

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**Procedimientos Comparativos de Diagnostico para
Leptospirosis en Animales Domésticos**

POR

Oscar Quintero Cortes

MONOGRAFÍA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

NOVIEMBRE 2011

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**Procedimientos Comparativos de Diagnostico para
Leptospirosis en Animales Domésticos**

**POR
Oscar Quintero Cortes**

MONOGRAFÍA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TITULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR:

MVZ. MC. FRANCISCO J CARRILLO MORALES

CO ASESOR:

MVZ. JOSE VICTOR SANCHEZ MIJARES

TORREÓN, COAHUILA

NOVIEMBRE 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

**ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**Procedimientos Comparativos de Diagnostico para
Leptospirosis en Animales Domésticos**

MONOGRAFÍA

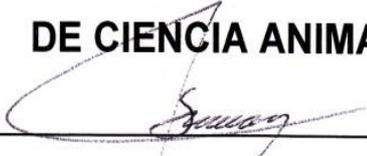
Aprobada por el

PRESIDENTE DEL JURADO

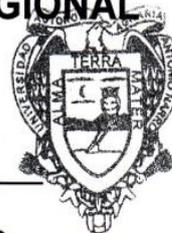


MVZ. FRANCISCO J. CARRILLO MORALES

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL**



MVZ. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO



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

TORREÓN, COAHUILA

NOVIEMBRE 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

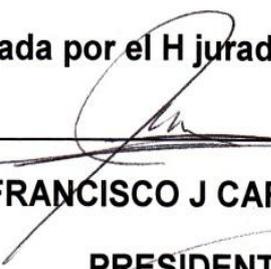
**ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



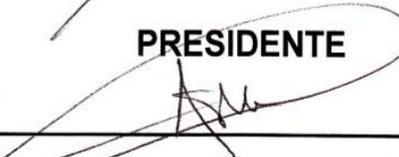
**Procedimientos Comparativos de Diagnostico para
Leptospirosis en Animales Domésticos
MONOGRAFÍA**

Aprobada por el H jurado examinador



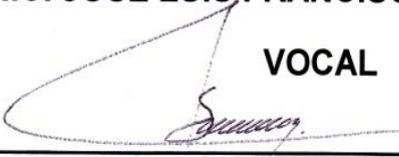
MVZ. MC. FRANCISCO J CARRILLO MORALES

PRESIDENTE



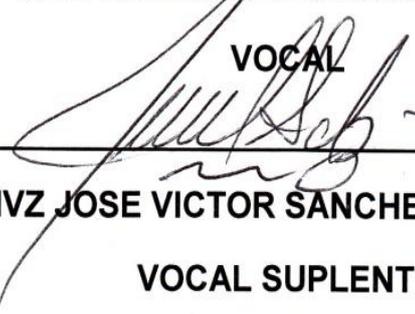
MVZ. MC. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS

VOCAL



MVZ RODRIGO I. SIMÓN ALONSO

VOCAL



MVZ JOSE VICTOR SANCHEZ MIJARES

VOCAL SUPLENTE

TORREÓN, COAHUILA

NOVIEMBRE 2011

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por brindarme la oportunidad de tener esta vida, y haberme me puesto en mi vida la posibilidad de seguir estudiando, y por poner en mi vida satisfacciones, ilusiones y desilusiones por todos eso GRACIAS SEÑOR.

Ala Sra. Daria Cortes Sánchez mi madre que me supo guiar sola en el camino de la vida y que gracias a ella tuve la oportunidad de seguir estudiando, a pesar de todos los problemas económicos que tenia mi familia por todo eso muchas gracias mama. Al Sr. Vicente Cortes Salas en paz descanse mi abuelito que fue como un padre para mi que siempre me cuidó y que me enseñó una de sus principales cualidades el saber trabajar gracias PAPA donde quiera que estés te llevare siempre en mi corazón. Ala Sra. Irene Sánchez Rosas mi abuelita que cuando no estaba mi mama en casa siempre me consintió y porque siempre me hacia mi comida favorita y porque me apoyo mucho gracias.

Al Sr. Moisés Quintero González mi papa que a pesar de que no estuvo conmigo en toda mi vida en la etapa de la universidad jugó un papel importante lo económico ya que con su aportación no pase hambres y pude terminar mis estudios gracias.

A mi asesor el MVZ. Francisco Javier Carrillo Morales que conté siempre con su apoyo incondicional y que me corrigió y que me asesoro en la realización de esta monografía gracias.

DEDICATORIA

Primeramente a mi madre que me apoyo, y después a mi esposa que ha estado conmigo incondicionalmente que siempre me supo entender y que siempre me echo la mano cuando se trataba de la escuela TE AMO KARLA TAMARA CALDERA FRANCO eres mi mayor inspiración y te agradezco todo lo que hiciste por mi gracias.

Se las dedico también a todos mis amigos de la universidad como Rigoberto López José (el máster), Elio Mauricio Melgar Ramos (el coita), Juan de Dios Hernández López, Iván Moreno Bautista (la grinchuda), Andrés Sánchez Hernández (la pancha), José Alfredo Sandoval Luna. Y en especial a un medico que siempre me aconsejo al MVZ. Edgar Osiris Sandoval Pliego gracias carnal.

RESUMEN.

Procedimientos Comparativos de Diagnostico para Leptospirosis en Animales Domésticos

La Leptospirosis es una enfermedad infecciosa, causada por bacterias espiroquetas, del genero leptospira, y que se transmite generalmente por contacto directo con animales domésticos infectados o por contacto indirecto a través de aguas contaminadas por la orina de los animales.

La Leptospirosis es una zoonosis de amplia distribución mundial, de gran importancia en la medicina tanto humana como veterinaria dada la manera en que afecta la salud del hombre y de los animales. Causada por una espiroqueta del genero Leptospira, cuyas especies, interrogans y borgpetersenii, entre otras, son patógenas para el ser humano y los animales y biflexa, que es saprofita y se localiza en la superficie del suelo y el agua.

Los animales domésticos mas afectados son los perros, vacas, cerdos y caballos. Actuando las ratas y ratones como reservorios primarios. En los roedores se produce una infección renal crónica, con excreción grandes cantidades de bacterias en la orina. Las bacterias generalmente mueren al estar expuestas al calor, la luz, detergentes, o desinfectantes, pero pueden permanecer viables en aguas alcalinas o en suelo húmedo.

Para la investigación de este presente trabajo nos basaremos en la especie bovina, lo cual nos interesara el daño renal como es una nefritis intersticial lo cual es una inflamación del riñón la cual esta causada por la bacteria y las toxinas que estas liberan.

Wharthin-starry es una técnica de tinción de nitrato de plata utilizadas en histología. Se introdujo por primera vez en 1920 por patólogos Americanos Aldred Wharthin y Allen S. C. utilizada para la detección de espiroquetas. Se ha considerado la mejor prueba para le detección de espiroquetas.

La tinción con plata es el uso de plata para modificar selectivamente el aspecto del objetivo.

Los organismos de leptospira pueden demostrarse en los túbulos renales de los animales con infección en los riñones. La digestión de la pepsina se puede utilizar para mejorar el acceso de inmunofluorescencia o manchas inmuno oro a los antígenos de leptospira. La aplicación de la tinción inmunohistoquímica para abortar tejido fetal es posible, pero puede verse obstaculizada por los cambios auto líticos.

Palabras clave: Leptospira, Diagnóstico, Técnica, Wharthin-Starry, Incidencia.

INDICE.

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	II
RESUMEN.....	III
1. Introducción.....	10
1.1Objetivos.....	11
1.2. Sinonimias.....	12
1.3. Definición.....	12
2. Revisión de literatura.....	12
3. Etiología.....	12
3.1Clasificación Serológica.....	13
3.2Clasificación Genotípica.....	14
3.3Resistencia del agente etiológico.....	18
3.4Métodos de cultivo.....	19
3.5Reservorios.....	20
4. Microbiología.....	21
5. Epidemiología.....	22
5.1Fuentes de infección.....	23
6. Patogenia.....	24
6.1Formas de presentación.....	26
6.1.1 Sobreaguda.....	26
6.1.2 Aguda.....	26
6.1.3 Subaguda.....	26
6.1.4 Forma crónica.....	27
7. Lesiones anatomopatológicas.....	27

8. Antecedentes.....	28
9. Diagnostico.....	34
9.1Técnicas indirectas.....	34
9.1.1MAT.....	34
9.1.2Prueba de aglutinación microscópica con antígeno muerto (MSAT).....	35
9.1.3Fijación de complemento.....	35
9.1.4ELISA.....	36
9.1.5Aglutinación microscópica.....	36
9.2Técnicas directas.....	36
9.2.1 Observación en microscopio de campo oscuro.....	36
9.2.2Wharthin starry.....	37
10. Técnica de whathin starry.....	37
11. Literatura Citada.....	39

1. INTRODUCCION

La primera descripción de la enfermedad la presentó el Dr. Adolfo Weil, en 1886, en Alemania, en cuatro pacientes humanos con la enfermedad febril acompañada de trastornos renales, inflamación de hígado y bazo e ictericia generalizada. Golmilch (1887) la refiere como “enfermedad de Weil” cuando se presenta en un paciente con cuadro icterico; sin embargo, el agente causal fue descubierto por Inada e Ido en Japón, en 1914, donde lo reportaron como una “espiroqueta” (Blood; 1996).

En 1917, el investigador japonés Hideo Noguchi, logro aislar la bacteria a partir de ratas silvestre capturadas en Japón, Bélgica y Estados Unidos, proponiendo la creación del genero *Leptospira* (Faine et al: 1999).

En 1918, Noguchi, en el puerto de Guayaquil, Ecuador, al realizar investigaciones sobre la fiebre amarilla descubrió en la sangre de los enfermos una espiroqueta que llamo *leptospira icteroides*. En diciembre de 1919 se traslada a Mérida Yucatán, y describe el primer caso de *Leptospirosis* en México. En la península de Yucatán, en 1984 zalava et al; reportan seropositividad en os humanos de 14.1%, porcinos en 23.3% y bovinos en 11.3% (Cottral, 1986; Faine et al; 1999)

La *Leptospirosis* era reconocida como un peligro para los que se ocupaban de cosechar arroz en antigua china (faine, 1994), y los japoneses la nombraban *akiyami* o fiebre de otoño, persistente aun en la medicina moderna. En estudios retrospectivos, la descripción clara de *leptospira icterica* pudo ser reconocida antes del siglo 19, algunos años antes de la descripción por Weil (Faine, 1994). Se ha sugerido que la serovariedad *icterohemorragica* de la *leptospira interrogans* fue introducida accidentalmente a Europa en el siglo 18 y se extendió hacia el oeste de Europa y Asia por ratas *Rattus norvegicus* (Allent et al; 1999).

Independientemente la etiología de *Leptospirosis*, se demuestra en Japón y Alemania en 1915 (Everard, 1996). En Japón, se detectaron espiroquetas y anticuerpos específicos en 1915 en sangre de mineros japoneses con ictericia infecciosa, y dos grupos ambos alemanes estudiaron a

soldados preocupados por la “Enfermedad Francesa” en las trincheras del noroeste de Francia. Uhlenhuth y Fromme (Taylor et al; 1991) y Huberner y Reiter (Isogai, 1997) detectaron espiroquetas en sangre de cuyos inoculados con sangre de soldados infectados. Desafortunadamente estos dos grupos entraron en controversia y las primeras publicaciones las tuvieron por casi 8 meses (Everard, 1996). La confirmación de la presencia de Leptospirosis en ambos lados del frente occidental fue obtenida rápidamente después del trabajo publicado en Europa y la India (Stokes et al; 1987).

