioso con los animales domésticos en los cuales se ha reportado la enfermedad<sup>3</sup>.

El hallazgo de un 22.73% de seroprevalencia en esta investigación podría estar influenciado por las condiciones geográficas ambientales de la zona de estudio, como: temperatura, pH, humedad relativa y composición de los suelos, como se plantea en el estudio de Sandow y Ramírez 2005. Las condiciones del trópico son favorables al proporcionar temperaturas de 28-30°C, además es necesaria una humedad relativa del 73%, un pH de 7.2 (Gonzales *et al.* 2006) y la presencia de materia orgánica en suelo (Trueba *et al.* 2004, Cardoza y Gonzales 2011) para el crecimiento de la bacteria. Lau 2016 menciona que dentro de los factores que influyen a la presencia de *Leptospira* se encuentran: el cambio climático, el crecimiento de la población, la urbanización, la pobreza y la intensificación agrícola. Del mismo modo en Latinoamérica, se consideran otros factores como: falta de saneamiento ambiental, sistema deficiente de alcantarillas y un sistema inadecuado del manejo de basura que promueven la proliferación de roedores y su presencia en los hogares, favoreciendo el riesgo de una transmisión de leptospirosis (Benacer *et al.* 2016, Lau *et al.* 2016, Ko Al *et al.* 1999, Ganoza *et al.* 2006). Con respecto a la zona de estudio, vale la pena mencionar que se cumple con todos los factores antes mencionados, creando un hábitat favorable para la supervivencia de la bacteria.

En otro estudio se apreció que la presencia de *Leptospira* varía de acuerdo a la estación del año en que son capturados los roedores, siendo mayor en invierno y más bajo en verano (Zamora *et al.* 1999). En este estudio el muestreo fue realizado mayormente durante la época seca, sin embargo la captura de roedores fue más exitosa al inicio de la época lluviosa, factor que contribuye debido a que en esta época los roedores buscan refugio y alimentación en las viviendas aledañas a la zona, favoreciendo de esta manera a una mayor concentración de roedores y el contacto de sus excretas con los animales domésticos que poseen los habitantes como: bovinos, equinos y caninos, además de esto, puede sumarse que en la zona existe un sistema deficiente del manejo de basura dentro de las viviendas donde se realizaron los muestreos, del mismo modo una contaminación de aguas y suelos a través de excrementos y orina, que brindan las condiciones para la propagación de la bacteria. No obstante no es posible hacer la asociación con ningún factor antes mencionado en este estudio, aunque dichos factores podrían influenciar en la presencia de roedores en la zona.

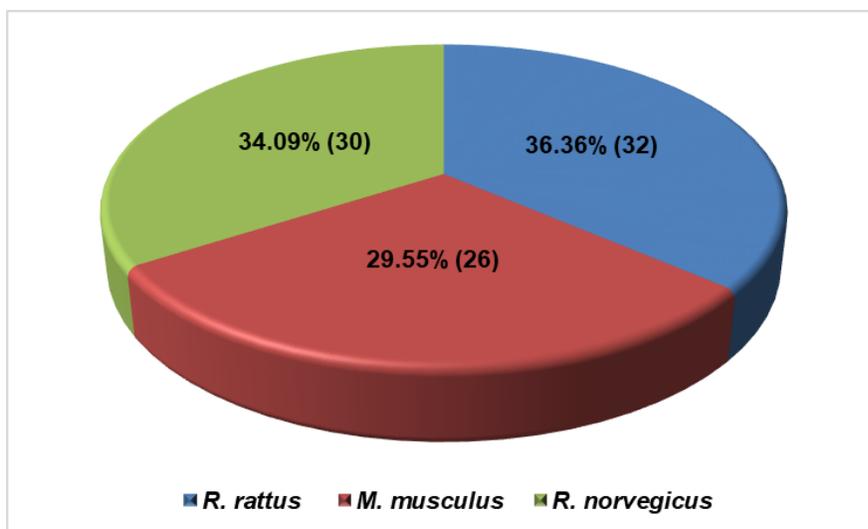
Otro factor que debe considerarse en los resultados es el MAT, que aun siendo establecido como la prueba de oro para identificar serogrupos y serotipos de *Leptospira* (Lau *et al.* 2016),

---

<sup>3</sup> Quintanilla, E. 2016. Casos de leptospirosis. Ministerio de Agricultura y Ganadería (Comunicación personal). El Salvador.

la prueba posee limitaciones, ya que los títulos de anticuerpos de los aislamientos locales son a menudo más altos que títulos de las cepas referenciales, y a veces no suelen ser las mismas que están afectando en la zona, por lo que si no se utilizan los antígenos adecuados, los títulos serán bajos al existir una reacción cruzada, que se puede explicar por la presencia de varios antígenos comunes entre *Leptospiras*. Además se ha demostrado que la serología por MAT en muestras con muy pocos días de enfermedad puede resultar negativa (Céspedes *et. al* 2005). Dicho lo anterior se debe tener en cuenta la posible existencia de otros serovares presentes en la muestras analizadas, los cuales no fueron posibles de identificar debido a no ser añadidos al panel de diagnóstico, pudiendo incluirse serovares detectados en otras investigaciones realizadas en el continente americano como: *L. copehageni*, *L. ballum*, *L. javanica* y *L. wolffi*, lo cual pudo influenciar en el bajo porcentaje de seropositividad obtenido.

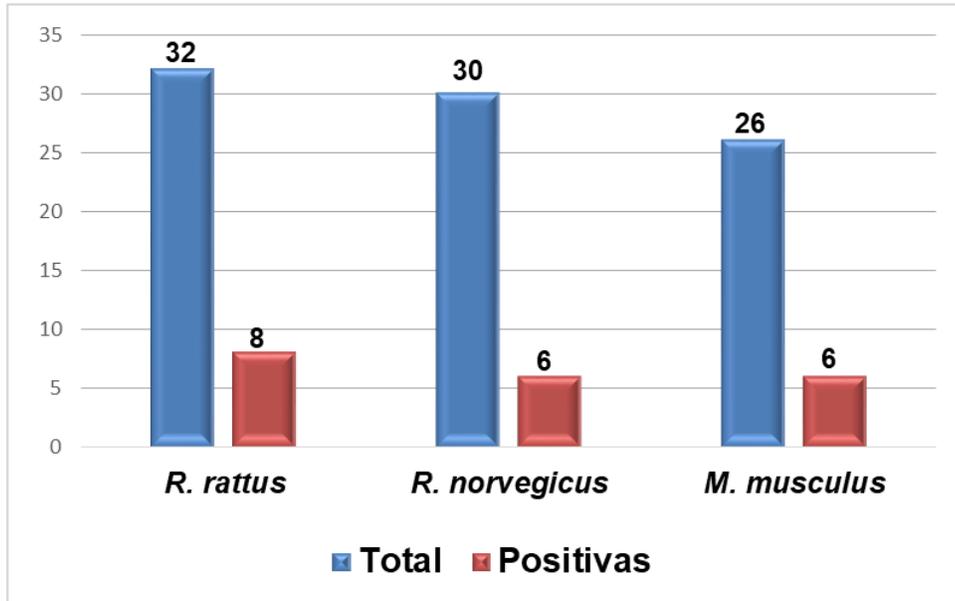
Con respecto a las especies de roedores capturados en esta investigación se identificaron las tres especies más comunes de roedores reportadas para el país: *Rattus rattus*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*, obteniendo una distribución por especie de: 36.36% (32), 34.09% (30) y 29.55% (26) respectivamente (Figura A-2). En el caso de este estudio las tres especies capturadas constituyen a los roedores que se encuentran estrechamente relacionados al hombre a nivel mundial y su comportamiento asociado a la búsqueda de alimento, refugio y reproducción (PAHO 2017).



