

15  
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE ANTICUERPOS  
FLUORESCENTES PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE  
Leptospira interrogans EN BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS VETERINARIAS

AREA DE MEDICINA PREVENTIVA

P R E S E N T A :

VICTOR MANUEL BANDA RUIZ

ASESORES

MVZ. JORGE TORRES BARRANCA PH.D

MVZ. LUIS MOLES Y CERVANTES DIPL.

MVZ. CARLOS ROSALES ORTEGA M EN C



MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y**

**ZOOTECNIA**

**ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE ANTICUERPOS  
FLUORESCENTES PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE  
*Leptospira interrogans* EN BOVINOS PRODUCTORES DE  
LECHE**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS VETERINARIAS**

**AREA DE MEDICINA PREVENTIVA**

**PRESENTA:**

**VICTOR MANUEL BANDA RUIZ**

**ASESORES:**

**MVZ. JORGE TORRES BARRANCA Ph.D**

**MVZ. LUIS MOLES Y CERVANTES DIPL.**

**MVZ. CARLOS ROSALES ORTEGA M en C**

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

**Por dame la alegría de vivir  
un nuevo día**

### **A ELIZABETH**

**Gracias por tu amor y comprensión  
y apoyo que me brindaste para  
realizar este nuevo logro de mi vida  
profesional y que me obliga  
a superarme día a día**

### **A VICTOR MANUEL**

**A ti Hijo ya que sin ti esta  
nueva meta no estaría  
completa**

**A ese pequeño ser que aun  
no nace pera ya vive en mi  
pensamiento**

### **A EFREN Y CAROLINA**

**Por su ayuda incondicional en todo  
momento, para obtener este logro en  
mi vida.**

### **A TOMAS Y REMEDIOS**

**Gracias por dame la vida**

### **A HECTOR FABRICIO**

### **A MIS HERMANOS**

**FRANCISCO  
TOMAS  
GLORIA  
CARLOS  
GUSTAVO  
Mª DEL REFUGIO  
JOSE  
EVARISTO**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco el apoyo brindado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias en especial a el Dr. Dióodoro Batalla director del Instituto, Dra. Camila Arriaga, Dr. Miguel A. Luna,**

**A los Médicos Veterinarios Zootecnistas y ganaderos del Complejo Agrícola Industrial de Tizayuca, que me permitieron tomar un poco de su valioso tiempo para el desarrollo de esta tesis.**

**Al Dr. Carlos Rosales Ortega, por su Tiempo siempre valioso que le dedicó a esta tesis.**

**Al Dr. Jorge Torres Barranca. gracias por su amistad y apoyo que siempre me ha brindado.**

**Y SIN EMBARGO SE MUEVE**  
(GALILEO GALILEI)

## CONTENIDO

RESUMEN .....	
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODOS .....	8
RESULTADOS.....	16
DISCUSION.....	21
BIBLIOGRAFIA.....	27
CUADROS.....	31

## RESUMEN

BANDA RUIZ VICTOR MANUEL. Estandarización de la técnica de anticuerpos fluorescentes para determinar la presencia de *Leptospira interrogans* en bovinos productores de leche. (Bajo la dirección de Jorge Torres Barranca, Luis P. Moles y Cervantes y Carlos Rosales Ortega).

El objetivo de este trabajo fue el de estandarizar la técnica de Anticuerpos Fluorescentes (AF), para ser empleada como herramienta en el diagnóstico de la leptospirosis bovina. El suero hiperinmune empleado en el conjugado se preparó utilizando dos cepas de *Leptospira interrogans* de reciente aislamiento en México denominadas Palo Alto (PA) y UAM, ambas virulentas. Para demostrar la capacidad diagnóstica de los dos conjugados se inocularon cuyes con la cepa PA, UAM y con medio de cultivo sin leptospiros realizando lotes de 39 cuyes cada uno, obteniendo una sensibilidad del 97.4% para el conjugado PA y 100% para el conjugado UAM, la especificidad y el valor predictivo de ambos conjugados fue del 100%. Para observar el comportamiento de los conjugados en condiciones de campo se tomaron muestras de orina y sangre al azar de 325 bovinos de la cuenca lechera de Tizayuca, encontrando una reacción positiva a la prueba de AF del 11% al conjugado PA y del 6% al conjugado UAM. Se hace mención que la Técnica de AF solo detectó animales positivos a leptospira en las muestras de orina de los bovinos. Por otra parte la técnica de AF demostró ser más eficaz que la prueba biológica.