La importancia que ocupa como factor del riesgo fue reconocida tempranamente. El papel de la rata como fuente de infección para el humano fue descubierta en 1917 (Ido et al; 1987), mientras que la potencia de la enfermedad por leptospira en perros fue reconocida, pero la distinción clara entre la infección en caminos con *L. interrogans* serovariedades icterohemorrágica y canicola tomo varios años (Klarenbeek y Schuffner, 1983). La Leptospirosis en ganado fue reconocida algunos años después (Altson y Broom 1988). Varias monografías proporcionan información temprana y extensa para conocer el desarrollo de la Leptospirosis (Altson y Broom 1988; Faine 1994; Faine et al; 1999).

1.1 Objetivos:

- Conocer cuales son las principales pruebas de identificación para Leptospirosis bovina, a si como cuales nos pueden ser útiles para la identificación de los daños renales de la leptospira en los bovinos.
- Saber en que consiste la técnica de Wharthin-Starry para poder identificar las leptospira en las muestras de tejido de riñón.

1.2 SINONIMIAS

La Leptospirosis se conoce por otros nombres como:

Enfermedad de Weil (*L. icterohaemorrhagiae*); fiebre de los arrozales (*L. bataviae*); enfermedades de las henificadoras; enfermedad de los porqueros (*L. Pomona*); enfermedad de los manipuladores de los pescados; ictericia enzootica; enfermedad de Stuttgart (*L. canicola* en Europa); ictericia hemorrágica; ictericia infecciosa; tifus canino; agua roja; fiebre otoñal japonesa;

ente otras mas (Bal A. E. et al, 1994). Todas estas denominaciones han sido utilizadas para describir la enfermedad producida por leptospiras según sus características epidemiológicas, clínicas, territoriales, especies afectadas, estacionalidad, etc.

1.3 DEFINICION

La Leptospirosis es una zoonosis. En el ganado se presenta en forma subclínica en la mayoría de los casos, solo se sospecha en presencia de abortos, puede causar infertilidad, nacimiento de crías débiles, nefritis intestinal, anemia hemolítica y mastitis.

2. REVISION DE LITERATURA

3. ETIOLOGIA

El término leptospira proviene del griego LEPTO (fino) y SPIRA (espiral).

La leptospira presenta la siguiente clasificación taxonómica. (Laguna, 2000)

DIVISION: Procariotas

CLASE: Schizomicetes

ORDEN: Spirochaetales

FAMILIA: Leptospiraceae

GENERO: Leptospira

ESPECIE: L: interrogans, L: biflexa.

Las leptospiras son bacterias aeróbicas o microaerofilicas, los organismos tienen forma de espiral, muy finos, de 5 a 18 μm de longitud y de 0.1 a 0.2 μm de ancho. (Acosta et al., 1994)

Las leptospira son Gram negativas; no se tiñen bien con la tinción convencional de Gram, pero son fácilmente visibles con tinciones de anticuerpos fluorescentes (FA) de preparados tisulares o sedimento urinario, la tinción de plata de Wharthin-Starry o tinción de tejidos fijados en

inmunohistoquímica. Su morfología microscópica es en espiral a menudo con ganchos visibles en cada extremo de la célula bacteriana (Acosta et al., 1994).

Forman un gancho aerobio que se ha diferenciado de otras patógenas, pudiéndose cultivar en medios artificiales. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C y tienen de 7 a 10 días para crear una nueva generación de colonias aisladas, son difíciles de cultivar mediante cultivos *in vitro* (Mc Donough.2001).

MORBILIDAD

Puede exceder al 75% en animales adultos y en jóvenes suele ser del 100%.

MORTALIDAD

Puede variar por diversas circunstancias pero suele ser de 5 al 15%.

PERIODO DE INCUBACION

Varía entre 2 y 20 días, siendo el habitual entre 7 días.

3.1 Clasificación serológica

Desde antes de 1989 el género de leptospira estaba dividido en dos especies *interrogans* y *L. biflexa*. Todas las leptospiras patógenas fueron clasificadas como una especie, *L. interrogans*; las serovariedades de vida libre no patógenas fueron incluidas en la especie *L. biflexa* (Acosta et al., 1994). *L. biflexa* era diferenciada de *L. interrogans* por que crecía por debajo de los 13 °C y su desarrollo en presencia de 8-azaguanina (225ug/ml) y por la imposibilidad de *L. biflexa* de forma células esféricas en 1 M de NaCl. Ambas *L. interrogans* y *L. biflexa* fueron divididas en numerosas serovariedades definidas por aglutinación cruzada después de absorción con antígenos homólogos (Kmety y Dikken, 1983). Mas de 60 serovariedades de *L. biflexa* han sido registradas (Johnson y Faine, 1994). Dentro de las especies de *L. interrogans* son reconocidas más de 200 serovariedades. Las serovariedades que se relacionan antigénicamente se han agrupado tradicional mente en Serogrupos (Kmety y Dikken, 1983). Mientras que los Serogrupos no tienen una situación taxonómica, ha sido útil para comprensión epidemiológica.

3.2 Clasificación genotípica

La clasificación fenotípica de leptospiras ha sido sustituida por un genotípico, el cual incluye todos los números de genomoespecies de ambas serovariedades *L. interrogans* y *L. biflexa* y la heterogeneidad genética fue demostrada hace algún tiempo (Bréenle et al., 1994), y estudios sobre hibridación de DNA llevaron a la deficiencia de 10 genomoespecies de leptospira (Yasuda et al., 1997). Genomoespecies adicionales como *L. Kirschneri* fueron agregadas después (Ramadas et al. 1992). Después de extensivos estudios de diferentes variedades, trabajadores del centro de control de enfermedades, definieron 16 genomoespecies de leptospiras, que incluyen a las descritas anteriormente (Yasuda et al., 1997) y agregaron cinco genomoespecies (Brenner et al., 1999) una que nombraron *L. Alexander*, *L. Fainie*. Estudios de hibridación de DNA también han confirmado el estado taxonómico mono específico del género *Leptospira* (Letocard et al., 1999; Pos tic et al., 2000).

Las genomoespecies de leptospira que no corresponden a grupos anteriores (*L. interrogans* y *L. biflexa*) y de hecho, en serovariedades patógenas y no patógenas hay especies iguales. Así ni Serogrupos ni serovariedades, predicen las especies de leptospira de manera confiable.

Especies	Serogrupos**
L. interrogans	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Grippotyphosa, Djasiman, Hebdomadis, Sejroe, Bataviae, Ranarum, Louisiana, Mini, Sarmin.
<i>L. noguchii</i>	Shermani, Hebdomadis, Tarasovi, Pyrogenes, Autumnalis, Bataviae, Mini, Grippotyphomosa, Sejroe, Pomona, Javanica, Sarmin, Cynopteri.
<i>L. mayeri</i>	Ranarum, Semaranga, Sejroe, Mini,

	Javanica.
L. wolbachii***	Codice.
L. biflexa***	Semarang, Andamana.
L. fainei	Hursbritge.
L. borgpetersenii	Javanica, Ballum, Habdomadis, Sejroe, Tarasivi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis.
L. krischneri	Grippotyphomosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, Canicola, Icterohaemorrhagiae, bataviae.
L. weillii	Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Mini, Tarasovi, Hebdomadis, Pyrogenes, Manaho, Sejroe.
L. inadai	Lime, Sermani; Icterohaemorrhagiae, Tarasovi, Manhao, Canicola, Panam, Javanica.
L. parva***	Turneria.
L.alexanderi	Manhao, Hebdomadis, Javanica, Mini.

Por otra parte, estudios recientes (Feresu et al., 1999; Brenner et al; 1999) incluyen múltiples cepas de algunas serovariedades y demuestran la heterogeneidad genética dentro de las serovariedades. Además, los métodos usados anteriormente para distinguir las características fenotípicas en el sentido estricto de L. interrogans de L. biflexia no mostraban diferencias entre genomoespecies (Brenner et al; 1999).

Serogrupos asociados con genomoespecies

Serogrupos	Genomoespecies
------------	----------------

Andamana	L. biflexa.
Australis	L. interrogans, L. noguchii, L. borgpetersenii, L. Kirschneri.
Autumnalis	L. interrogans, L. noguchii, L. santerosai, L. borgpetersenii, L. kischneri.
Ballum	L. borgpetersenii.
Bataviae	L. interrogans, L. noguchi, L. santarosai, L. Borgpetersenii, L. kirschneri.
Canicola	L. interrogans, l. inadai, L. kirschneri.
Celledoni	L. weilli, L. borgpetersenii
Codice	L. wolbachii
Cynopteri	L. santarosai, L. kirschneri.
Djasiman	L. interrogans, L. noguchii. L.kirschneri.
Grippotyphomosa	L. interrogans L. santarosai, L.krischneri.
Hebdomadis	L. interrogans, L. weilli, L. santarosai, L. borgpetersenii, L. krischneri, L. alexanderi.
Hurtsbridge	L. fainei.
Icterohaemorrhagiae	L. interrogans, L. weilii, L. inadai, L. kischneri
Javanica	L. weilii, L. santarosai, L. borgpetersenii, L. meyeri, L. inadai, L. alexanderi.
Louisiana	L. interrogans, L. noguchii
Lyme	L. inadai.
Monhao	L. weilii, L. inadai, l. alexanderi.
Mini	L. interrogans, L. weilii, L. santarosai, L. borgpetersenii,

	L. meyeri, L. alexanderi.
Panama	L. noguchi, L. inadai.
Pomona	L. interrogans, L. noguchi, L. santarisai, L. krischneri.
Pyrogenes	L. interrogans, L. noguchi, L. weilii, L. santarosai, L. Borgpetersenii.
Ranarum	L. interrogans, L. meyeri.
Sarmin	L. interrogans, l. weilii, L. santarosai.
Sejroe	L. interrogans, l. weilii, L. santarosai, l. borgpeterseni, L. meyeri.
Semaranga	L. meyeri, L. biflexa.
Shermani	L. noguchi, L. santarosai, L. inadai.
Tarasovi	L. noguchi, L. weilii, L. santarosai, L. borgpetersenii, L. Inadai.

Serovares de leptospira asociadas con diferentes especies

Serovar	Especies
Bataviae	L. interrogans, L. santarosai.
Bulgarica	L. interrogans, L. krischneri.
Grippotyphosa	L. Irischneri, L. interrogans
Hardjo	L. borgpetersenii, L. interrogans, L. meyeri.
Icterohaemorrhagiae	L. interrogans, L. inadai.
Kremastos	L. interrogans, L. santarosai.
Mwogolo	L. krischneri, L. interrogans.
Paidjan	L. krischneri, L. interrogans.
Pomona	L. interrogans, L. noguchii.
Pyrogenes	L. interrogans, L. santarosai.
Szwajizak	L. interrogans, L. santarosai.
Valbuzzi	L. interrogans, L. krischneri.

3.3 RESISTENCIA DEL AGENTE ETIOLOGICO

Las leptospiras son microorganismos que sus supervivencias dependen ampliamente sobre variaciones del pH del suelo y las condiciones ambientales ya sea temperatura o humedad relativa (Brenner et al; 1999).

Son muy sensibles a la desecación, luz solar directa, pH ácido y alcalino ya que un pH menor que 6 o mayor que 8 tiene carácter inhibitorio sobre el microorganismo. Una temperatura menor que 13°C o mayor que 35°C provoca la muerte rápidamente (Yasuda et al., 1997).

Son sensibles a la solución hipertónica de sal común, bilis, putrefacción y a la mayoría de los antibióticos in vitro o in vivo como la penicilina, estreptomicina, aureomicina y los grupos macrolidos (Brenner et al; 1999).