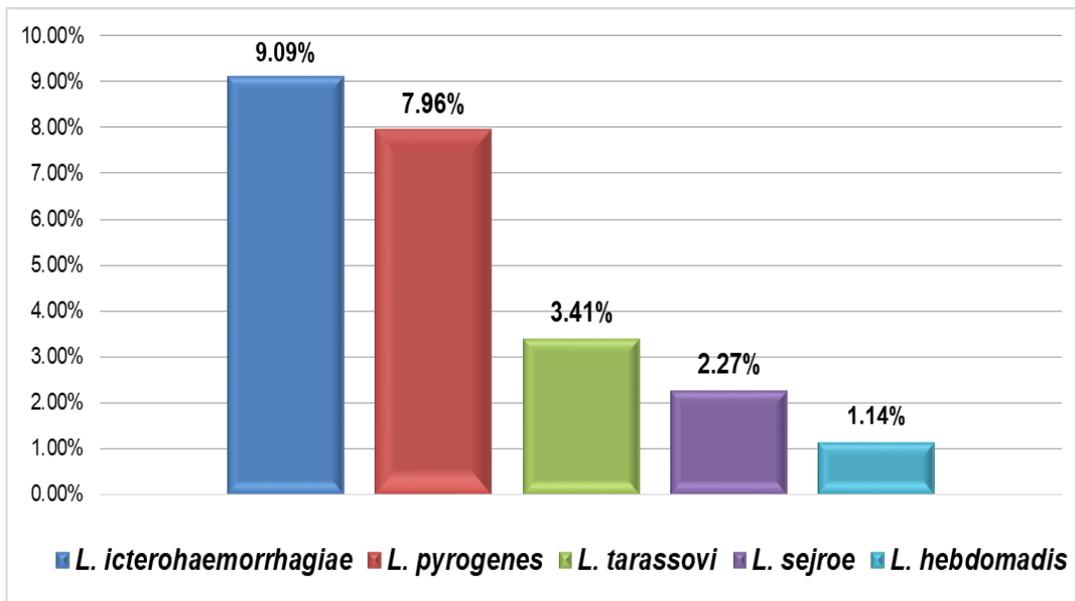
**Figura A-2.** Porcentaje de especie por muestra analizada

En comparación con el estudio realizado en El Salvador por Zelaya 2008, se obtuvo una diferencia de las especies capturadas, ya que dicha investigación logró la captura de las especies: *R. rattus* 73.68% (171) y *M. musculus* 26.32% (45). En estudios realizados en Irán y Argentina presentan la especie *R. norvegicus* como la más capturada seguido por *R. rattus*, donde los porcentajes varían de 89% al 11% (Esfandiari *et al.* 2017, Arango *et al.* 2001), mientras que otra investigación realizada en Argentina por Marder *et al.* 2006, reportó solamente a la especie *R. rattus* como roedor capturado en su investigación, al igual que en Nueva Caledonia donde reportaron que *R. rattus* fue la especie más frecuentemente capturada, con un porcentaje de 60,6%, *M. musculus* 25.5% y *R. norvegicus* el 9,1% (Pérez *et al.* 2011). En la región centroamericana, Nicaragua y Guatemala reportan a la especie *M. musculus* como la más capturada con porcentajes desde el 57% al 85% (Miranda 2014, Cardoza y Gonzales 2011).

En relación al resultado de seropositividad a *Leptospira* por especie de roedor en este estudio fue: *R. rattus* 25% (8), *R. norvegicus* 20% (6) y *M. musculus* 23.07% (6) (Figura A-3). Las tres especies analizadas resultaron seropositivas a los siguientes serovares: *icterohaemorrhagiae* 9.09% (8), *pyrogenes* 7.96% (7), *tarrasovi* 3.41% (3), *sejroe* 2.27% (2) y *hebdomadis* 1.14% (1). Una de las muestras fue seropositiva a dos serovares: *icterohaemorrhagiae* y *pyrogenes*, mientras que el 77.27% (68) resultó ser negativo (Figura A-4); demostrando con estos resultados la posible circulación de los serovares anteriores en dicha especie del área de estudio.



**Figura A-3.** Seroprevalencia de *Leptospira* spp. según la especie de ratas y ratones sinantrópicos de la zona de estudio.



**Figura A-4.** Seroprevalencia por serovares de *Leptospira* spp. en ratas y ratones sinantrópicos de la zona de estudio.

En la figura A-4, se observa que hay mayores porcentajes del serovar *icterohaemorrhagiae* y *pyrogenes*, mientras que el menor fue el serovar *hebdomadis*.

La diferencia de los serovares identificados en este estudio, puede deberse a la especie de roedor. Según lo descrito en CFSPH 2013, en la especie *R. norvegicus* y *R. rattus* se considera a los serovares *icterohaemorrhagiae* y *copenhageni* como los de mayor importancia, mientras que en la especie *M. musculus* es el serovar *grippotyphosa* el de mayor prevalencia. No obstante en investigaciones alrededor del mundo han relacionado a los roedores con los siguientes serovares: la especie *R. norvegicus* y *R. rattus*, son consideradas como uno de los principales reservorios del serovar *copenhageni* a nivel mundial (Tucunduva *et al* 2008), además se ha encontrado que *M. musculus* puede ser reservorio de los serovares *ballum* e *icterohaemorrhagiae* (Bharti *et al* 2003).

El serovar más encontrado en este estudio fue *L. icterohaemorrhagiae* con 9.09% (8) (Figura A-5), lo cual coincide con lo descrito en diferentes estudios a nivel mundial: Egipto, Argentina, Colombia, Trinidad y Tobago, y Nicaragua, que reportan porcentajes que varían del 16.5% al 87.5% (Samir *et al.* 2015, Vanasco *et al.* 2003, Florez *et al.* 2010, Morales *et al.* 1978, Suepaul *et al.* 2014, Cardoza y Gonzales 2011). El único estudio que presenta porcentaje menor fue el realizado en Jalisco México, que presentó una seroprevalencia de 3.95% (Sepulveda *et al.* 2002).

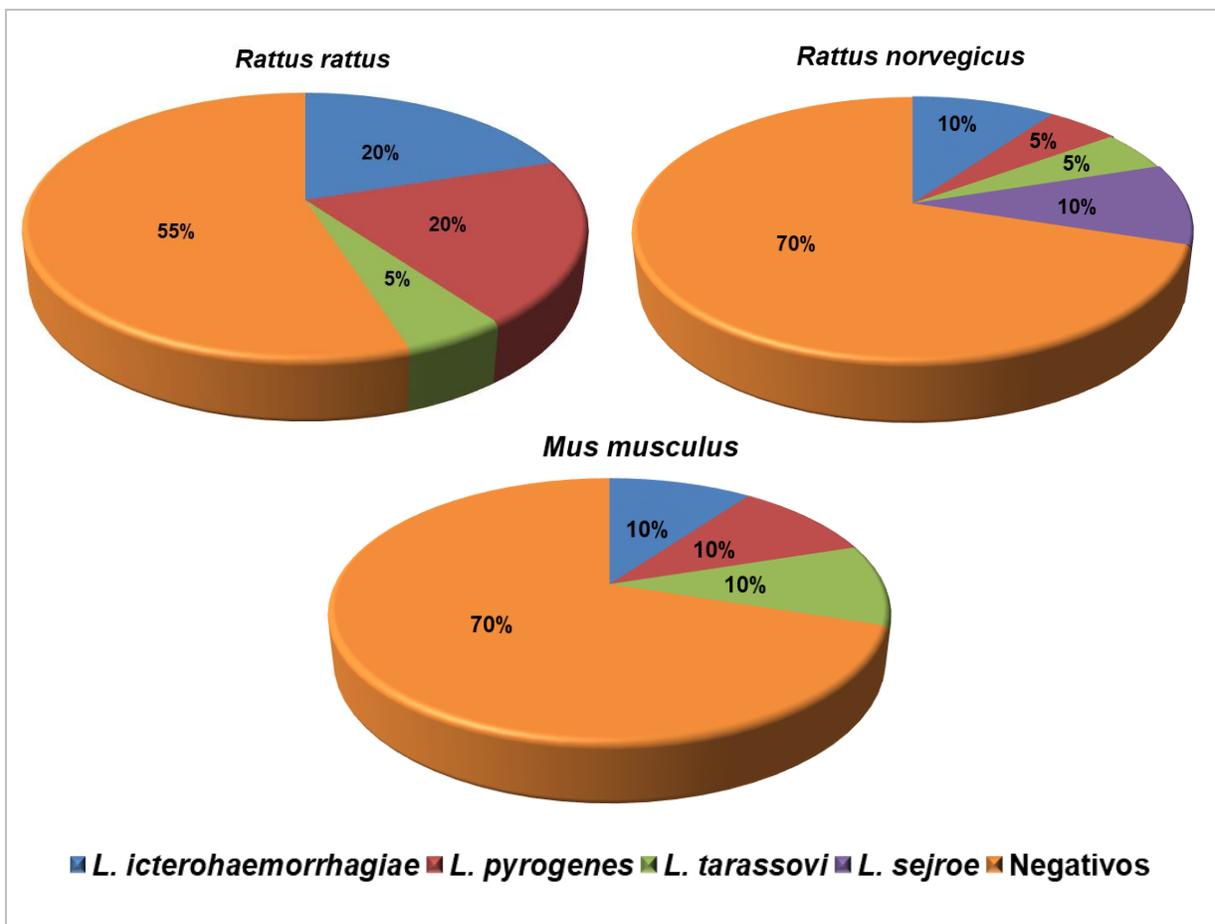


Figura A-5. Porcentaje de seropositividad de serovares en ratas y ratones capturados.