## INTRODUCCION

El diagnóstico de la infección por leptospira en el humano, animales domésticos y salvajes puede ser realizado a través de métodos bacteriológicos, microscópicos o serológicos (11,16). Los dos primeros demuestran la presencia de leptospiras y la última detecta a los anticuerpos específicos. Generalmente el aislamiento bacteriológico de leptospiras a partir de muestras de tejidos y/o fluidos es el método más preciso para demostrar la infección por este microorganismo en cualquier especie susceptible, sin embargo, éste tiene las siguientes desventajas: la frecuente contaminación de la muestra, la necesidad de contar con leptospiras viables en las muestras, tener medios específicos y sustancias químicas inhibitorias del crecimiento bacteriano contaminante y por último, consume demasiado tiempo y podría significar un riesgo de infección para el personal del laboratorio (28, 29, 31). Las pruebas microscópicas como la observación de leptospiras en campo oscuro también requiere leptospiras viables y personal de laboratorio capacitado (16). Por otro lado, la detección de anticuerpos específicos contra leptospira es una técnica relativamente fácil y adecuada. A pesar de que es muy sencilla y rápida no determina el estado de convalecencia o portador en los animales con problemas de leptospirosis (28, 36).

Dentro de las pruebas serológicas la técnica de Aglutinación Microscópica (AM), es a nivel mundial el método de diagnóstico que más se utiliza para los casos de leptospirosis además se emplea para valorar a otras pruebas, debido a su sensibilidad, ya que es serovariedad específica (3, 20, 26, 40); sin embargo ésta tiene algunas desventajas

como son la necesidad de contar con una amplia batería de antígenos que sean representativos de los serogrupos más importantes en la región o país, los antígenos deben ser cultivos jóvenes y vivos lo que también representa un riesgo de exposición para el personal del laboratorio (1, 28, 31, 32, 36, 37, 40), además de que esta prueba no es determinante a cerca del estado clínico del animal (portador sano o convaleciente).

En la actualidad se han utilizado otras pruebas tamiz como alternativa: Aglutinación Macroscópica, Hemaglutinación Pasiva, que son menos sensibles a la AM; así mismo, se comienza a establecer el diagnóstico por los métodos de ELISA (13), Hibridación del ADN (26), DIG ELISA (13) y Aglutinación en Microcápsula (3).

Por otra parte, dentro de los métodos de microscopía se encuentran las Tinciones Argénticas y la técnica de Anticuerpos Fluorescentes aplicadas en el diagnóstico de la leptospirosis.

La técnica de Anticuerpos Fluorescentes (AF), ha demostrado ser uno de los métodos microscópicos más específicos y versátiles en el diagnóstico de varias enfermedades desde 1930 (12), ya que permite la localización de microorganismos en materiales biológicamente importantes; puesto que detecta la presencia de antígenos en tejidos frescos o preservados en formaldehído, glicerina e inclusive congelados, que provengan ya sea de biopsias y necropsias (12, 18); Algunas de las características de la técnica de AF son: posee una alta sensibilidad y se asemeja a la de fijación del complemento y una especificidad elevada ya que la proteína obtenida de las gamaglobulinas es de alta afinidad para reconocer al

antígeno para las cuales fueron preparadas. El procedimiento y examen microscópico, pueden ser realizados en corto tiempo (1 ó 2 hrs), siendo por lo tanto mucho más rápida que el aislamiento o pruebas serológicas (2, 8, 12).

La técnica de AF se ha empleado en el diagnóstico de leptospirosis desde 1953 (12), su uso ha ayudado a identificar animales enfermos y a portadores sanos, ya que ésta técnica detecta a el antígeno sin necesidad de recurrir al aislamiento lo que permite a la vez, establecer medidas de control y tratamiento de la enfermedad con mayor rapidez (2, 9, 12, 14, 17, 20, 33).

Ellis (17, 18, 20) entre 1982 y 1985 utilizó la técnica de AF con fines diagnósticos empleando a su vez el aislamiento y la serología por AM en muestras de fetos de ovinos recolectados en el rastro, demostrando que la técnica de AF fue más efectiva que las otras dos.