Para la supervivencia en el medio ambiente necesita una humedad alta del suelo, una temperatura de 25°C, con agua de un pH neutro o ligeramente alcalino y la presencia de materia orgánica. En agua estéril puede vivir hasta 183 días y en suelo seco 30 minutos (Yasuda et al., 1997).

Las leptospiras son resistentes al ácido nalidixico. Se ha demostrado que las leptospiras pueden sobrevivir: 9 días en músculo, 13 días en los riñones, 12 días en el hígado, y 8 días en el bazo luego la muerte del animal (Bal A. E. et al, 1994).

3.4. Métodos de cultivo

El crecimiento de las leptospiras en los medios de comunicación que contienen polisorbato y suero o albúmina y de proteínas libres de materiales sintéticos ha descrito (Turner, 1970).

El medio más utilizado en los actuales la práctica se basa en la EMJH medio ácido oleico-albúmina (Johnson y Harris, 1967, Ellinghausen y McCullough, 1965). Este medio se encuentra comercialmente disponible de varios fabricantes y contiene Tween 80 y albúmina de suero bovino. Algunas cepas son más exigentes y requieren la adición de cualquiera de piruvato (Johnson et al, 1973) o suero de conejo (Ellis et al, 1976).

Crecimiento de las leptospiras a menudo es lento en el aislamiento primario, y las culturas se conservan hasta por 13 semanas antes de ser desechados, pero subculturas puro en medios líquidos por lo general crecen en 10 a 14 días. Agar se puede añadir a bajas concentraciones (0,1 a 0,2%). En medios semisólidos, el crecimiento alcanza una densidad máxima en un discreto zona por debajo de la superficie del medio, que se convierte cada vez más turbia a medida que avanza la incubación. Este crecimiento está relacionado con el óptimo la tensión de oxígeno (Faine et al 1999) Y es conocido como un anillo o disco Dinger.

Las muestras para el cultivo deben de ser múltiples y tomadas según el estadio de la enfermedad; en la primera semana, de la sangre y de LCR, y de la segunda semana en adelante, de orina. La leptospira puede permanecer en la orina hasta 11 meses después de iniciada la enfermedad. Las muestras se deben de inocular en medios de cultivos semisólidos, como el medio de Fletcher enriquecido con suero de conejo (Acosta et al., 1994).

Existen otros medios recientes desarrollados, útiles en el aislamiento de leptospira: medio EMJH (Ellinghausen y Mecullough, modificado por Johnson y Harries) y el medio Tween 80-albumina, este ultimo considerado el mejor (Acosta et al., 1994).

Como el cultivo tiene el inconveniente de ser muy largo (5-6 semanas de incubación), no se debe de considerar para definir una conducta terapéutica inicial. Hace poco se describió un método radiométrico rápido que utiliza el sistema BATEC-460; con este sistema la Leptospirosis se puede demostrar en sangre a partir de los 2 a 5 días de enfermedad (Acosta et al., 1994).

En el caso de los animales es similar. El cultivo antemortem de fluidos corporales (orina, sangre, humor acuoso) y el cultivo de tejidos posmortem (riñon, hígado, feto, placenta) no es practico debido a lo engorroso de la enfermedad y la dificultad de encontrar el transporte correcto. Pero si se logra se puede asociar a la histopatología, que cuenta con tinciones especiales, por ejemplo, tinción de plata de Wharthin-Starry o por inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos monoclonales. Los cortes deben ser realizados en

secciones fijadas en formalina de tejido renal, hepático y feto/placentario (McDonough, 2001).

3.5 Reservorios

Los principales reservorios de la leptospira en ambiente urbano son los perros y las ratas, a si como en los bovinos, porcinos y equinos en el campo. La Leptospirosis se adapto a “huéspedes reservorios primarios”, los cuales comúnmente son animales salvajes. Estas mismas especies de Leptospira también se presentan en casi cualquier otro huésped mamífero como “huésped reservorio incidentales o accidentes” (McDonough, 2001).

El perro es reservorio primario para la *L. canicola* y la *L. bataviae*. Los perros, además, pueden infectarse con varios serovares como *L. icterohaemorrhagiae* y *L. Georgia*, y servir como huéspedes accidentales. Los bovinos son reservorios primarios para *L. hardjo* y *L. Pomona*, y huéspedes accidentales para la *L. grippityphosa*. Los porcinos son reservorios primarios para la *L. Bratislava*, al igual que los equinos y accidentales para la *L. autumnalis*, a diferencia de los equinos que lo son para la *L. Pomona*. Los roedores son reservorios primarios para la *L. icteohaemorrhagiae* y accidentales para la *L. Pomona*. Los ovinos y caprinos son reservorios primarios para las *L. ballum* y *L. hardjo* y accidentales para la *L. Pomona* (Faine et al 1999).

También pueden ser reservorios primarios algunos animales silvestres como los zorrillos, cabras, conejos, y murciélagos, mientras que el hombre es un mal reservorio; hecho que se explica porque los primarios tienen el pH de la orina alcalina, favoreciendo la sobrevivencia de la leptospira. A si se sabe que 1ml de orina de vaca puede contener hasta 100 millones de microorganismos, a diferencia del hombre que tiene una orina relativamente acida para la leptospira, constituyéndose en un huésped accidental. La excreción de la leptospira en la orina de los reservorios puede ocurrir por periodos prolongados y contaminar el ambiente (Acosta, 1994).

4. MICROBIOLOGÍA

Las leptospiras son espiroquetas enrolladas (Alexander et al; 1992), estrechamente delgadas, flexibles, que pertenecen a dos grandes especies mencionadas, siendo biflexia de características saprofitas. En la especie interrogans se agrupan las leptospiras patógenas clasificadas en grupos a través de sus serotipos y subserotipos que presentan características comunes (Alexander et al; 1992).

Las leptospiras son microorganismos helicoides que están constituidos por un cuerpo citoplasmico a un axostilo que se disponen en forma de espiral. Una membrana envolvente recubre ambas estructuras. El axostilo consiste en dos filamentos axiales que se insertan en la extremidad del cuerpo citoplasmico, por medio de botones terminales. Este organelo es el encargado de la motilidad de la leptospira (Alexander; 1996) Tiene un activo movimiento de rotación pero no se conocen flagelos (Alexander et al; 1992).

Al microscopio de campo oscuro puede observarse que una de las extremidades termina en gancho. Es tan delicada que el campo oscuro puede aparecer como una cadena de cocos diminutos (Alexander et al; 1992). Todas son muy sensibles a la desecación, al calor y frío excesivo así como a las variaciones de pH no tolerando el medio ácido, el pH óptimo para su manipulación es de 7.2 a 7.4 en el agua salada no sobreviven al contrario de los largos periodos que pueden permanecer en el agua dulce principalmente si se encuentra almacenada (hasta 180 días) (Alani et al; 2003). En la leche las leptospiras no sobreviven salvo a que este diluida en agua a razón de 1:20 más (Alexander; 1996).

En frío puede sobrevivir hasta 100 días a 20 °C. Es importante mencionar que la pasteurización no destruye a las leptospiras lo que indica que es necesaria la ebullición para cumplir su destrucción. A los 10 segundos muere con un 100 °C y solo a los 10 minutos si la temperatura esta a 59 °C (Alani et al; 2003).

La orina ácida es letal para las leptospiras y por eso es necesario alcalinizarla si se pretende aislar en la orina de un enfermo. En un medio ácido

pierde su motilidad en tan solo 15 minutos. En suelo húmedo sobreviven por un largo tiempo, mientras que el suelo seco la sobrevivencia es corta (alani et al; 2003).

5. EPIDEMIOLOGIA

La Leptospirosis se presume que es la zoonosis más difundidas en el mundo (OMS, 1999). La incidencia es significativamente mayor en los países de climas cálidos que en las regiones templadas (Everard y Everard, 1993), Esto se debe principalmente a una mayor supervivencia de las leptospiras en el medio ambiente en condiciones cálidas y húmedas. La enfermedad es estacional, con una incidencia máxima en verano o en otoño en las regiones templadas, donde la temperatura es el factor limitante en la supervivencia de las leptospiras, y en épocas de lluvia en climas cálidos regiones, donde la desecación rápida de lo contrario impediría supervivencia.

La infección de la enfermedad puede ser a través de abrasiones o cortes en la piel o a través de la conjuntiva, la infección puede tener lugar a través intacta la piel después de una inmersión prolongada en agua, pero esto generalmente se produce abrasiones cuando es probable que ocurran y por lo tanto difícil de corroborar. Transmitidas por el agua se ha documentado la transmisión, la contaminación del punto de del suministro de agua ha provocado varios brotes de Leptospirosis. La inhalación de aerosoles de agua o también puede resultar en infección a través de las membranas mucosas de las vías respiratorias. En raras ocasiones, la infección puede seguir las mordeduras de animales (Barkin et al1974, Gollop et al 1993, Silverstein, 1953).

5.1 Fuentes de infección

La principal fuente de contagio para el hombre constituye, la orina de animales enfermos, reservorios naturales a si como el contacto directo con estos animales.

Agua: La temperatura del agua tiene un efecto beneficioso, ya sea baja o alta. Las bajas disminuyen la multiplicación de los microorganismos, pero el tiempo de supervivencia aumenta y las altas temperaturas favorecen la multiplicación, pero con menos tiempo de supervivencia. Esto permite que las

leptospiras puedan sobrevivir y mantener sus capacidades infectantes en el agua durante 22 días y en barro 5-6 días. No todas las aguas son favorables para la supervivencia de las leptospiras, ya que estas también se ve afectados por el pH y la salinidad (OMS, 1999).

Orina: Muchas infecciones en ultima instancia se deben ala contaminación con la orina de los animales enfermos, portadores o reservorios; siendo el pH el factor determinante de la supervivencia de las leptospiras en la orina. La orina de los bovinos se consideran como la de mayor excelencia para una fuente de infección ya que su orina es de pH alcalino lo que favorece la supervivencia del germen (Ramadas et al. 1992).

Leche: Los animales infectados, muchos eliminan leptospiras a través de la leche. Debido ala presencia de sustancia antimicrobianas, la supervivencia en la leche cruda es muy corta (Alexander et al; 1992).

Tejido animal: El tiempo de las leptospiras en los tejidos es dependiente de los pH postmortem y el efecto antagónico que supone la contaminación con otras bacterias. Lo que avala la capacidad infectante de los tejidos animales principalmente en los mataderos y al parto (Faine et al 1999)

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

Saliva: Desde que fu comprobada la infección en los humanos tras mordeduras de animales como la rata o el perro, la saliva ha sido considerada como posible fuente de infección. También se sospecha los lamidos de los perros a los niños, con la lengua contaminada mecánicamente, (Everard, 1996).

6. PATOGENIA

Las Leptospiras penetran en el organismo animal o humano, mediante la ingestión de los alimentos contaminados o agua, o a través de las membranas

mucosas de ojo, boca, fosas nasales, vagina y pene, o a través de la piel dañada o reblandecida por el agua, piel escoriada (Sullivan, 1974; Thiermann, 1984; Timoney et al., 1988; Ellis, 1994; Chamizo, 1997). El agente se difunde a partir del punto sin dejar lesión, invadiendo el torrente sanguíneo, multiplicándose en éste y en el parénquima hepático durante un período de incubación entre 2-30 días según sea el caso, circulando en la sangre provocando leptospiremia por al menos 7 días (Syfres, 1976; Thiermann, 1984; Ellis, 1994), produciendo pirexia, eliminación de leptospiras en la leche, anorexia, daño funcional de algunos órganos (hígado, bazo o cerebro) (Thiermann, 1984; Timoney et al., 1988; Ellis, 1994), especialmente en animales jóvenes (Ellis, 1994). La aparición de anticuerpos específicos detectables aproximadamente a los 10 días de la infección (Ellis, 1994) junto a la acción leptospiricida de las beta-macro globulinas del suero y la acción del complemento (Timoney et al., 1988), hacen que desaparezcan las leptospiras en torrente sanguíneo (Michna, 1970; Ellis, 1994) pero, se localizan en diferentes órganos, tales como: la cámara anterior del ojo, las meninges y el riñón donde los anticuerpos tienen poco acceso y en el útero grávido (esto hace que se produzca aborto).