La detección de los serovares de *Leptospira* en ratas y ratones, no es de extrañar, ya que dichas especies son reservorios de serovares específicos como es el caso del serovar *icterohaemorrhagiae*, además de estar asociado a otros serovares con diferentes hospederos como el serovar *pyrogenes* (CFSPH 2005). Los serovares anteriormente mencionados fueron los de mayor porcentaje en la investigación, los cuales están asociados a roedores, bovinos y caninos (CFSPH 2005), si bien el roedor cumple la función de reservorio natural del serovar *icterohaemorrhagiae*, las especies canina y bovina son considerados como sus hospederos de mantenimiento por lo cual podría existir una asociación con los serovares encontrados en la zona de estudio, destacando la importancia epidemiológica en la transmisión hacia diversas especies en la zona.

En relación a la distribución geográfica por cantón se reporta el mayor número de casos positivos en roedores en el cantón de San Carlos Lempa 60.71% (17), seguido de Las Anonas 7.41% (2) y Las Mesas 3.03% (1). Al respecto de otras investigaciones sobre la enfermedad en diferentes especies animales en esta misma zona, se demostró la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* en la especie equina y bovina. Álvarez *et al* 2017 reportó en la especie equina 112 animales seropositivos, mientras que según reportes de los casos clínicos en los últimos tres años de la vigilancia epidemiológica del MAG en la especie bovina, se observó 45 casos en los tres cantones<sup>4</sup>. Dichos estudios demuestran que diferentes especies animales han tenido desafíos a leptospirosis en la misma zona de estudio.

**Cuadro A-2.** Seroprevalencia por cantón

Cantón	Positivos	Negativos	Total	Seroprevalencia
San Carlos Lempa	17	11	28	60.71 %
Las Anonas	2	25	27	7.41 %
Las Mesas	1	32	33	3.03 %

Además de la presencia de los vectores, la diferencia de serovares y seroprevalencia entre cantones (Anexo A-9 a A15), podría haberse visto afectada por ciertos factores observados como: crecimiento de los asentamientos humanos, tal es el caso del cantón San Carlos Lempa el cual presenta una mayor población humana (1,354), en comparación a Las Anonas (603) y Las Mesas (no existen datos oficiales)<sup>5</sup>. A su vez se puede observar una tendencia que la mayor cantidad de roedores seropositivos fue en el mismo cantón (Figura A-6 y A-7), sin embargo no se puede concluir con este estudio la relación de los asentamientos humanos con la prevalencia encontrada, aunque Álvarez *et al.* 2017 asoció los asentamientos humanos con la presencia de mayor seropositividad en equinos debido a la concentración de dichos animales, ya que esta especie es usada como medio de transporte en los tres cantones evaluados en el estudio.

Del mismo modo, Benacer 2016 concluye que la rápida urbanización y la pobreza han llevado al crecimiento de los asentamientos precarios en muchos países de ingresos bajos. Estos lugares a menudo se caracterizan por un deficiente sistema de manejo de basura y

<sup>4</sup> Quintanilla, E. 2016. Casos de leptospirosis. Ministerio de Agricultura y Ganadería (Comunicación personal). El Salvador.

<sup>5</sup> Asencio, G. 2017. Características de la vivienda que influyen en la salud de la población. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (Comunicación personal). El Salvador

dificultades de saneamiento, que promueven la proliferación de roedores y conllevan el riesgo de una transmisión de la enfermedad. Esto también plantea un alto riesgo de exposición a los seres humanos, ya que se ha encontrado que la cercanía con la basura acumulada aumenta significativamente el riesgo de leptospirosis.

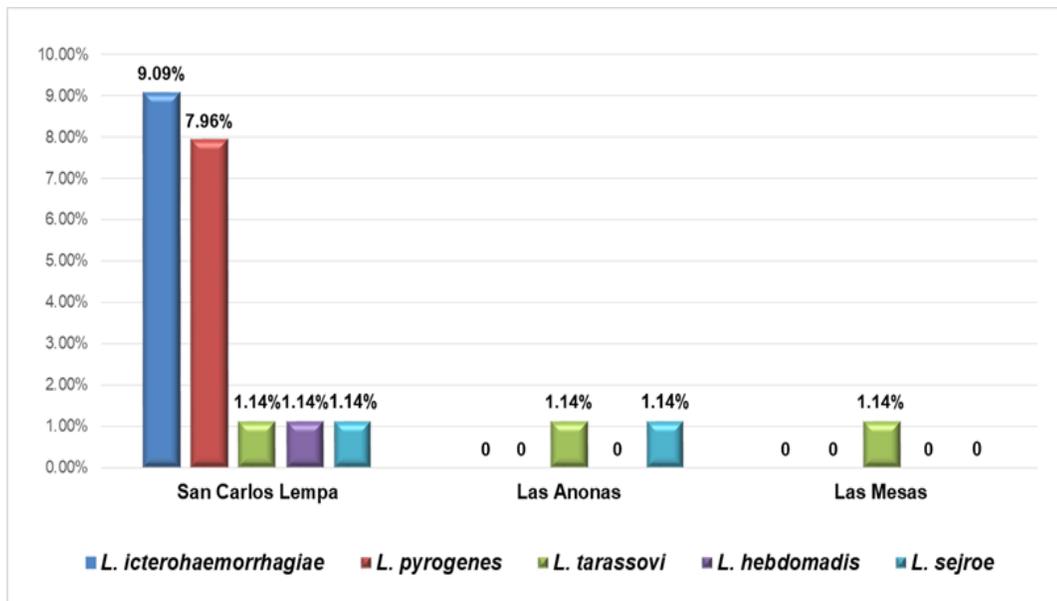


Figura A-6. Porcentajes de serovares distribuidos por cantón en el municipio de Tecoluca, San Vicente, El Salvador.

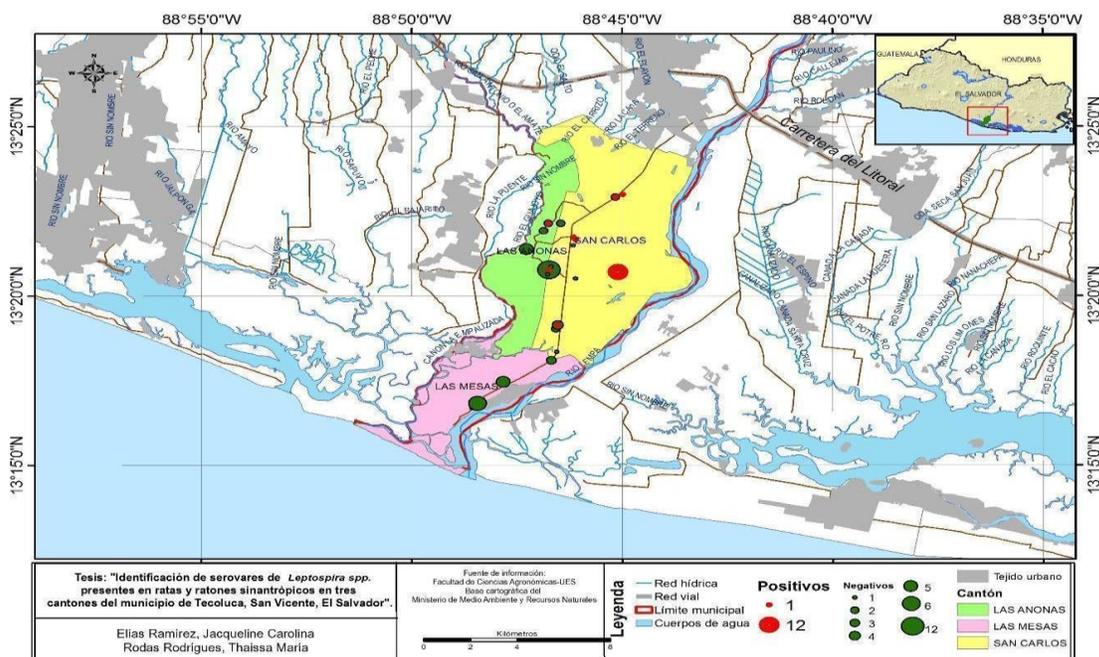


Figura A-7. Georreferenciación de roedores seropositivos y seronegativos a *Leptospira* spp. en la zona de estudio

## 5. Conclusiones

- Se detectó evidencia serológica de circulación de *Leptospira spp.* en ratas y ratones sinantrópicos (*R. rattus*, *R. norvegicus* y *M. musculus*) por primera vez en los cantones de San Carlos Lempa, Las Mesas y Las Anonas, del municipio de Tecoluca, San Vicente, El Salvador.
- Se demostró en ratas y ratones sinantrópicos en la zona en estudio, la presencia de cinco serovares: *icterohaemorrhagiae* 9.09% (8), *pyrogenes* 7.96% (7), *tarrasovi* 3.41% (3), *sejroe* 2.27% (2) y *hebdomadis* 1.14% (1).
- A pesar de que en los cantones del área de estudio se presentan condiciones ambientales similares, existen diferencias entre ellos tanto a nivel de poblaciones humanas como con respecto a la distribución de la seroprevalencia de los serovares, obteniendo una mayor seroprevalencia en el cantón de San Carlos Lempa 60.71% (17), el cual presenta todos los serovares reportados en esta investigación.
- Las ratas y ratones sinantrópicos son considerados reservorios del serovar *icterohaemorrhagiae* y hospedero del serovar *pyrogenes*, lo cual concuerda con los resultados presentados en el presente estudio.
- Con los resultados obtenidos en la presente investigación no se puede establecer el papel del roedor como uno de los principales transmisores de *Leptospira* en el área de estudio.