En algunos países tradicionalmente la leptospirosis se ha diagnosticado mediante técnicas serológicas, observación directa al microscopio de campo oscuro y ocasionalmente se han utilizado métodos de aislamientos bacteriológico (8, 10, 18). En México el diagnóstico de la leptospirosis se realiza en muy pocos laboratorios y en su mayoría se localizan en el Distrito Federal y en ellos el análisis de rutina es la prueba de AM.

La serología de leptospirosis realizada en México data desde 1920 con estudios realizados por Noguchi, en el Estado de Yucatán. En 1958

Varela realizó un muestreo en sueros, de los cuales resultaron positivos el 20% para las serovariedades *icterohaemorrhagiae*, *pomona* y *canicola* (39). En 1961 Varela y Zavala encontraron 2.8% de seropositividad en una muestra de sueros humanos en la Cd. de Mérida, Yucatán. Un año mas tarde los mismos autores publicaron el hallazgo de aglutininas contra las serovariedades *canicola* y *pomona*, en el 10.7% de muestras de suero sanguíneo de enfermos ictericos pertenecientes a una población rural (42).

De 1968 a 1970, González y Ortega, realizaron estudios serológicos de leptospirosis en porcinos y bovinos, detectando anticuerpos contra leptospira en porcinos para las siguientes serovariedades: *bratislava*, *pomona*, *icterohaemorrhagiae*, *ballum*, *sejroe* y *autumnalis*; y en bovinos contra las serovariedades: *wolffi*, *hardjo*, *sejroe*, *icterohaemorrhagiae*, *hebdomadis*, *canicola*, *pomona*, *ballum* y *medanensis* (22).

En 1976, León realizó pruebas de AM en 2352 sueros de animales domésticos ( bovinos y porcinos), para detectar anticuerpos contra leptospira y reportó que las serovariedades más frecuente encontradas en ganado bovino fueron: *hebdomadis*, *pomona* y *tarassovi*; y en ganado porcino: *canicola*, *pomona* y *tarassovi* (24).

Banda *et al*, en 1985, determinaron la presencia de anticuerpos en sueros de bovinos y porcinos provenientes de 9 Estados de la República Mexicana y encontraron el 35.8% de bovinos reactivos positivos y 28.84% de sueros porcinos reactivos positivos (5).

El mismo autor en 1992 (6) realiza un estudio serológico retrospectivo de 1987 a 1991 reportando los siguientes resultados: de 3,293 sueros de bovinos con problemas reproductivos provenientes de 19 Estados de la República Mexicana fueron positivos 1,561 sueros (47.4%) y las serovariedades de mayor frecuencia de leptospira fueron **wolffi** , **hardjo**, **tarassovi** y **pyrogenes**.

En 1992 (21) González realiza un estudio tendiente a conocer la frecuencia de anticuerpos antileptospira en bovinos lecheros en tres municipios del estado de Jalisco con los siguientes resultados de un total de 216 sueros 81 (37.5%) fueron positivos a las serovariedades **wolffi** (22.68%), **hardjo** (22.22%) y **tarassovi** (21.29%).

En cuanto a los aislamientos reportados en México de 1980 a la fecha, solo se han logrado dos, uno en 1988 , en donde un grupo de investigadores, aísla un cepa de **Leptospira interrogans** a partir de un feto abortado por un bovino procedente del Complejo Agrícola Industrial de Tizayuca. Posteriormente en 1990, se logra otro aislamiento de leptospira a partir del riñón de un perro con sintomatología clínica sospechosa a leptospira.

Ambas cepas fueron tipificadas por Enzimas de Restricción, por la Dra. Carole A. Bolin del Nacional Animal Disease Center en Ames, Iowa. E.U.A. resultando la aislada de un feto, del serogrupo Sejroe serovariedad **hardjo** cepa hardjo-prajitno y la segunda, aislada del riñón de un perro, del serogrupo Icterohaemorrhagiae serovariedad **icterohaemorrhagiae**.

Como lo demuestran las investigaciones antes mencionadas la serología en los problemas de leptospirosis es de suma importancia como método de diagnóstico, ya que ayuda a conocer la distribución de las cepas en una determinada región y esta es a través de la prueba de AM; pero este método no es totalmente concluyente debido a que no detecta con precisión a los animales clínicamente enfermos o portadores y porque muchas veces al inicio de la infección se presenta con ausencia de anticuerpos (19, 23, 25, 30, 35); así como también, en algunos casos la serología podría indicar antecedentes de vacunación. Por otra parte se ha reportado (34), que bovinos infectados experimentalmente, han resultado negativos a la prueba de AM después de un año de la infección. por lo que se requiere confirmar el diagnóstico con el aislamiento del microorganismo, así como, la tipificación de las serovariedades que afectan a la población susceptible; pero como esto consume demasiado tiempo además de ser un microorganismo difícil adaptar en medios específicos de laboratorio y sobre todo la serovariedad *hardjo* la cual el bovino es el hospedero principal (16, 18) lo que hace a este método complicado.