Los signos de la enfermedad aguda generalmente coinciden con la fase de leptospiremia (Ellis, 1994; Heath y Johnson, 1994), donde estos pueden atribuirse a la existencia de determinados factores de patogenicidad bacteriana, como la hemolisina y las lipasas (Timoney et al., 1988; Heath y Johnson, 1994) siendo la primera causa de la anemia (Timoney et al., 1988; Prescott, 1993). Estos factores son más frecuentes en determinados serovares como: Pomona o grippotyphosa (Timoney et al., 1988). Más tarde, se le suma la acción de los anticuerpos situados en la superficie eritrocitaria que sensibilizan al eritrocito, causando su rotura-anemia- (Timoney et al., 1988; Prescott, 1993). Durante esta fase (leptospiremia) ocurre una reacción inflamatoria en la mama (mastitis). La hemólisis producida por la hemolisina y por el daño hepatocelular se le atribuye a las causas isquémicas y tóxicas –ictericia- (Prescott, 1993).

Tras esta fase, las leptospiras se acantonan en el riñón, lugar de difícil acceso para los anticuerpos, la ubicación en los túbulos renales se ve facilitada por la producción de ureasa por parte de las Leptospiras (Kadis y

Pugh, 1974). Posteriormente, se multiplicaron en la luz de los túbulos contorneados renales (Michna, 1970; Timoney et al.,1988), principalmente en las proximidades de la microvelocidades (Timoney et al., 1988), donde la nefritis esta provocada por el daño capilar y la producción de determinadas endotoxinas y hemolisinas , que terminan por producir anoxia y nefrosis hemoglobinuria, por la posible isquemia debida a la agregación intravascular de hemoglobina que obstruiría los capilares y también por la presencia de mono nucleares infiltrados por una reacción autoinmune (Thompson y Manktelos, 1989), lo que da lugar a la tercera fase (leptospiuria) que puede tener carácter continuo o intermitente y de duración variable según la especie afectada (Jawetz et al., 1985; Ellis, 1994; Bofill et al., 1996). El bovino puede tener una leptospiuria hasta 7 meses; equino de 2-3 meses, el cerdo hasta un año; perro hasta 6 meses o más; roedores toda la vida (Pelezary, 1976; Jawetz et al., 1985; Bofill et al., 1996).

La localización de agentes patógenas en el hígado y humor acuoso complica el cuadro y el desenvolvimiento clínicos, también el aborto es causa de la fiebre y la reacción sistémica general, por el paso de hemolisina y otras toxinas a través de la placenta destruyendo los eritrocitos fetales y los cambios degenerativos microscópicos en la placenta interfieren en le intercambio fisiológico entre la madre y el feto, pudiendo originar la muerte fetal (Baskerville, 1986). Siempre hay que tener en cuenta que, en algunos casos, la aparición del aborto es muy posterior al momento de la infección (Timoney et al., 1988; Ellis, 1994; Heath y Johnson, 1994).

Por último, la uveítis recurrente en equinos parece involucrar la producción de anticuerpos contra el antígeno leptospiral en reacción cruzada con tejidos oculares (Parma et al., 1987; Luchéis y Parma, 1999). El daño de la retina con uveítis tiene una relación con la presencia de linfocito B en la retina (Kalsow y Dwyer, 1998).

6.1 Formas de presentación en los bovinos

6.1.1 Sobreaguda: Se caracteriza por la aparición repentina de fiebre alta, hemoglobinuria, ictericia (Prescott, 1993; Ellis, 1994), disnea por congestión pulmonar (Prescott, 1993, Guijarro y Calvo, 1999), anorexia, altos

niveles de urea en sangre y de albúmina y bilirrubina en orina (Michna, 1970; Prescott, 1993; Ellis, 1994; Heath y Johnson, 1994). Generalmente, acaba con la muerte del animal en 3-5 días, siendo los terneros los más afectados; aunque en hembras preñadas provoca aborto por la pirexia y la desaparición prácticamente de la producción láctea (síndrome de la caída de la leche) (Michna, 1970; Bofill et al., 1996; Perdomo y Garin, 2002). Los serovares que más causan esta forma son: *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. autumnalis*, por lo que nunca se producen el portador crónica; por ser clasificado como serovares no adaptados (Guijarro y Calvo, 1999).

6.1.2 Aguda: Es frecuente en los terneros, casi siempre mortal. Presenta: anorexia, laxitud, fiebre, 40,5-41,5 0C. , posteriormente se presenta la hemoglobinuria, ictericia, septicemia, hemorragias petequiales en todas las membranas mucosas, anemia (Blood et al., 1982; Chamizo, 1997 y 1998; Merck, 2000). Al principio, se puede presentar diarrea, en algunos casos sanguinolentas y/o amarillentas y con olor fétido, pero más tarde puede haber estreñimiento (Patterson, 2003) .Rara vez afecta a los adultos.

6.1.3 Subaguda: Lo mismo que la forma aguda pero de menos severidad, puede ser subclínica excepto en los animales gestantes y/o en lactación, en los que pueden aparecer abortos y síndrome de la caída de la leche (Michna, 1970; Ellis, 1983) y a veces la leche parece el calostro, o contener coágulos de sangre y el recuento de sus células blancas son muy altos. A la palpación las ubres blandas y los cuatro cuartos afectados pueden parecer normales. También aparece ictericia o no, disminución de la rumia, fiebre (39-40,5 0 C) y anorexia (Ellis, 1978; Ellis, 1983; Chamizo, 1998). En algunos casos, también se ha observado meningitis y dermatitis necrótica (Thiermann, 1984; Vanasco et al., 2000). El aborto puede ocurrir de 3-4 semanas después de la infección.

6.1.4 Forma crónica: Casi siempre está relacionado con *L. hardjo* y en algunos casos *L. pomona* sin manifestación clínica (Blood et al., 1982; Chamizo, 1998). Caracterizada por la aparición de abortos, retención de placenta, mortinatos, nacimientos de animales débiles (Michna, 1970, Ellis, 1994; Bofill et al., 1996; Vanasco et al., 2000). El aborto puede ocurrir en esta

última etapa de la gestación entre 6-9 meses y el animal elimina el germen por la orina durante un largo período (Chamizo, 1998).

7. LESIONES ANATOMOPATOLOGICAS

Las lesiones que aparecen en la Leptospirosis no son patognomónicas, por lo que no puede basarse en ellas para el diagnóstico de la enfermedad (Baskerville, 1986). También las lesiones pocas observables depende del serovar implicado así como; los órganos y especie afectadas.

El cadáver animal revela ictericia manifiesta, necrosis de la piel; de los ollares, de la cavidad nasal y oral (Benhnet y Plum, 1998).

En la necropsia se observa acumulo de líquido rojizo en el tejido subcutáneo, hígado hipertrófico y palidez hepática, o color amarillenta, vesícula biliar llena, espesa y viscosa de color pardo o verde oscuro (Pérez et al., 1982), bazo de tamaño normal o ligero de color amarillento (Pérez et al., 1982), lesiones muy variables desde lesiones blanco amarillento en la superficie o focos hemorrágicos en pulmón (Pérez et al., 1982; Thiesmann, 1984).

El músculo cardíaco degenerado y en algunos puntos hay hemorragias. Los riñones están edematosos de color rojizo o pardo oscuro con nefritis intersticial, lesiones necróticas e ictéricas por toda la superficie, también hemorragia (Pérez et al., 1982; Thiermann, 1982). La vejiga, llena de orina turbia o rosada, los ganglios tumefactos y las mucosas intestinales pueden estar inflamadas (Chamizo, 1997).

En los fetos abortados se observan congestión generalizada y deposiciones líquida (Ellis, 1994; Fernández, 1999).

También se puede encontrar ictericia, mastitis, fluido libre en cavidades corporales, lesiones petequiales dispersas, edema peri renal, nódulos linfáticos aumentados de tamaño, bilis de consistencia pastosa y color negruzco (Michna, 1970; Pérez et al., 1982; Thompson y Manktelow, 1989).

8. ANTECEDENTES

E. Clay Hodgkin y sus colaboradores, del laboratorio de Diagnostico de Medicina Veterinaria y el Departamento de Patología Veterinaria, de la facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad del Estado de Luisiana, en el año de

1989, en su artículo **Aborto de leptospira en caballos**, señalan que la infección de leptospira fue diagnosticada como la causa de 4 abortos y 1 muerte neonatal en Luisiana. Las lesiones gruesas y microscópicas más consecuentes eran ictericia y nefritis intersticial, respectivamente. Los diagnósticos estaban basados en la visualización de espiroquetas compatibles en secciones Wharthin-Starry de riñón, hígado y placenta (E. Clay Hodgins, et al; 1989).

James M y colaboradores, del Departamento de Ciencias Veterinarias, del Colegio de Agricultura, de la Universidad de Kentucky, en el año de 1992 en su artículo, **Prevalencia y serovariedades de leptospira implicada en abortos equinos en Kentucky central durante la temporada foaling 1990**; utilizaron la técnica de Wharthin-Starry en el diagnóstico de leptospira donde fueron recolectados 726 fetos, potros y/o placentas de las cuales 33 fueron positivas a leptospira gracias a esta técnica (James M, et al;1992).

Moles cervantes LP y colaboradores, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Coyoacán, México. En el año del 2002 en su artículo **El estudio serológico de Leptospirosis bovina en México**, de las 4043 muestras de sueros de bovinos la técnica que se utilizó fue la de aglutinación microscópica reveló el 31.1% de prevalencia (Moles Cervantes LP, et al 2002).

Ángela M. Colagross-Schouten y colaboradores, del Centro Médico de Fauna, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de California EE.UU., en el año del 2002 en su artículo, **Diagnóstico y seroprevalencia de Leptospirosis en leones marinos de California costera**, realizaron el estudio de 40 leones marinos muertos de los cuales 19 salieron positivos a Leptospirosis para lo cual realizaron la técnica de Wharthin-Starry utilizando tejidos de riñón (Ángela M, et al2002).

Segura-correa VM y sus colaboradores, del Centro de Investigación Regional del sureste, INIFAP, en el año 2003 en su artículo **Seroprevalencia y factores de riesgo para los anticuerpos de leptospiras en el ganado en el estado de Yucatán, México**. Se utilizó la prueba de aglutinación microscópica para la evaluación de 734 muestras de las cuales el 64% son positivas lo cual

refleja un problema a causa de la no vacunación en dicho estado (Segura-correa VM, et al; 2003).

Saglam YS y colaboradores, del Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Erzurum Turquía, en el 2003 en su artículo **Detección de antígenos de leptospiras en el riñón y el hígado de los bovinos**. Un total de 39 muestras de riñón de las cuales 16 salieron positivas se utilizó la técnica de IP, la cual demostró que la técnica de IP era más sensible que la prueba de levaditi (Saglam YS, et al; 2003).