## 6. Recomendaciones

- Debido a las limitaciones que presenta la prueba de microaglutinación en placa en la titulación e identificación de *Leptospira* en roedores silvestres, es necesario la implementación de diferentes técnicas con mayor especificidad y sensibilidad para su diagnóstico como son: ELISA y aislamiento del agente.
- Para el diagnóstico de *Leptospira spp* en roedores silvestres, se debe de considerar un título de 1:50 como punto de corte, según lo mencionado por expertos de la OIE, ya que al considerar esta titulación se podría identificar un caso temprano de la enfermedad o un título antiguo que ha disminuido.
- Ampliar el panel del diagnóstico de la prueba MAT en la Red de Laboratorios Veterinarios de El Salvador para la detección de leptospirosis en roedores, debido a que los resultados podrían variar al añadirse otros serovares detectados en América Latina, como: *L. copenhageni*, *L. ballum*, *L. javanica* y *L. wolffi*.
- Realizar estudios que determinen el rol de otras especies animales incluyendo otros hospederos de mantenimiento como el perro, cerdo, oveja y cabra debido a su cercanía y convivencia con las otras especies estudiadas.
- Implementar campañas de educación sanitaria, dirigidas a la población local sobre los efectos nocivos de la leptospirosis en la salud humana y animal, en donde el roedor podría estar jugando un papel importante en la diseminación de la enfermedad.

## 7. Bibliografía

- Acha, P; Szyfres, B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Leptospirosis. 3 ed. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud. v. 1. p. 175-185
- Álvarez, B; Reyes, C; Orellana, M. 2017. Identificación de serovares de *Leptospira spp* en equinos mediante la prueba de aglutinación microscópica, en los cantones de San Carlos Lempa, Las Mesas y Las Anonas del municipio de Tecoluca, San Vicente, El Salvador. Tesis Br. San Salvador, SV. Universidad de El Salvador. p. 7-28
- Arango, J; Cittadino, E; Agostini, A; Mazzonelli, G; Álvarez, C; Colusi, M; Koval, A; Cabrera, A; Kravetz, F. 2001. Prevalencia de leptospirosis en *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus* en el Gran Buenos Aires, Argentina. *Ecología austral* v.11, n.1, p.25-30
- Ayala, R; Zelaya, D. 2008. Determinación de la presencia e identificación de serovares de *Leptospira* presentes en ratas y ratones de 3 mercados (mercado de mayoreo La Tiendona, Mercado Central, y Mercado Tinetti) del municipio de San Salvador. Tesis Br. San Salvador, SV. Universidad de El Salvador. p. 7-27
- Batista, CSA; Alves, CJ; Azevedo, SS; Vasconcellos, SA; Morais, ZM; Clementino, IJ; Alves, FAL; Lima, FS; Araújo Neto, JO. 2005. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in dogs from Campina Grande, State of Paraíba, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 57:179-185.
- Benacer, D; Mohd Zain, SN; Sim SZ; Mohd Khalid MK; Galloway RL; Souris M; Thong KL. 2016. Determination of *Leptospira borgpetersenii* serovar *javanica* and *Leptospira interrogans* serovar *bataviae* as the persistent *Leptospira* serovars circulating in the urban rat populations in Peninsular Malaysia. *Parasit Vectors* 9:117.
- Bharti, A; Nally, J; Ricaldi, J; Matthias, M; Diaz, M; Lovett, M; Levett, P; Gilman, R; Willig, M; Gotuzzo, E; Vinetz, J. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious diseases* 3(12):757-71.
- Cardoza, Y; Gonzales, A. 2011. Detección de *Leptospira* en ratas y ratones de las Comarcas Caraos y Cacaos alrededor de los casos positivos de Leptospirosis en humanos del municipio de Achuapa departamento de León, diciembre 2010 a marzo 2011. Tesis Br. Managua, Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-León. p. 49-56.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention, US). 2010. Leptospirosis (en línea). Washington, US. Consultado 5 mayo 2016. Disponible en: <http://www.cdc.gov/leptospirosis/>
- CFSPH (The Center for Food Security and Public Health, US). 2005. Leptospirosis (en línea). Iowa, US. Iowa State University. Consultado 3 mar. 2016. PDF. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/leptospirosis-es.pdf>
- CFSPH (The Center for Food Security and Public Health, US). 2013. Leptospirosis (en línea). Iowa, US. Iowa State University. Consultado 3 mar. 2016. PDF. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leptospirosis.pdf>

- Cosson, JF; Picardeau, M; Mielcarek, M; Tatard, C; Chaval, Y; Suputtamongkol, Y; Buchy, P; Jittapalapong, S; Herbreteau, V; Morand S. 2014. Epidemiology of *Leptospira* Transmitted by Rodents in Southeast Asia. PLOS Neglected tropical diseases 8(6):e2902.
- Céspedes, J. 2005. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. Revista peruana de medicina experimental y salud pública v.22, n.4, p.290-307
- Esfandiari, B; Nahrevanian, H; Pourshafie, MR; Gouya, M; Khaki, P; Mostafavi, E; Darvish, J; Hanifi, H. 2017. Epidemiological distribution of rodents as potent reservoirs for infectious diseases in the provinces of mazandaran, gilan and golestan, Northern Iran. Infectious Disease Reports 9(2):6900.
- Flórez, P; Arango, J; Merizalde, E; Londoño, A; Quiroz, V; Rodas, J. 2010. Evidencia serológica de circulación de *Leptospira spp* en *Rattus norvegicus* naturalmente expuestos en una zona urbana colombiana. Revista de Salud Pública 12(6):990-999.
- Forbes, B; Sahm, D; Weissfeld, A. 2009. Diagnostico Microbiologico (en línea). Argentina, AR. Consultado 25 jun. 2016. Disponible en: <https://books.google.com.sv/books?id=239cauKqSt0C&pg=PA539&dq=patogenia+leptospira+humanos+forbes&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwj72lb4jNPNAhUKph4KHfoNAK0Q6AEIGjAA#v=onepage&q=patogenia%20leptospira%20humanos%20forbes&f=false>
- Fortes-Gabriel, E; Carreira, T; Vieira, ML. 2016. First Isolates of *Leptospira spp.*, from Rodents Captured in Angola. The american journal of tropical medicine and higiene 94(5): 955-958.
- Gamarra, R. 2009. Leptospirosis (en línea). Lima, PE. SIRIVS. Consultado 3 mar. 2016. PDF. Disponible en: [http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Gamarra\\_Leptospira.pdf](http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Gamarra_Leptospira.pdf)
- Ganoza, C; Matthias, M; Collins-Richards, D; Brouwer, K; Cunningham, C; Segura, E; Gilman, R; Gotuzzo, E; Vinetz, J. 2006. Determining risk for severe Leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. Plos Medicine 3(8): e308.
- Gómez, R. 2008. Enciclopedia Bovina: Leptospirosis (en línea). 1 ed. México DF, UNAM. Consultado 3 mar. 2016. PDF. Disponible en: [http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e\\_bovina/04Leptospirosis.pdf](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/04Leptospirosis.pdf)
- Gonzales, J. 2014. *Leptospira* (diapositivas). Región del Bío-Bío, CL. 37 Diapositivas.
- González, A; Borrero, R; Ruiz, J; Batista, N; Fernández, Y; Valdés, Y; Gonzales, M. 2006. Medio EMJH modificado para el cultivo de *Leptospira interrogans* serogrupo *ballum*. Revista Argentina de Microbiología 38:61-68
- Guharay, F; 2003. Estrategia sostenible para el control de roedores (en línea). Nicaragua, NI. Consultado 25 jun. 2016. Disponible en: <https://books.google.com.sv/books?id=XNYOQAIAAJ&pg=PT12&dq=habitat+de+las+rata+s+y+ratones&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwip5-njwHNAhVFLB4KHRuZBr4Q6AEIzAA#v=onepage&q=habitat%20de%20las%20ratas%20y%20ratones&f=false>

- Jimenez-Coello, M; Ortega-Pacheco, A; Guzman-Marin, E; Guiris-Andrade, DM; Martinez-Figueroa, L; Acosta-Viana, KY. 2010. Stray Dogs as Reservoirs of the Zoonotic Agents *Leptospira interrogans*, *Trypanosoma cruzi*, and *Aspergillus spp.* in an Urban Area of Chiapas in Southern Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10(2):135-141.
- Ko AI; Reis, G; Dourado, R; WD, J; LW, R. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *The Lancet* 354(9181):820-5
- Lau, C; Watson, C; Lowry, J; David, M; Craig, S; Wynwood, S; Kama, M; Nilles, E. 2016. Human leptospirosis infection in Fiji: an eco-epidemiological approach to identifying risk factors and environmental drivers for transmission. *PLOS Neglected tropical diseases* 10(1):e0004405.
- Lau, P; Perez E; Molina, C; Fernandez-Garcia, L; Blones, J. 2003. Diseño de una trampa de caída para la captura de pequeños roedores y la comparación de su eficiencia con trampas tipo Sherman en Venezuela. *Acta Biol.* 23(4):23-30.
- Marder, G; Ruiz, R; Machuca, R; Zorzo, L; Merino, D. 2006. Detección de *Leptospiras* en riñón de roedores de la ciudad de Corrientes: estudio preliminar (en línea). Corrientes, ARG. UNNE. Consultado 11 oct. 2017. PDF. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/04-Veterinarias/2006-V-008.pdf>
- McBride, AJ; Athanazio, DA; Reis, MG; Ko, AI. 2005. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 18(5):376-86.
- Méndez, C; Benavides, L; Esquivel, A; Aldama, A; Torres, J; Gavaldon, D; Meléndez, P; Moles, L. 2013. Pesquisa serológica de *Leptospira* en roedores silvestres, bovinos, equinos y caninos en el noreste de México. *Revista de Salud Animal* v.35, n.1, p.25-32
- MINSAL (Ministerio de Salud de El Salvador, SV). 2015. Leptospirosis (en línea). El Salvador, SV. Consultado 10 mar. 2016. PDF. Disponible en: <https://www.salud.gob.sv/archivos/DEI/UEID/Leptospirosis/Leptospirosis.pdf>
- MINSAL (Ministerio de Salud de El Salvador, SV). 2016. Leptospirosis (en línea). El Salvador, SV. Consultado 10 mar. 2016. PDF. Disponible en: [http://www.salud.gob.sv/archivos/vigi\\_epide2016/depto\\_consolidado322016.pdf](http://www.salud.gob.sv/archivos/vigi_epide2016/depto_consolidado322016.pdf)
- Miranda, S. 2014. Determinación de *Leptospira interrogans* en roedores plaga en el mercado municipal de Panajachel, Sololá, Guatemala mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tesis Br. Sololá, Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. p. 52-62.
- Morales, G; Guzmán, V; Beltrán L. 1978. Leptospirosis in Colombia: isolation of *Leptospira spp.* from the kidneys of brown rats (*Rattus norvegicus*) trapped on infected piggeries. *Tropical animal health and production* 10(2):121-3.
- Odriozola, E. 2001. Leptospirosis (en línea). Consultado 3 mar. 2016. PDF. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/enfermedades\\_reproduccion/62-leptospirosis.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/62-leptospirosis.pdf)

- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal, FR). 2014. Manual terrestre: Leptospirosis (en línea). Paris, FR. Consultado 3 mar. 2016. PDF. Disponible en: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.01.12\\_Leptospirosis.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.12_Leptospirosis.pdf)
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal, FR). 2016. Historial de las notificaciones a la OIE: El Salvador (en línea). Consultado 3 mar. 2016. Disponible en: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Countryinformation/reporting/reporhistory](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/reporting/reporhistory)
- OMS (Organización Mundial de la Salud, CH). 2003. Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control (en línea). Consultado 3 mar. 2016. PDF. Disponible en: <http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/WHO-Guia-Lepto-2003-Spa.pdf>
- PAHO (Organización Panamericana de la Salud, IT). 2017. Leptospirosis (en línea). Italia, IT. Consultado 11 de oct. 2017. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=7821%3A2012-informacion-general-leptospirosis&catid=4784%3Aleptospirosis-contents&Itemid=0&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7821%3A2012-informacion-general-leptospirosis&catid=4784%3Aleptospirosis-contents&Itemid=0&lang=es)
- Pérez, J; Brescia, F; Becam, J; Mauron, C; Goarant, C. 2011. Rodent abundance dynamics and Leptospirosis carriage in an area of hyper-endemicity in New Caledonia. PLOS Neglected tropical diseases 5(10): e1361.
- Protección Civil, prevención y mitigación de desastres de Tecoluca. 2013. Plan invernol (En Línea). El Salvador. Consultado 6 mar. 2016. PDF. Disponible en: <http://proteccioncivil.gob.sv/planes-departamentales/>
- Quintanilla, E. 2016. Casos de leptospirosis. Ministerio de Agricultura y Ganadería (Comunicación personal). El Salvador.
- Richer, L; Potula, H; Melo, R; Vieira, R; Gomes-Soleck, M. 2015. A Mouse Model for Sublethal Leptospira Infection. Infection and Immunity 83(12):4693-700.
- SAG (Servicio Agrícola y Ganadero, CL). S.f. Ficha técnica: Leptospirosis (en línea). Chile. Consultado 2 mar. 2016. PDF. Disponible en: [http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/f\\_tecnica\\_leptospirosis.pdf](http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/f_tecnica_leptospirosis.pdf)
- Samir, A; Soliman, R; El-Hariri, M; Abdel-Moein, K; Hatem, ME. 2015. Leptospirosis in animals and human contacts in Egypt: broad range surveillance. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 48(3):272-7.
- Sandow, K; Ramírez, W. 2005. Leptospirosis (en línea). Revista electrónica de veterinaria v.6, n.6. Consultado 20 sep. 2017. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060605/060501.pdf>
- Santos, A. 2014. Prevalencia y serovariedades de Leptospira patógena en ratas (*Rattus norvegicus*) de rastro, por medio de las técnicas de microaglutinación e inmunohistoquímica. Tesis Br. Sinaloa, MX. Universidad Autónoma de Sinaloa. 36 p. [http://www.academia.edu/13857070/Prevalencia\\_y\\_serovariedades\\_de\\_Leptospira\\_pat%C3%B3gena\\_en\\_ratas\\_Rattus\\_norvegicus\\_de\\_rastro\\_por\\_medio\\_de\\_las\\_t%C3%A9cnicas\\_de\\_microaglutinaci%C3%B3n\\_e\\_inmunohistoqu%C3%ADmica](http://www.academia.edu/13857070/Prevalencia_y_serovariedades_de_Leptospira_pat%C3%B3gena_en_ratas_Rattus_norvegicus_de_rastro_por_medio_de_las_t%C3%A9cnicas_de_microaglutinaci%C3%B3n_e_inmunohistoqu%C3%ADmica)

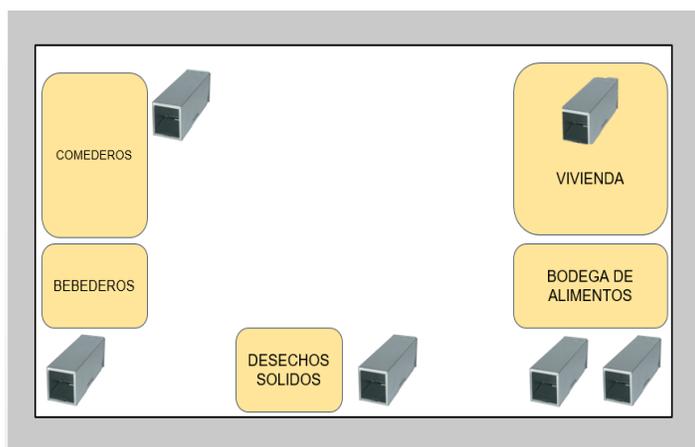
- Santos, A; Figueira, C; Reis, M; Costa, F; Ristow, P. 2015. Heterogenic colonization patterns by *Leptospira interrogans* in *Rattus norvegicus* from urban slums. Brazilian Journal of Microbiology 46(4): 1161–1164.
- Scialfa, E; Bolpe, J; Bardon, C; Ridao, G; Gentile, J; Gallicchio, O. 2010. Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil, Buenos Aires, Argentina. Revista Argentina de microbiología v.42, n.2, p.126-128
- Sepúlveda, A; Dimas, J; Rodríguez, F. 2002. La rata y el perro, importantes vectores de la leptospirosis en explotaciones pecuarias de Cd. Guzmán, Jalisco. Revista Cubana de Medicina Trópica 54(1), 21-23.
- Siuce, J. 2013. Leptospirosis (en línea). Consultado 10 mar. 2016. PDF. Disponible en: [http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo\\_siuce\\_leptospirosis.pdf](http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo_siuce_leptospirosis.pdf)
- SNET (Servicio Nacional de Estudios Territoriales). 2011. Boletines Emitidos para el 2011 (en línea). Consultado 18 de jul. 2016. Disponible en: <http://www.snet.gob.sv/ver/hidrologia/boletines+y+pronosticos/boletines/boletin+diario/?fecha=2011-10-16>
- SNET (Servicio Nacional de Estudios Territoriales). 2016. Perfiles climatológicos (en línea). Consultado 18 de jul. 2016. Disponible en: <http://www.snet.gob.sv/ver/meteorologia/clima/perfiles+climatologicos/>
- Suepaul, SM; Carrington, CV; Campbell, M; Borde, G; Adesiyun, AA. 2014. Seroepidemiology of leptospirosis in dogs and rats in Trinidad. Tropical Biomedicine 31(4):853–861.
- Trueba, G; Zapara, S; Madrid, K; Cullen, P; Haake, D. 2004. Cell aggregation: A mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. International Microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology 7(1): 35 -40.
- Tucunduva, M; Calderwood, M; Athanazio, D; McBride, A; Harts Kerrl, R; Pereira, M; Ko, A; Reis, M. 2008. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. Acta tropica 108 (1): 1-5.
- Vanasco, N; Sequeira, M; Sequeira, G; Tarabla, H. 2003. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. Preventive Veterinary Medicine 28;60(3):227-35.
- Zamora, J; Riedemann, S. 1999. Animales silvestres como reservorios de leptospirosis en Chile. Una revisión de los estudios efectuados en el país. Archivos de Medicina Veterinaria. v.31, n.2, p.151-156.