Schoonman L, Swai ES, de Tanga lácteos de Tanga Tanzania, en el año del 2004 en su artículo publicado, **Rebaño de animales y el riesgo a nivel de factores de Leptospirosis bovina en la región de Tanga Tanzania**, se tomaron para el experimento 655 muestras de 130 rebaños seleccionados; para lo cual 198 muestras fueron positivas a diferentes serotipos de leptospiras, donde la técnica utilizada para el diagnóstico fue aglutinación microscópica (MAT). (Schoonman L, Swai ES, 2004)

De Freitas TP y sus colaboradores, de la Sociedad de Conservación de Rio de Janeiro, Brasil, en el año 2005 en su artículo, **La prevalencia de leptospira interrogans anticuerpos en rango libre Tayassu pecari de pantanal sur, Brasil, un ecosistema donde la vida silvestre y el ganado interactúan**; señala que de las 71 muestras analizadas el 70% fueron positivas para lo cual se utilizó micro aglutinación microscópica como prueba oficial para la determinación de Leptospirosis (De Freitas TP, et al; 2005).

Mariya R y colaboradores, de la División de Bacteriología y Micología, Instituto de la Investigación Veterinaria India, en el 2006 en su artículo **Evaluación de un antígeno recombinante Lip41 de la leptospira interrogans serovar canicola en ELISA para diagnóstico serológico de la leptospira bovina**, se comparó las técnicas de ELISA y MAT donde sueros de bovinos tanto positivos como negativos fueron usados sometidos a estas dichas técnicas donde se obtuvo una especificidad de 85.3% para ambas pruebas (Mariya R, et al; 2005).

Bomfim MR y Koury MC, del Departamento de Microbiología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Federal de Minas Gerais, en el año del 2006 en su artículo, **Evaluación de la LSSP-PCR para la identificación de Leptospira spp. en muestras de orina de ganado con sospecha clínica de Leptospirosis.** 40 vacas sospechosas a Leptospirosis fueron confirmadas con la técnica de PCR (Bomfim MR, Koury MC; 2006).

Niedermaier G y colaboradores, de la Universidad de Múnich Alemania, en el año 2006 en su artículo **La detección de leptospiras en el humor vítreo de los caballos sin enfermedades oculares y de los caballos con uveítis recurrente equina (ERU), utilizando microscopía electrónica de transmisión.** Señala que la detección de leptospira en el humor vítreo fue un éxito ya que fueron inoculadas 38 con cultivos de leptospiras para lo cual solo fueron positivas 3 de 38 lo cual nos indica un éxito, para la detección de leptospira se utilizó microscopía electrónica (Niedermaier G, et al; 2006).

Albertine León y colaboradores, del Laboratorio de Patología de la Universidad de Francia, en el año del 2006 en su artículo, **La identificación de Leptospira patógena en tejidos de un potro prematuro por el uso del análisis de efecto de dominio polimerasa,** realizaron un estudio para determinar la causa de muerte de un potro prematuro que 24 horas después de su nacimiento murió, se realizaron estudios histopatológicos en pulmón, hígado y riñón los cuales revelaron numerosas espiroquetas, para lo cual se utilizó la técnica de Warthin-Starry (Albertine León, et al; 2006).

Hashimoto VY y colaboradores, del Postgrado en Ciencias de los Animales Paraná, Brasil, en el año de 2007 en su artículo. **La aparición de anticuerpos contra Leptospira spp. En los caballos de la zona urbana de la ciudad de Londrina, Paraná, Brasil.** Señalan que de 320 muestras analizadas con la prueba de seroaglutinación, de las cuales salieron positivas 214 indicando una gran prevalencia de dicha enfermedad en el ganado de la región (Hashimoto VY, et al; 2007).

Brandes K y colaboradores, de la Clínica de Equinos de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Ludwig-Maximilians-Universität München de Alemania, en el año 2007 en su artículo **Uveítis recurrente en los**

caballos: los exámenes de detección de vítreo con ultra estructurales de las leptospiras. De las 17 muestras obtenidas 16 son positivas a la prueba de aglutinación microscópica indicando a sí que la Leptospirosis juega un papel importante en la patogénesis de la uveítis recurrente equina (ERU). (Brandes K, et al; 2007)

Escamilla HP y colaboradores, de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera, Santa Cruz Atoyac, México, DF. En el 2007 su artículo **Frecuencia y las causas de aborto infeccioso en un hato lechero en Querétaro, México.** Donde dice que de las 300 muestras tomadas a vacas preñadas 99 fueron positivas a Leptospirosis utilizándose la técnica de aglutinación microscópica (Escamilla HP, et al; 2007).

Jung BY y colaboradores, del centro de Diagnóstico, Servicio Nacional de Investigación Veterinaria y Cuarentena de la Ciudad de Corea, en el año del 2009 en su artículo **Seroprevalencia de Leptospira spp. En las carreras de caballos clínicamente sanos en Corea.** Utilizaron muestras de sueros de 1226 caballos de carreras a los cuales se les examinó mediante la prueba de aglutinación microscópica para detectar la presencia de anticuerpos de leptospira, para ello 307 muestras salieron positivas (Jung BY, et al; 2009).

Sugunan AP y colaboradores, del centro colaborador para el Diagnóstico, Investigación y Capacitación de Referencia en Leptospirosis en la India, en el año del 2009 mencionan en su artículo: **Los factores de riesgo asociados con Leptospirosis durante un brote en medio andaman, india,** se confirmaron 52 casos de leptospira donde fue utilizada la técnica de aglutinación microscópica (MAT). (Sugunan AP, et al; 2009)

Hesterberg UW y colaboradores, de la Sección de Epidemiología del Departamento de Estudios de Producción Animal, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Pretoria Sudáfrica, en el año del 2009 en su artículo **Un estudio serológico de Leptospirosis en el ganado de las comunidades rurales en la provincia de KwaZulu-Natal, Sudáfrica,** se analizaron 2021 muestras de las cuales fueron positivas el 20% con la técnica de aglutinación microscópica con un 95% de eficacia (Hesterberg UW, et al; 2009).

Lewis FI y colaboradores, de la Unidad de Investigación de Epidemiología del Reino Unido, en el año del 2009 en el artículo **Inferencia bayesiana para la prevalencia dentro de la manada de leptospira interrogans serovar hardjo usar la prueba de anticuerpos en la leche a granel**, se analizaron 979 animales de 12 hatos lecheros con la prueba de ELISA la cual va tener un 95% de eficacia y se deduce que por lo menos hay una probabilidad de 5% de exposición de L. hardjo (Lewis FI, et al; 2009).

Hotka MLy colaboradores, de USDA, USA en el año del 2009 su artículo, **estudio comparativo serológico de leptospira serovar hardjo genotipos para su uso en la prueba de aglutinación microscópica**, se utilizo la prueba de aglutinación microscópica para la identificación de leptospira en 2431 muestras de las cuales 1475 muestras fueron negativas (Hotka ML, et al; 2009).

Hernández –Rodríguez P y colaboradores; de el Departamento de Medicina y Reproducción Animal de la Universidad La Salle, de Bogotá Colombia, en el año del 2010 en su artículo: **Una comparación entre la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y las técnicas tradicionales para el diagnostico de leptospira en bovinos**; señalan que la técnica de PCR tiene una mayor sensibilidad 100% y especificidad 99% en comparación con un cultivo microbiológico, ya que en este estudio se analizaron muestras de orina y 74/200 salieron positivas con PCR (Hernández –Rodríguez P, et al; 2010).

Rojas P y colaboradores, de la Escuela de Agricultura, Ciencia de los Alimentos y Medicina Veterinaria de la Universidad de Collage Dublín de Irlanda en el año del 2010 señala en unos de sus artículos, **Detección y cuantificación de las Leptospirosis en la orina de los perros: un huésped de mantenimiento de la Leptospirosis enfermedad enzootica**. Para dicho artículo fueron analizadas 525 muestras de orinas de perros locales de las cuales 37 fueron positivas para lo cual se utilizo la técnica de PCR (Rojas P, et al; 2010).

Rajeev S y colaboradores. de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Georgia en EE.UU. en el año del 2010 menciona en su artículo, **Comparativa de anticuerpos fluorescentes y la prueba de aglutinación**

microscópica de leptospira en las vacas embarazadas y no embarazadas, indican que fueron analizadas 300 muestras de 10 rebaños diferentes donde se utilizaron las pruebas aglutinación microscópica y inmunofluorescencia directa. Donde resulto tener una mejor eficacia la técnica de aglutinación microscópica (Rajeev S, et al; 2010).

Sankar S y colaboradores, de la División de Bacteriología y Micología, del Instituto de Investigación de Veterinaria de la India, en el año del 2010 en su articulo **Evaluación de una proteína recombinante LigB de leptospira interrogans serovar canicola en un ensayo de ELISA para el diagnostico serológico de Leptospirosis bovina**, que fueron evaluadas 200 muestras para el diagnostico de leptospira donde fueron utilizadas las técnicas de ELISA y aglutinación microscópica donde los resultados arrojados por el experimento nos indica que las dos técnicas se corresponden muy bien (Sankar S, et al; 2010).

Senthilkumar TM y colaboradores, del Departamento de Biotecnología Animal, de la Facultad de Veterinaria de Madrás India, en el año del 2010 en su articulo publicado, **Diagnostico serológico de Leptospirosis bovina por IgG-enzima-inmunoensayo y la prueba de aglutinación en látex**, donde fueron evaluadas las técnicas de ELISA y aglutinación en látex con un total de 430 muestras de sueros de bovinos. Dichas pruebas se encuentran para ser sencibles, especificas y de acuerdo con la MAT estándar (Senthilkumar TM, et al; 2010).

9. DIAGNOSTICO

9.1 Técnicas indirectas

Los métodos serológicos nos brindan un diagnóstico en corto tiempo y son capaces de detectar anticuerpos antileptospirales (que pueden ser de la clase IgM e IgG), las que constituyen las técnicas de elección (Laguna, 2000).

Además, son las pruebas de laboratorio más utilizadas en el diagnóstico de la Leptospirosis, al igual que para la realización de estudios epidemiológicos.

Para el diagnóstico serológico se ha utilizado técnicas tales como: prueba de aglutinación microscópica (MAT), prueba de micro aglutinación microscópica con antígeno muerto (MSAT), aglutinación macroscópica, prueba hemolítica, fijación de complemento, ensayo inmunoenzimático (ELISA) y PCR.

9.1.1 MAT:

Es el método serológico de referencia a la hora de evaluar otras pruebas para el diagnóstico de Leptospirosis. Se emplea para detectar anticuerpos en sueros de sospechosos o enfermos (humanos y animales) donde el suero del paciente sospechoso o enfermo reacciona con antígenos vivos de leptospiras de 10 días de crecimiento en medio líquido de EMJH con enriquecimiento, y es el más utilizado cotidianamente (Ellis, 1994; Heat et al, 1995).

Además es la prueba oficial para la exportación e importación de animales (Ellis, 1976). El MAT fue ideado por Martin et al., en 1917 y en 1918, Martin y Pettit lograron describir el fenómeno de aglutinación y "lisis" con suero (Laguna, 2000).

Para la realización de la prueba se utilizan cultivos de cuatro a ocho días de edad cuya suspensión produzca una transmitancia del 60-70 % en un espectrofotómetro a 400nm de longitud de onda (Ellis, 1976). Además, es necesario determinar el punto de corte, título por debajo del cual es considerado que la aglutinación es debido a reacciones inespecíficas. El título de anticuerpos del suero será la dilución más alta en la cual aun encontramos 50 % de aglutinación. El punto de corte más recomendado es el título 1:100 en bovino; para los perros, felinos, ovinos, suinos y equinos se considera positivo un resultado superior a 1:50 consideraron 1:100 positivo para porcino también, pero casi siempre estos valores difieren de laboratorios. Pero el 1:100 en bovinos no siempre resulta adecuado, principalmente en infecciones por serovar adaptado como L.hardjo. En caso de abortos en bovino 1:40 se considera diagnóstico, aunque el porcentaje de fetos que presentan reacción de inmunidad humoral es bajo (Laguna, 2000).