## 8. Anexos

### Anexo A-1. Especies afectadas y sus principales serovares.

Serovares	Bovino	Equino	Canino	Porcino	Ovicapriño
L. hardjo	X	X			X
L. pomona	X	X	X	X	X
L. grippotyphosa	X		X	X	X
L. canicola	X	X	X	X	
L. icterohaemorrhagiae	X	X	X	X	
L. ballum			X		X
L. bratislava			X	X	
L. tarassovi			X	X	
L. muenchen				X	
L. sejroe		X			
L. pyrogenes			X		
L. paidjan			X		

Fuente: CFSPH 2005



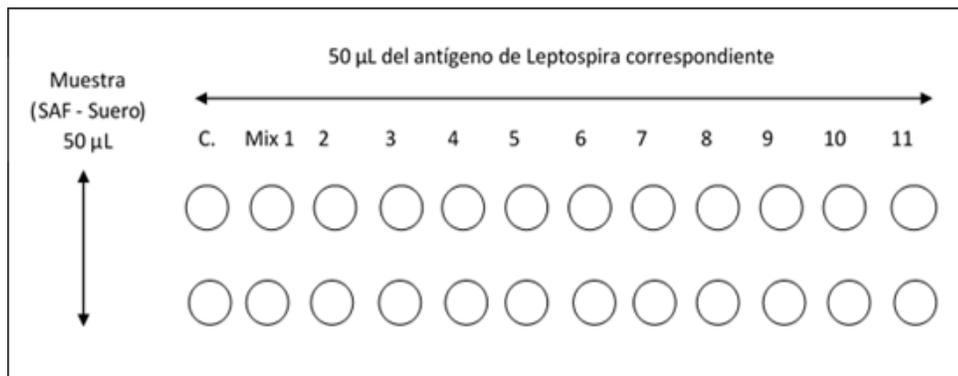
Anexo A-2. Diagrama de la ubicación de las trampas.



Anexo A-3. Trampa Sherman



**Anexo A-4.** Trampa artesanal



**Anexo A-5.** Placa de poliestireno con fondo en U.

**Anexo A-6.** Resultados de las muestras positivas a serovares de *Leptospira spp* en el cantón San Carlos Lempa

Caserío	Propietario	Latitud	Longitud	Altura	Identificación								
					Muestras	Identificación por muestra	Especie	Sexo	<i>L. hebdomadis</i>	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	<i>L. pyrogene</i> s	<i>L. serjoe</i>	<i>L. tarrasovi</i>
Caserío San Bartolo	Leonor Abarca	13.34610	88.75164	7	15	24	R.r.	H	--	Positivo	--	--	--
						33	M.m.	H	--	Positivo	--	--	--
						58	R.n.	H	--	Positivo	--	--	--
						57	R.n.	H	--	Positivo	--	--	--
						24	M.m.	H	--	--	Positivo	--	--
						9	R.n.	H	--	--	--	Positivo	--
						472806	R.r.	H	--	--	Positivo	--	--
						012806	R.r.	H	--	--	--	--	--
						222806	R.r.	H	--	--	Positivo	--	--
						412806	R.r.	H	Positivo	--	--	--	--
						602806	R.r.	H	--	--	--	--	--
						010507	M.m.	H	--	Positivo	--	--	--
						040507	M.m.	H	--	--	--	--	--
050507	R.n.	H	--	--	Positivo	--	--						
060507	R.r.	H	--	--	Positivo	--	--						
Caserío San Bartolo	Santos Alfaro	13.34282	88.76843	9	1	16	M.m.	H	--	--	--	--	--
	María del Carmen Aguilar	13.34284	88.76840	9	1	49	R.n.	M	--	--	--	--	--
Caserío San Carlos	Félix Cruz	13.8561	88.74841	12	1	53	R.r.	H	--	--	--	--	--
	María del Sid	13.38292	88.75263	14	2	3	M.m.	H	--	--	--	--	--
						490504	R.n.	H	--	--	--	--	--
	Flor Renderos	13.38415	88.74966	11	2	11	M.m.	H	--	--	--	--	--
050504						R.r.	M	--	Positivo	--	--	--	

	María Vicente	13.3829 2	88.7526 3	12	1	132806	R.r.	H	--	Positivo	--	--	--
	Ivana Orellana	13.3829 1	88.7525 0	15	2	080504	M.m.	H	--	--	--	--	Positivo
						370504	R.r.	H	--	--	--	--	--
Casero o El Coyol	Anabel Clímaco	13.3619 6	88.7684 1	11	1	46	M.m.	M	--	--	Positivo	--	--
	Adriana Mira	13.3591 9	88.7693 2	9	1	160504	R.n.	H	--	--	--	--	--
	Jovel Cornejo	13.3632 3	88.7691 8	12	1	510504	R.r.	H	--	Positivo	Positivo	--	--

**Anexo A-7.** Resultados de las muestras positivas a serovares de *Leptospira spp* en el cantón Las Anonas.

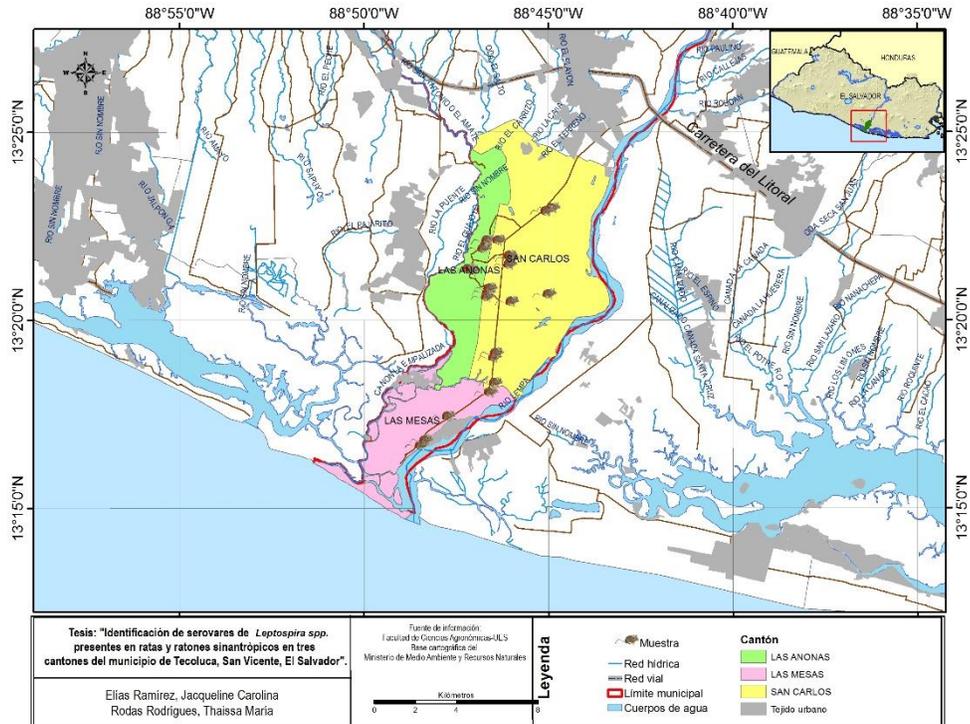
Caserío	Propietario	Latitud	Longitud	Altura	Identificación					
					Muestras	Identificación por muestra	Especie	Sexo	<i>L. sejroe</i>	<i>L. tarassovi</i>
Caserío El Porvenir	Martha Moreno	13.34715	88.77895	36	13	M593017	R.n.	M	--	--
						M473017	R.n.	M	--	--
						M313017	R.n.	M	Positivo	--
						530604	R.n.	H	--	--
						532806	R.r.	M	--	--
						542806	R.r.	M	--	--
						102806	R.r.	H	--	--
						552806	R.n.	H	--	--
						432806	R.n.	M	--	--
						110507	R.n.	M	--	--
						130507	R.n.	H	--	--
						140507	R.r.	H	--	--
						160507	R.n.	H	--	--
	Jose López	13.34486	88.77955	11	1	M453017	R.r.	H	--	--
	Miguel Maravilla	13.35648	88.78612	29	1	590604	M.m.	M	--	--
	María Castillo	13.34865	88.77824	31	1	560704	R.n.	H	--	--
	Susana Méndez	13.36992	88.77921	29	2	330704	M.m.	H	--	--
031801						R.n.	H	--	--	
Glenda Palacios	13.35729	88.78786	26	5	091801	M.m.	H	--	--	
					251801	M.m.	H	--	--	
					101801	M.m.	H	--	--	
					561801	M.m.	H	--	--	
					241801	M.m.	H	--	--	
Juan Panameño	13.36991	88.77917	15	2	331801	R.n.	M	--	Positivo	

						421801	R.r.	M	--	--
	Isabel Henríquez	13.36631	88.78104	26	2	601801	R.r.	H	--	--
						131801	R.n.	H	--	--

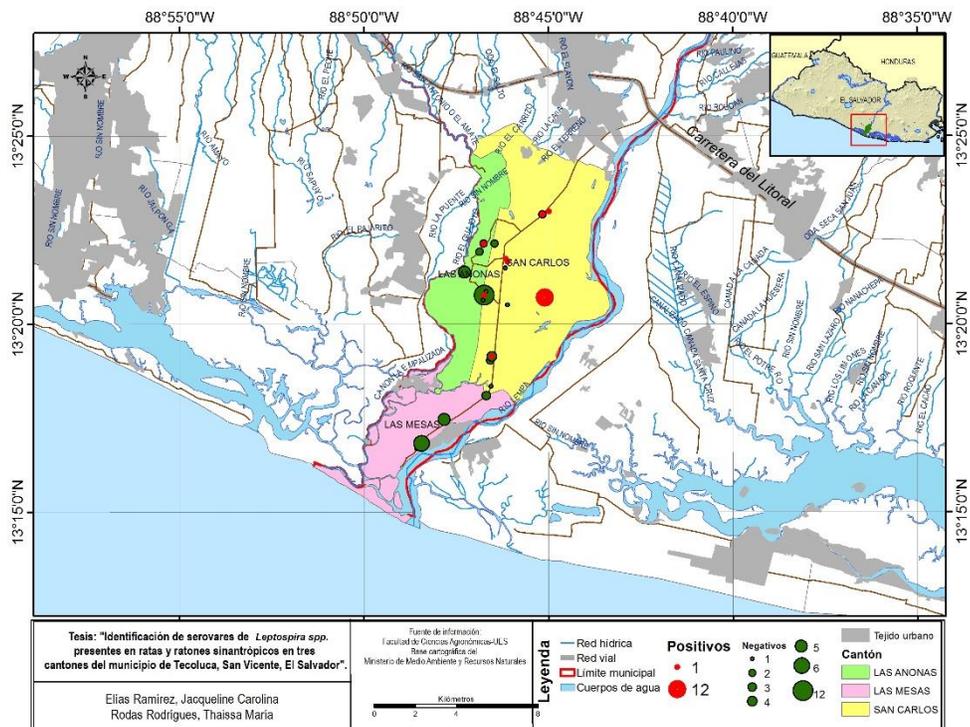
**Anexo A-8.** Resultados de las muestras positivas a serovares de *Leptospira spp* en el cantón Las Mesas.

Caserío	Propietario	Latitud	Longitud	Altura	Identificación				
					Muestras	Identificación por muestra	Especie	Sexo	<i>L. tarassovi</i>
Caserío La Pita	Marta Alicia Abarca	13.27913	88.80948	5	1	48	M.m	H	--
	Jorge Elias	13.29203	88.79723	19	5	402806	R.n.	H	--
						332806	R.n.	H	--
						090507	R.r.	H	--
						100507	R.r.	M	--
150507	R.n.	M	--						
Caserío Los Naranjos	Ana Cecilia Cornejo	13.36992	88.77921	10	1	090617	M.m	H	--
	Dina Elizabeth Martínez	13.30263	88.77810	20	2	540617	M.m	H	--
						610617	R.r.	H.	--
	Marielos Reyes	13.30263	88.77810	20	3	750617	R.r.	H	--
						770617	M.m	H	--
190617						R.n.	H	--	
Caserío San Antonio	Yesenia Morataya	13.32001	88.77557	1	1	050617	R.n.	H	--
	Carlos Morataya	13.36992	88.77921	1	2	110617	R.r.	H	--
						180617	M.m	M	--
	Pedro Garcia	13.36992	88.77425	2	2	670617	R.r.	H	--
						740617	R.n.	H	--
Lucia Ambros	13.31817	88.77637	5	2	830617	R.n.	H	--	
					650617	M.m	H	--	
Caserío Santa Marta	Sarai Pineda	13.31999	88.77551	8	3	760617	M.m	H	--
						810617	M.m	H	Positiva
						080517	R.r.	H	--
Gregorio Ayala	13.30679	88.77591	8	8	1	630617	M.m	H	--

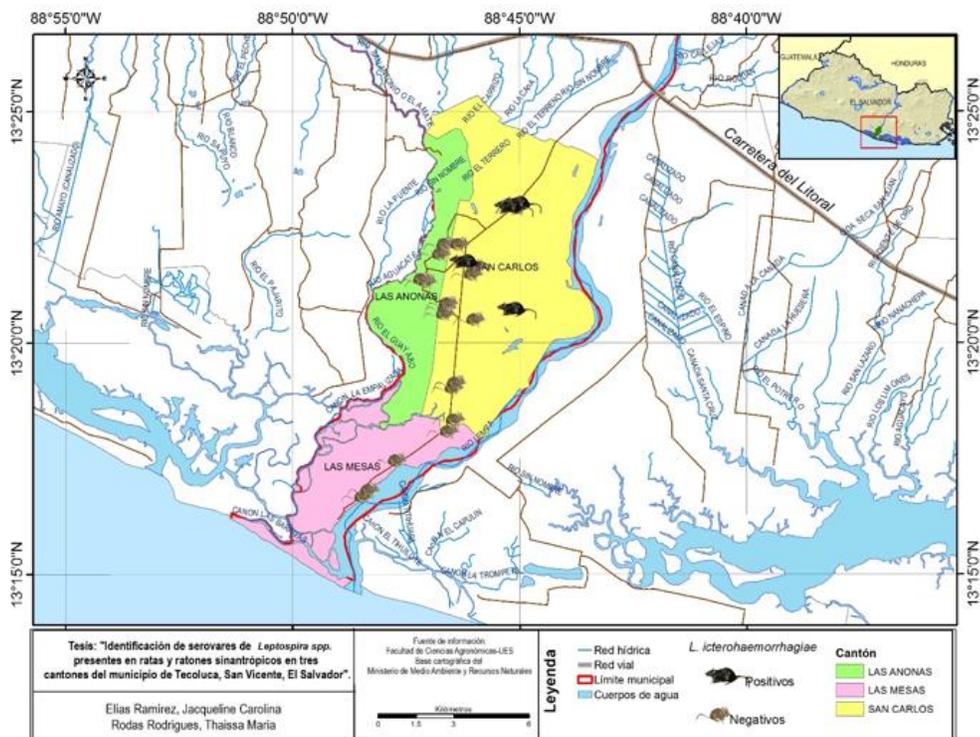
	Daniela Flores	13.31999	88.77551	9	4	710617	R.n.	M	--
						690617	R.r.	H	--
						730617	R.r.	M	--
						720617	M.m	H	--
	Héctor Constanza	13.28144	88.80732	33	6	870617	R.n.	H	--
						890617	R.n.	H	--
						450617	R.r.	H	--
						490617	R.r.	M	--
						440617	R.r.	H	--
						70507	R.n.	H	--