A pesar de ser la prueba más recomendada y extendida, presenta una serie de desventajas: no distingue anticuerpos vacúnales de los de infección, resulta difícil su estandarización ya que su valoración es subjetiva, requiere el

mantenimiento de cultivos de leptospiras y no siempre detecta a los animales infectados, en especial cuando el serovar implicado es *L. hardjo*, que presenta como características ser poco antigénico (Allent et al; 1999).

9.1.2 Prueba de aglutinación microscópica con antígeno muerto (MSAT)

Utiliza leptospiras formuladas y centrifugadas, re suspendidas a una cierta densidad estándar, con un "pool" de antígenos de varios Serogrupos. La aglutinación que se produce es semicuantitativa y puede leerse a simple vista. Esta reacción es menos específica que MAT, menor nivel de títulos obtenido, mayor reacción cruzada, los antígenos son estables a 4 0C por lo menos un año, es especie específica y de la misma forma que MAT, no diferencia reacción entre anticuerpos de la infección reciente y tardía, pero tiene una buena reacción temprana de la enfermedad que MAT, (Acosta et al., 1994)

9.1.3 Fijación de complemento (FC)

Es una prueba género-específica que emplea como antígenos de *L. biflexa*, considera tan fiable como el MAT para la detección de animales con leptospirosis, pero, detecta infección reciente, es útil en el pesquesaje de grandes cantidades de sueros ya que puede semiautomatizarse. Es una herramienta epidemiológica para diagnóstico rápido, menos laboriosa que el MAT. Las desventajas son las sustancias anticomplementarias del suero, la corta vida e inestabilidad del antígeno, no permite la diferenciación de serovares y no detecta niveles bajos de anticuerpos. (McDonough, 2001)

9.1.4 ELISA

Las deficiencias que permite el MAT ha obligado a los científicos emplear esta técnica que ayude a la detección de anticuerpos tanto en tanque de leche como en el suero. Ella es capaz de detectar la IgM durante la primera semana de la enfermedad y la detección tardía de IgG que permite diferenciar infecciones recientes de pasadas. La detección de anticuerpos específicos IgM con una sola muestra es confirmatoria de una infección reciente por leptospiras. Además, se considera como más sensible que MAT, es fácil de estandarizar los antígenos, pueden almacenar durante meses, no tiene ningún riesgo para los técnicos y pocas reacciones cruzadas, tampoco diferencia los

anticuerpos vacúnales de las infecciones. A pesar de que es una prueba muy eficaz, aun no está considerada como prueba oficial (Johnson y Faine, 1994).

9.1.5 Aglutinación microscópica

Se desarrolló para evitar los problemas derivados del mantenimiento de cepas vivas de leptospiras en el laboratorio. Poco autores la recomiendan debida a su falta de sensibilidad y porque no es capaz de determinar el serovar (Johnson y Faine, 1994).

9.2 Técnicas directas

9.2.1 Observación en microscopio de campo oscuro

Este método se realiza para la observación de leptospiras en los fluidos orgánicos. Es difícil debido al gran número de artefactos que, por su parecido con las leptospiras, pueden crear confusión. Además precisa que haya un gran número de microorganismos en las muestras (Alexander A. D. 1996).

9.2.2 Wharthin – Starry

El Wharthin-starry es una técnica de tinción de nitrato de plata utilizadas en histología. Se introdujo por primera vez en 1920 por patólogos americanos Aldred Wharthin y Allen S. C. utilizada para la detección de espiroquetas. Se ha considerado la mejor prueba para la detección de espiroquetas (Alexander A. D. 1996).

Tinciones histológicas de leptospiras

Un diagnóstico de la Leptospirosis puede ser confirmado por la demostración de las leptospiras en los tejidos de los no plata tinción específica (la técnica de Wharthin-Starry) o por el más sensible técnicas de inmunohistoquímica. De los, inmunofluorescencia y tinción inmuno plata último tinción son las más útiles. Inmuno tinción de plata, a diferencia de la tinción de inmunofluorescencia, se ha la ventaja de que produce una imagen permanente que no desaparece con el tiempo. Además, un microscopio de fluorescencia no es necesario (Yener Z, et al; 2001).

Los organismos pueden demostrarse en los túbulos renales de los animales con infección en los riñones y leptospiruria. Digestión de la pepsina se puede utilizar para mejorar el acceso de inmunofluorescencia o manchas inmuno oro a los antígenos de leptospiras. La aplicación de la tinción inmunohistoquímica para abortar tejido fetal es posible, pero puede verse obstaculizada por los cambios auto líticos (Alexander 1996).

Independientemente de la técnica utilizada, una sección de control positivo debe ser incluido en la preparación de cada lote de cortes histológicos (Yener Z, et al; 2001).

10. Técnica de Wharthin-Starry

Soluciones

Solución tampón

Combina ácido 1,5 ml de 0,2 mol de sodio L / acetato con 18,5 ml de 0,2 mol / L acético glacial (11,8 ml de ácido acético glacial hizo a 1 L con agua destilada), y hacer que el agua destilada con 50 ml.

El pH debe ser 3.6, si es necesario, ajustar con 0,2 mol / L de acetato de sodio o hacia abajo con 0,2 mol / L ácido acético.

Desarrollador de soluciones

Los siguientes tres soluciones deben ser todos los trajo a 55 ° C y se mezcla en el orden dado justo antes de uso:

El nitrato de plata, AgNO₃, 2%, en tampón 7,5 ml

Gelatina, el 5%, en tampón 37,5 ml

La hidroquinona (quinol), el 3%, en tampón 2,5 ml

Técnica de tinción

(A) Tome parafina secciones delgadas a través de xileno y alcohol para amortiguar.

(B) Impregnar con nitrato de plata al 1% en agua tamponada a 55-60 ° C durante una hora (calentar el primera solución).

(C) Preparar soluciones de revelado y el lugar en el horno o al baño maría. Coloque el agua del grifo en el horno o baño de agua a calentar.

(D) Colocar los portaobjetos en el revelador fresco a 55 ° C de 1.5-3.5 min. Las secciones se convierta en un color marrón dorado.

(E) Drenaje secciones brevemente, enjuague durante 2-3 minutos en agua tibia (55-60 °C) y enfriar a continuación en un lugar fresco solución buffer.

(F) Deshidratar, aclarar y montar.

Las leptospiras se ven como negro en tejidos de color marrón pálido amarillento.

DESCRIPCIÓN PASO A PASO.

FIJACIÓN: 10% intermedia formalina neutral. No utilice fijador de cromato.

TÉCNICA: Corte secciones de parafina en 6 micrones.

SOLUCIONES: Utilizar cristalería químicamente limpio.

AGUA ACIDULADO.

Triple agua destiladas..... 1000.0 ml

Añadir suficiente ácido cítrico acuosa al 1% para llevar agua a pH 4.0

SOLUCIÓN DE NITRATO DE PLATA DE 1% (DE IMPREGNACIÓN).

Nitrato de plata, cristales de ACS..... gm 1.0

Agua acidulada..... 100 ml

SOLUCIÓN DE NITRATO DE PLATA DE 2%.

Nitrato de plata, cristales de ACS..... gm 2.0

Agua acidulada..... 100 ml

SOLUCIÓN DE GELATINA DE 5%.

Fisher G-7 gelatina, alto grado (tipo B)

Punto isoeléctrico..... gm 10.0

Acidulated agua..... 100,0 ml

SOLUCIÓN DE HIDROQUINONA DE 0,15%.

Cristales de hidroquinona, grado fotográfico..... 0,5 mm

Agua acidulada..... 100,0 ml

Coloque el 2% de nitrato de plata, gelatina de 5% y la hidroquinona 0.15% en frascos independientes, en un baño de flotación a 54grados durante la impregnación de diapositiva en el 1% de nitrato de plata.

11. Literatura citada

- Abdulkader.R.C.R.M. 1997. La insuficiencia renal aguda en la Leptospirosis, falla renal. *Journal Med. Microbiol.* 2: 1-7
- Acosta.; C. Moreno y D. Viafara.1994. Leptospirosis: Revisión del tema. *Colombia Médica.* Vol.25:3642.
Web:<http://colombiamedica.univalle.edu.co/Vol25No1/lptospirosishtm>.
- Adler, B. y S. Faine.1978. Los anticuerpos involucrados en la respuesta inmune humana ala infección por leptospiras. *J. Med. Microbiol.* 11:387-400.
- Alani, FA S., Mahoney MP.Ormerod LP.Wright PA y M. Garrues.2003. La Leptospirosis se presenta como la neumonía atípica, insuficiencia respiratoria y la meningitis piógenas. *Journal Veterinaria.* 2:4-6.
- Albertine León, Stephan Pronost, et al; 2006, La identificación de leptospira patógena tira en tejidos de un potro prematuro por el uso de análisis de efecto de dominio polimerasa, *Journal Veterinaria Diagn Invest*, 18: 218-221.
- Alexander A. A., Baer A., Fair J. R., Gochenour W. S., King J. H., y Yager R. N. 1992.Leptospiral uveitis: report of a bacteriologically confirmed case. *Arch. Ophthalmol. Journal Veterinaria* 48:292-297.
- Alexander A. D. 1996. Serological diagnosis of Leptospirosis, p. 435-439. *Manual of clinical laboratory immunology*, 3a ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Alston J. M. y Broom J. C. 1988. Leptospirosis in man and animals. E & S. Livingstone. Edinburg, U.K.
- Allen P., Raftery S, y Phelan D. 1999. Masive pulmonary hemorrhage due the Leptospirosis. *Intensive Care Med.* 15: 322-324.
- AM Monahan, Callanan JJ, Nally JE: El análisis proteómico de *Leptospira interrogans* derramada en la orina de los ejércitos con infección crónica. *Infect Immun. Journal Veterinaria* 76:4952 - 4958, 2008.
- Ángela M. Colagross-Schouten, Jonna A. K. Mazet, Frances M. D. Gulland, Melissa A. Miller, and Sharon Hietala, 2002, Diagnostico y seroprevalencia de Leptospirosis en leones marinos de california costera; *journal of wild life Diseases*, 38(1), pp. 7-17.
- Areán V. M. 1992. The pathologic anatomy and pathogenesis ot fatal human Leptospirosis (Weil's diseases). *Am. J. Patol.* 40:393-423.
- Bahamas, AR AL Ibrahim, Stallman ND, y Tinniswood RD 1988. La prevalencia bacteriológica de la infección por leptospiras en el ganado bovino y búfalos en el oeste de Malasia. *Epidemiol. Infectar* 100:239-246
- Baker, TF, SA McEwen, Prescott JF, Meek AH: 1989. La prevalencia de Leptospirosis y su asociación con la nefritis intersticial multifocal en cerdos en la masacre. *J Vet Res puede* 53:290-294,
- Bal A. E., Gravekamp C., Hartskeerl R. A., Meza-Brewster J., Korver II., y Terpstra W. J. 1994. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of Leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 32:1894-1898
- Barkin, R. M., J. C. Guckian, J. y W. G lossler. 1974. La infección por leptospira ballum: un caso de laboratorios asociados. *Del Sur Medicina J.* 67: 155-156.
- Baskerville, A.1986. Histological aspects of diagnosis of Leptospirosis. In: Ellis W.A., Little T.W.A.(Eds.) *Present state of Leptospirosis diagnosis And control.* Martinus Nijhoff Publishers. *Journal Veterinaria* 2: 33-43.
- Benhnet, C. J. y Plum, F. 1998. Leptospirosis. *Tratado de Medicina Interna: 1984-1985. Journal Veterinaria* 4: 3-9. (CECIL)

Blood, D.C., Radostits, O.M. and Henderson, J.A. 1982. Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 6 Eds. ELBS Journal Veterinaria 675-685.

Bofill, P., Rivas, A., Ramírez, W. Montañéz, J., Martínez, A., Quincoses, T., Reinaldo, L. y Fuentes, E. 1996. Manual de Enfermedades Infecciosas. Tomo # 1. Talleres Gráficos de la Dirección de Publicaciones y Materiales Educativos del Instituto Politécnico Nacional, México, 139-187.

Bomfim MR, Koury MC, 2006, Evaluación de la LSSP-PCR para la identificación De la leptospira spp. En muestras de orina de ganado con sospecha clínica De Leptospirosis. Journal Veterinaria 183(3-4):278-88.

Brendle, J.J., Rogul M y A. D. Alexander. 1974. Hibidacion de ácidos desoxirribonucleico entre algunos serotipos de leptospiras. Int. j. Syst. Bacteriol 24:205- 214.

Brandes K, Wollanke B, Niedermaier G, Brem S, Gerhards H, 2007, Uveítis recurrente en los caballos: los exámenes de detección de vítreo con ultra estructurales de las leptospiras. Journal Veterinaria: 54(5): 270-5.

Bréenle J. J., Rogul M., y Alexander A. D. 1994. Deoxyribonucleic acid hybridization among selected leptospiral serotypes. In. J. Syst. Bacteriol. 24: 205-214.

Brenner, DJ, AF Kaufmann, Sulzer KR, Steigerwalt AG Rogers FC, y Weyant RS. 1999 Nueva determinación de la reacción entre el ADN y de los Serogrupos y serovars en la leptospiraceae familia con una propuesta de la leptospira sp alexanderi. Noviembre y cuatro nuevos genomoespecies leptospira. Int. J. Syst. Bacteriol 49:839-858.

Chamizo, E. 1997. Patología orgánica y enfermedades de los animales domésticos. Ed. Félix Varela. 52

Chamizo, E. 1998. Manual de Patología Veterinaria Especial. Ed. ISCAH. 269-271

Cottral G. E., 1986. Microbiología Veterinaria. México. La prensa Mexicana S.A.

CW Yang, Wu MS, Pan MJ: La enfermedad de la Leptospirosis renal. Nephrol Dial Transplant 16 (Suppl 5): 73 - 77, 2001

De Biase L., De Curtis G., Paparoni S., Sciarra D., y Campa P. P. 1997. Fatal Leptospiral miocarditis. G. Ital. Cardiol. 17:992-994.

Dammeerrt N. 2005. Leptospirosis: una revisión bibliográfica. Por Nicole Dammeert. Recuperado el 20 de septiembre de 2007. Disponible en: www.sapuvetnet.org/.

De Freitas TP, Keuroghlian A, et al. 2010. La prevalencia de leptospira interrogans anticuerpos en un rango libre Tayassu pecri de pantanal sur, Brasil, un ecosistema donde la vida silvestre y el ganado interactúan. Journal Veterinaria, (2), 1-5.

Dikkn, H y E. Kmety. 1978. Los métodos serológicos tipificación de las leptospiras, p. 259-307. En T. Bergan, JR y Norris (ed.), métodos de Microbiología, vol. 11. Académica Press. Londres, Reino Unido.

E. Clay Hodgkin, David A. Miller, Fernando Lozano, 1989, Aborto de leptospira en caballo; Journal veterinaria, Diagn Invest, 1:283-287.

Ellinghausen, H. C., y W. G. Mc Cullough. 1965. Nutrición de leptospira Pomona y el crecimiento de 13 serotipos distintos: el fraccionamiento de los complejos de albumina oleico y medio de albumina bovina y polisorbato 80. Am J. Vet. Res. 26:45- 51.

- Ellis, W. A., J.J. O Brin, J. K.L. Pearson, D y S Collins. 1976. Leptospirosis bovina: la infección por el Serogrupos hebdomadis y mastitis. Vet. Rec. 99:368-370.
- Ellis, W.A. 1978. Bovine Leptospirosis: infection by the Hebdomadis serogroup. Vet. Annu., 18:60-66.
- Ellis, W.A. 1983. Recent developments in bovine Leptospirosis. Vet. Annu., 23: 91-95.
- Ellis, W.A. 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet. Clin. North. Am., Food Anim. Pract. 10:463-478.
- Escamilla HP, Martínez MJ, Medina CM, Morales SE, 2007, Frecuencia y causas de aborto infeccioso en un hato lechero en Querétaro, México. Octubre del 2007, Journal Veterinaria 71(4): 314-7.
- Everard J. D. 1996. Leptospirosis, p. 111-119. En F. E. G. Cox (ed.). The Welcome Trust illustrated history of tropical diseases. The Wellcome Trust. London. U. K. Journal Veterinaria 2:2-9.
- Everard, D.J., C.y O.R.Everard.1993. Leptospirosis en el Caribe. Rev.Med. Microbiol.4:114-122.
- Faine, S., D. y N. Stallman. 1982. Descripciones modificada del genero leptospira de Noguchi 1917 y la L. Interrogans especies (Stimson 1907) Wenyon 1926 y L. biflexa (Wolbach y Binger 1914) Noguchi 1918. Int. J. Syst. Bacteriol. 32:461-463.
- Faine, S., B Adler, Bolin C. y P. Perolat. 1999. Leptospira y la Leptospirosis, 2ª ed. MedSci, Melbourne, Australia.
- Feresu S. B., Bollin C. A., Van de Kemp H., y Korver H. 1999. Identification of a Serugroup Bataviae Leptospira strain isolated from an ox in Zimbabwe. Zentralbl. Bakteriologie. 289:19-20.
- Fernández, L. H. 1999. Leptospirosis. Manual de salud de cerdo. Tomo 1:34-39
- Gollop, JH, AR Katz, Rudoy RC, y Sasaki DM.1993. Por mordedura de rata Leptospirosis. Al oeste. J. Med. 159: 76-77.
- Guijarro, R. y Calvo, E. 1999. Tratamiento y control de Leptospirosis bovina. Producción Animal, Journal Veterinaria: 146:27-36
- Haapala, DK, M. Rogul, LB Evans y Alejandro AD. 1969. Acido desoxirribonucleico base de la composición y los estudios de homología de leptospira. J. Bacteriol. 98:421-428.
- Hamir AN, CA Hanlon, Niezgodá M, Ruperto CE: 2001, La prevalencia de la nefritis intersticial y la Leptospirosis en 283 mapaches (*Procyon lotor*) de 5 sitios diferentes en los Estados Unidos. Can J Vet 42:869-871,
- Hashimoto VY, Gonçalves DD, Silva FG, Oliveira RC, Alves LA, Reichmann P, Muller EE, Freitas JC, 2007, La aparición de anticuerpos contra leptospira spp. En los caballos de la zona urbana de la ciudad de Londrina, Parana, Brasil. Septiembre 2007, Journal Veterinaria 49(5): 327-30.
- Heath C. W., Alexander A. D., y Galton M. M. 1995. Leptospirosis in the United States: 1949-1961. n. Engl. J. Med. 273:857-964, 915-922.
- Heath S.E. and Johnson, R. 1994. Leptospirosis. JAVMA 205, 1518-1523.
- Hernández-Rodríguez P, Díaz CA, Dalmau EA, Quintero GM,2010. Una comparación entre la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y las técnicas tradicionales para el diagnóstico de leptospira en bovinos; Epud 31 octubre 2010, Journal Veterinaria (1); 1-7.
- Hesterberg UW, Bagnall R, Bosch B, Perrett K, Horner R, Gummow B,2009, Un estudio serológico de la Leptospirosis en el ganado de las comunidades rurales

en la provincia de KwaZulu-Natal, Sudáfrica. Marzo 2009, *Journal Veterinaria* 80(1), 45-9.

Hotka ML, Wilson MA, Anderson TM, Tichenor CL, Miller DA, 2009, Estudio comparativo serológico de leptospira serovar hardjo genotipos para su uso en la prueba de aglutinación microscópica, *Journal Veterinaria*: 19(1):84-7.

Ido Y., Hoki R., Ito H., y Wani H. 1987. The rat as a carrier of Spirochaeta Icterohaemorrhagiae, the causative agent of Weil's disease (spirochetosis Icterohaemorrhagica). *J. Exp. Med.* 26:341-353.

Isogaí E. K., Hiroso K., Kimura K., Hayasy S., Kubota T., Fujii N, y Isogay H. 1997. Role of platelet – activating – factor (PAF) of cellular responses after simulation with leptospire lipopolysaccharide. *Microbiol. Immunol.* 41: 271-275.

Isogai E, H Isogai, Kurebayashi Y, Ito N: Actividades biológicas de lipopolisacárido Leptospira. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A]* 261:53-64, 1986.

James M. Donahue, Barbara J. Smith, Judy K. Donahoe, Cindy L. Rigsby, Robert R. Tramontin, Kockanda B. Poonacha, Mark A. Wilson, 1992, Prevalencia y serovariedades de leptospira implicada en abortos equinos en Kentucky central durante la temporada de foaling 1990. *Journal Veterinaria Diagn Invest* 4:279-284.

Jawetz, E., Melnick, I. y Edward, A. 1985. Espiroquetas y otros microorganismos espirales. *Manual de Microbiología Médica*, 9na Ed. 244-252.

Johnson, D.W., H.E.Brown, E.y H. Derrick. 1937. Enfermedad de weil en Brisbane. *Medicina J. Aust.* 1: 811-818.

Johnson R. C., y Faine S. 1994. Leptospira p. 62-67. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore. Md.3:6-10.

Johnson, R. C. V. y G. Harris. 1967. Diferenciación de los patógenos y las leptospira saprofitas. 1. Crecimiento a bajas temperaturas. *J. Bacteriol.* 94:27-31

Johnson, RC, J.Walby, RA Henry, y Auran NE. 1973. El cultivo de leptospiras parasitas: efecto de piruvato. *Appl. Microbiol.* 26:118-119

Jung BY, Lee KW, Ha TY, 2009, Seroprevalencia de leptospira spp. En las carreras de caballos clínicamente sanos en Corea, Febrero 2009, *Journal Veterinaria*, 72(2):197-201.

Kadis, S. And Pugh, W.L. 1974... Urea utilization by Leptospira. *Infect... Immun.*, 10:793-801.

Kalsow, C. M. and Dwyer, A. E. 1998. Retinal immunopathology in horses with uveitis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 6:239-251.

Kelly, P. W. 1998. Leptospirosis, p.1580-1587. In S. L. Gorbach, J. G. Bartlett, and N. R. Blacklow., *Infectious diseases*. 2ed W. B. Saunders Philadelphia. Pa.

Klarenbeek A., y Schuffner W. A. P. 1993. Het voorkomen van en afwijkend Leptospira-ras in Nederland. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* *Journal Veterinaria* 77:4271-4276.

Kmety. E. y H. Dikken. 1993. Clasificación de la especie leptospira interrogans y sus serovariedades de la historia. *Prensa de la universidad de Groningen, Groningen, países bajos. Journal Veterinaria* 5:1-8.

Laguna V. 2000. Leptospirosis. Módulos Técnicos. (Oficina General de Epidemiología /Instituto Nacional de Salud). Serie Documentos Monográficos. No 2. Lima. Recuperado el 20 de septiembre de 2007. Disponible en: www://ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf.