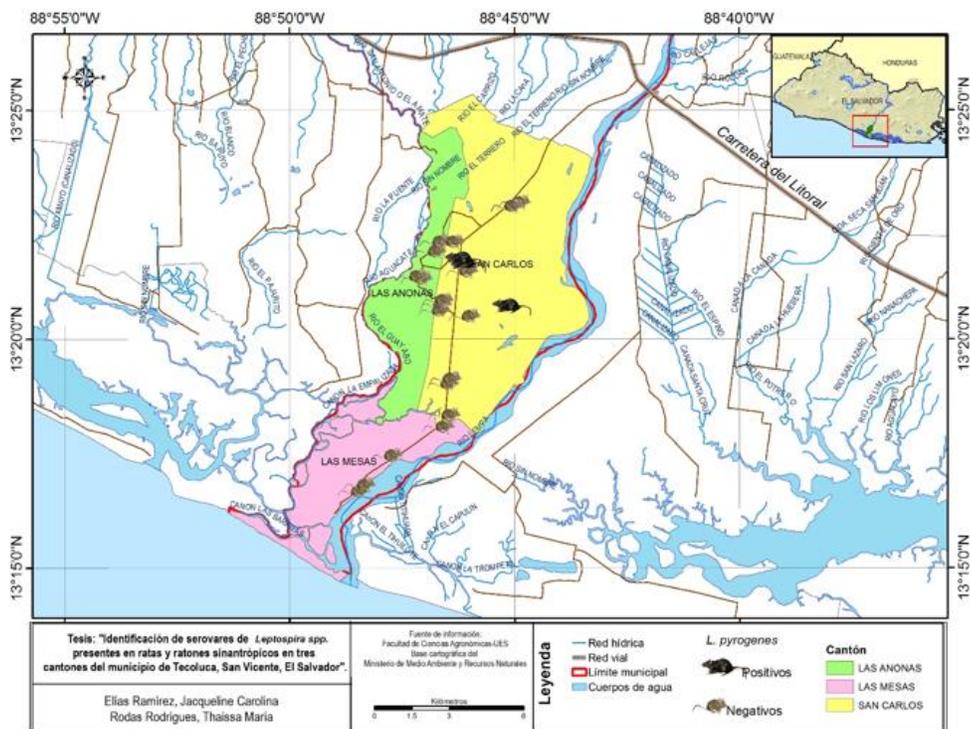
Anexo A-9. Georreferenciación de las muestras analizadas en el estudio.



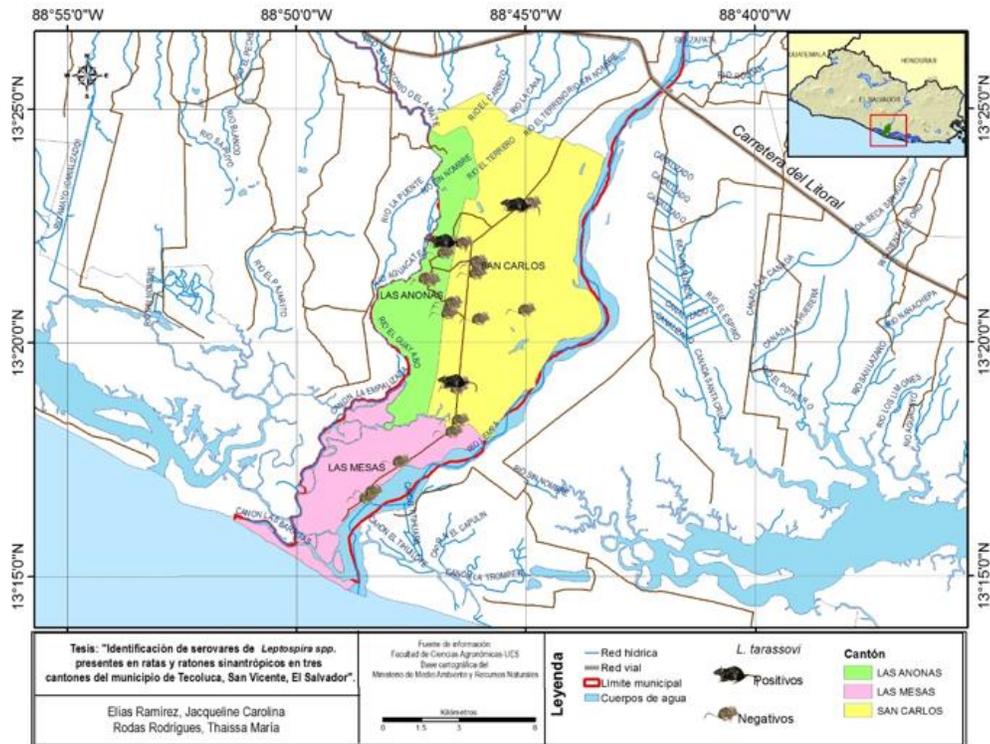
Anexo A-10. Georreferenciación de roedores positivos y negativos a *Leptospira spp.* en la zona de estudio



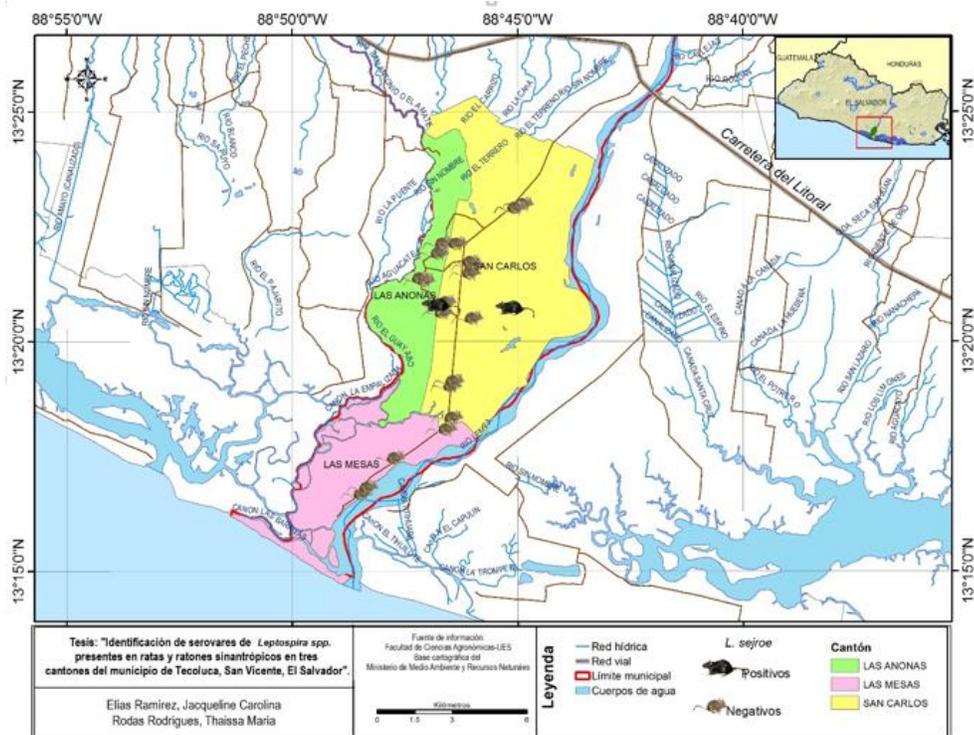
Anexo A-11. Casos de *L. icterohaemorrhagiae* en los cantones en estudio.



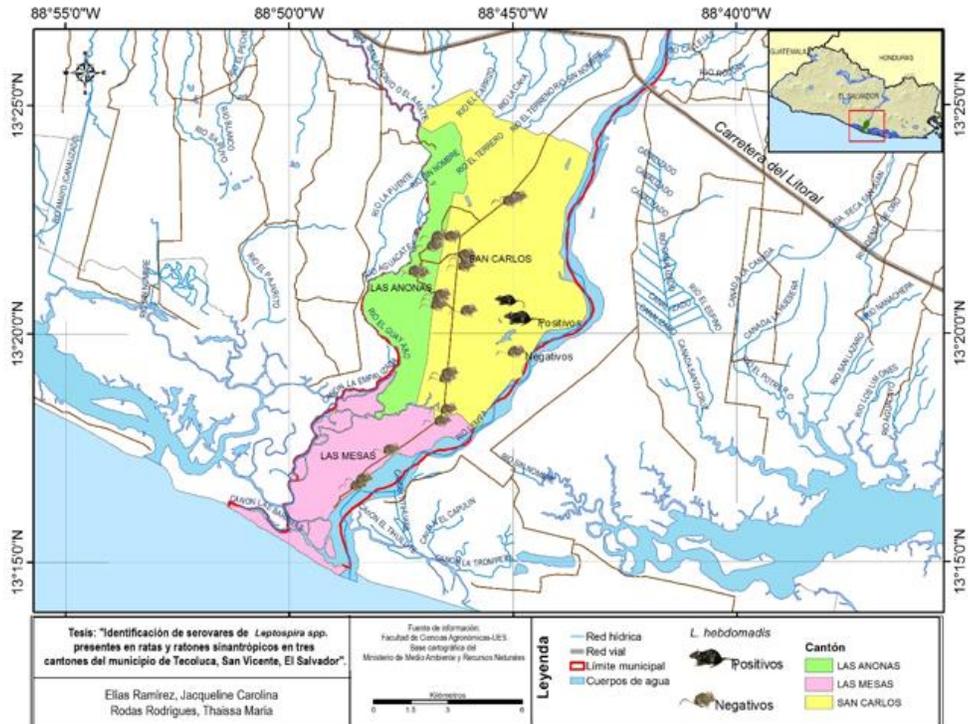
Anexo A-12. Casos de *L. pyrogenes* en los cantones en estudio.



**Anexo A-13.** Casos de *L. tarassovi* en los cantones en estudio.



**Anexo A-14.** Casos de *L. sejroe* en los cantones en estudio.



Anexo A-15. Casos de *L. hebdomadis* en los cantones en estudio.