- Leonard FC, Quinn PJ, Ellis WA, O'Farrell K: Asociación entre el cese de leptospiruria en el ganado y los niveles urinarios de anticuerpos. *Vet Res Ciencia* 55:195-202, 1993.
- Letocart, M., Boerlin P., F. Boerlin Petzold, Goudet J., Baranton G. y P.Perolat. 1999. Estructura genética del género leptospira mediante electroforesis enzimática. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:231-238.
- Levet P. Leptospirosis. 2005. En Madel, Douglas and Bennett's. Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell GL, Bennett JE, eds. Dolin R, eds. fifth edition. *Journal Veterinaria* 2:5-19.
- Lewis FI, Gunn GJ, McKendrick IJ, Murray FM, 2009, Inferencia bayesiana para la prevalencia dentro de la manada de *Leptospira interrogans* serovar Hardjo usar la prueba de anticuerpos en la leche a granel. Julio 23 del 2009. *Journal Veterinaria*, 2:9-18.
- Luchesi, P. M., and Parma, A. E 1999. A DNA fragment of *Leptospira interrogans* encodes a protein which shares epitopes with equine cornea. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71:173-179.
- Mariya R, Chaudhary P, Kumar AA, Thangapandian E, Amutha R, Srivastava SK, 2006, Evaluación de un antígeno recombinante Lip41 de la leptospira *interrogans* serovar canicola en ELISA para diagnóstico serológico de la leptospira bovina, Nov 2006:29, *Journal Veterinaria* (5-6):269-77.
- McDonough P. L. 2001. Leptospirosis in Dogs-Current Status. Recent Advances in Canine Infectious Diseases, Carmichael L. International Veterinary Information Service, and Itkaka N.Y. Disponible en: www.IVIS.org.
- Merck, Manual de Veterinaria, El. 2000.5ta ed. Barcelona, España. Ed. Océano Grupo, 532-533
- Michna S.W.1970. Leptospirosis. *Vet. Rec.* 86, 484-496
- Moles Cervantes LP, Cisneros Puebla MA, Rosas DG, Serranía NR, Torres Barranca JI, 2002, El estudio serológico de Leptospirosis bovina en México, Jan 2002, *Journal Veterinaria* 54(1):24-7.
- Morrison WI, Wright NG: Leptospirosis canina: un estudio inmunopatológicos de la nefritis intersticial, debido a *Leptospira canicola*. *J Pathol* 120:83-89, 1976
- Nally JE, Chow E, Fishbein MC, 2005, Blanco República Dominicana, Lovett MA: Cambios en el lipopolisacárido antígeno O distinguir aguda o crónica *Leptospira interrogans* infecciones. *Infect Immun* 73:3251-3260.
- Nicodemo A. C., Duarte M. I. S., Alves V. A. F., Takakura C. F. H., Santos R. T. M., y Nicodemo E. I. 1997. Lung lesions in human Leptospirosis: microscopic, Immunohistochemical and ultra structural features related to thrombocytopenia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56:181-187.
- Niedermaier G, Wollanke B, Hoffmann R, Brem S, Gerhards H, 2006, La detección de leptospiras en el humor vítreo de los caballos sin enfermedades oculares y de los caballos con uveítis recurrente equina (ERU), utilizando microscopía electrónica de transmisión. Noviembre 2006, *Journal Veterinaria* 113(11):418-22
- Organización Mundial de la Salud.1999.Leptospirosis en todo el mundo. *Epidemiología*.
- Parma, A. E., Fernández, A. S., Santisteban, C. G., Bowden, R. A. And Cerone, S. I. 1987. Tears and aqueous humor from horses inoculated with *Leptospira* contain antibodies which bind to cornea. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 14:181-185
- Patterson, C. J. 2003. Distribución geográfica y endemismo de la Leptospirosis

en el hombre y los animales y su relación con el ecosistema de la Provincia Las Tunas. Tesis de maestría. Universidad de Granma, Cuba.

Pelezary, N.Y. y Reid, R.D. 1976. Leptospirosis. Microbiología. 445-446.

Perdomo, E. y Garin, A. 2002. Leptospirosis animal. En: Guía de Control y Manejo de Leptospirosis. OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.24-26

Pérez, Q., Dorado, E. y Borralló, L. 1982. Estudio de un foco de Leptospirosis Bovina en España. 10ª Conferencia de la Comisión regional de la O.I.E. para Europa. O.I.E. Londres.

Pierce, P. F., J.P.Utz, y la falta E. coli.1997. Leptospirosis, p. 615-619. En DH Connor, Chandler FW, Schwartz DA, Manz, HJ, y la falta EE (ed.), patología de las enfermedades infecciosas vol.1 Appleton y Lange, Stamford, Connecticut.

Prescott, J.F. 1993. Leptospirosis, In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N. (Eds.) Pathology of domestic animals. Academic Press, Inc, 4th edition. 503-511.

Postic, D., N.Riquelme-Sertour, F. Merien, P. Perolat y Baranton, G...2000. Interés de secuencias parciales de genes 16S DNA para resolver las heterogeneidades entre las colecciones de Leptospira: aplicación a L.meyeri. Res. Microbiol. 151:333-341.

Rajeev S, Berghaus RD, Overton MW, Pence ME, Baldwin CA, Comparativa de anticuerpos fluorescentes y la prueba de aglutinación microscópica de leptospira en las vacas embarazadas y no embarazadas. Junio 2010, Journal Veterinaria 22(1): 51-4.

Ramachandran S., y Perers M. V. F. 1997. Cardiac and pulmonary involvement in Leptospirosis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 71:56-59.

Ramadass, P., D.W.B.Jarvis, la esquina de RJ,D.Penny, Marshall y RB.1990. ADN relación entre las cepas de leptospira biflexa. Int. J. Syst. Bacteriol. 40:231-235.

Ramadass, P., D.W.B.Jarvis, la esquina de RJ, D.Penny, Marshall y RB. 1992. La caracterización genética de las especies patógenas de leptospira por la hibridación de ADN. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:215-219.

Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE, Detección y cuantificación de las Leptospirosis en la orina de los perros; un huésped de mantenimiento de la Leptospirosis enfermedad zoonótica. Octubre 29 2010, Journal Veterinaria (10): 1305-9.

Sağlam YS, Temur A, Aslan A, 2003, Detección de antígenos de leptospiras en el riñón y el hígado de los bovinos. Febrero 2003: Journal Veterinaria 110(2):75-7.

Sankar S, Harshan HM, Somarajan SR, Srivastava SK, Evaluación de una proteína recombinante LigB de leptospira interrogans serovar canicola en un ensayo de ELISA para el diagnóstico serológico de Leptospirosis bovina. Junio 2010, Journal Veterinaria 88(3): 375-8.

Schoonman L, Swai ES, Rebaño de animales y el riesgo a nivel de factores de Leptospirosis bovina en la región de Tanga Tanzania. Octubre del 2010, Journal Veterinaria 42(7): 1565-72.

Segura-Correa VM, Solis-Calderon JJ, Segura-Correa JC, 2003, Seroprevalencia y factores de riesgos para los anticuerpos de leptospiras en el ganado en el estado de Yucatan, Mexico. Agosto 2003: Journal Veterinaria 35(4): 293-9.

Senthilkumar TM, Subathra M, Ramadass P, Ramaswamy V, Diagnóstico serológico de Leptospirosis bovina por IgG-enzima inmunoensayo y la prueba de aglutinación en látex. Febrero 2010, Journal Veterinaria 42(2):217-22.

- Silverstein, C. M. 1953. Las manifestaciones pulmonares de leptospirosis. *Radiología* 61: 327-334.
- Sitprija V, Pipatanagul V, Mertowidjojo K, Boonpucknavig V, Boonpucknavig S: Patogénesis de la enfermedad renal en la Leptospirosis: estudios clínicos y experimentales. *Riñón Int* 17:827-836, 1980
- Stavitsky AB: Estudios sobre el mecanismo de resistencia del huésped en Icterohemorrágica Leptospirosis experimental. *J Immunol* 51:397-419, 1945
- Stokes A., Rile J. A., y Tytler W. H. 1987. Weill's disease (Spirochaetosis Icteric Hemorrhagica) in the British army in Flanders. *Lancet*: 142-153.
- Sugunan AP, Vijayachari P, Sharma S, Roy S, Manickam P, Natarajaseenivasan K, Gupte MD, Sehgal SC, Los factores de riesgo asociados con Leptospirosis durante un brote en medio Andaman, India, julio 2009, *Journal Veterinaria* 130(1): 67-73.
- Sullivan, N.D. 1974. Leptospirosis in animals and man. *Aus.Vet.J.* 50, 216-223
- Syfres, B. 1976. La Leptospirosis como problema de la salud humana y Animal en America Latina y del Caribe. *Publ. Cien # 316. OPS.Taylor K. A.,* Barbour A. G., y Thomas D. D. 1997. Pulsed field Gel electrophoreticanalysis of Leptospiral DNA. *Infect. Unmun.* 59: 223-329.
- Thiesmann, A.B. 1984. Leptospirosis: current developments and trends. *JAVMA* 184, 722-725.
- Thompson, J.C. And Manktelow, B.W. 1989. Pathogenesis of renal Lesions In haemoglobinaemic and non-haemoglobinaemic Leptospirosis. *J.Comp. Path.*, 101:201-214.
- Timoney, J...F., Gillespie, J.H., Scott, F.W. and Barlough, J.E. 1988. The Spirochetes, In: Hagan & Bruner's Microbiology and infectious diseases of Domestic animals. Comstock Publishing Associates, Ithaca, USA, 8th Edition, 45-57.
- Tucunduva de Faria M, Athanazio DA, EA Ramos Goncalves, EF Silva, MG Reis, Al Ko: Las alteraciones morfológicas en el riñón de las ratas con naturales y experimental Leptospira infección. *J Comp Pathol* 137:231-238, 2007
- Turner, L. H. 1970. Leptospirosis III. Mantenimiento, aislamiento y demostración de las leptospira. *Trans. R. Soc. Trop. Medicina Hyg.* 64:623_646
- Vanasco Norma y Sequeiro, G. 2000. Descripción de un brote de Leptospirosis en la Ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril, 1998. *Rev Pan. De la Salud Pública.* 7(1):35-40.
- Wang C., John L., Chang T., Heng W., Luo M., y Hung A. 1995. Studies on anicteric Leptospirosis. I. Clinical manifestations an antibiotic therapy. *Chin. Med. J.* 84:283-291.
- Yasuda, PH.AG Steigerwalt, Sulzer KR, Kaufmann AF, F. Rogers, y Brenner Dj. 1987. La relación entre el ácido desoxirribonucleico Serogrupos y serotipos en la familia de leptospiras con las propuestas de siete nuevas especies de leptospira. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:407-415.
- Yener Z, Keles H: inmunoperoxidasa y los exámenes histopatológicos de la nefritis Leptospirosis en el ganado. *J Med Vet a Physiol Pathol Med Clin* 48:441-447, 2001
- Zaki, S. R.,A.y R. Spiegel. 1988. Leptospirosis, p. 73-92. En AM Nelson, y CR Horsburgh (ed.), *Patología de las enfermedades emergentes 2.* American Society for Microbiology, Washinton, DC.

Zaki S. R., Shieh W.J., y the Epidemic Working Group. 1996. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. *Lancet* 347:535.

Zaltzman M., Kallenbach J. M., Goss G. D., Lewis M., Zwi S., y Gear J. H. S. 2001. Adult respiratory distress syndrome in *Leptospira canicola* infection. *BMJ*. 283:519-520

Zunino E. Z., y Pizarro R. P. 2007. Infectología al día. Leptospirosis puesta al día. *Rev. Chill. Infec.* 24(3): 220-225.