Es así, que si la técnica de AF aplicada al diagnóstico de leptospirosis, pudiera diferenciar a los animales infectados de los sanos y podría contribuir a la disminución de los problemas en la identificación de animales portadores en un hato y evitar la difusión a la población susceptible por medio de medidas de control rápidas y adecuadas.

Por lo tanto, los objetivos de presente trabajo fueron: estandarizar la técnica de Anticuerpos Fluorescentes y utilizarla como método

diagnóstico de la leptospirosis en bovinos lecheros para identificar animales infectados por leptospira en el Complejo Agrícola Industrial de Tizayuca (CAIT).

Evaluar la sensibilidad, especificidad y el valor predictivo de la técnica de Anticuerpos Fluorescentes en forma experimental inoculando cuyes con cepas de *Leptospira interrogans* virulentas.

Observar el comportamiento de la técnica de Anticuerpos Fluorescentes con respecto a la prueba serológica de Aglutinación Microscópica (AM) y bacteriológica en cuyes inoculados experimentalmente.

Evaluar la técnica de Anticuerpos Fluorescentes en bovinos con la enfermedad adquirida en forma natural en el CAIT.

## MATERIAL Y METODOS

A partir de dos cepas de *Leptospira interrogans* denominadas cepa Palo Alto (PA) serovariedad *icterohaemorrhagiae* y cepa UAM serovariedad *hardjo*, se elaboraron dos conjugados específicos para la detección de leptospira en bovinos lecheros.

El trabajo experimental se dividió en tres fases: En la primera se preparó el conjugado a partir de sueros hiperinmunes producido en conejos; en la segunda, se probó la sensibilidad, especificidad y el valor predictivo de la técnica de Anticuerpos Fluorescentes (AF) en animales de laboratorio, inoculados experimentalmente con las mismas cepas de leptospiras utilizadas en la elaboración del conjugado y en la última fase se realizaron las pruebas de campo del conjugado en bovinos productores de leche del Complejo Agrícola e Industrial de Tizayuca (CAIT).

### Fase 1.- Elaboración del conjugado.

Preparación del antígeno. Cada cepa de leptospira fue cultivada en volúmenes de 600 ml. por semana en medio líquido de Cox modificado (41), adicionado con 8% de suero descomplementado y estéril de conejo; incubado a 30 C. Al séptimo día después de sembrado se revisaron los cultivos y se realizó un conteo de bacterias por ml. de cada cepa, obteniendo en promedio cultivos de  $1.5 \times 10^8$  células /ml. Se procedió a inactivarlas con formaldehído al 0.2% (concentración final ) y se centrifugaron a 18.000 r.p.m. durante 30 min. El sedimento se lavó en dos

ocasiones con solución salina fisiológica (SSF), pH 7.2., centrifugándolo nuevamente a 18,000 r.p.m. (20).

Producción de suero hiperinmune. El suero hiperinmune para las dos cepas de leptospira se preparó en conejos de la raza Nueva Zelanda de aproximadamente 3 Kg. de peso; empleando tres conejos para cada cepa, de acuerdo al esquema de inmunización planteado por Ellis (20), utilizando únicamente antígenos inactivados.

No. SEMANA	ml.	VIA DE INOCULACION
0	2.5ml.	Intraperitoneal
1	2.5ml.	Subcutánea
2	2.5ml.	Intraperitoneal
3	2.5 ml.	Subcutánea
4	2.5 ml.	Intraperitoneal
5	2.5 ml.	Subcutánea
6	2.5 ml	Intravenosa
7	2.5 ml.	Intravenosa
8	2.5 ml.	Intravenosa
9	2.5 ml.	Intravenosa
10	2.5 ml.	Intravenosa
11	2.5 ml.	Intravenosa

A la semana 12 post inoculación (pi), se tomó una muestra de sangre de la vena marginal de la oreja a los conejo inoculados y se procedió a su titulación por la técnica de AM; una vez conocido el título de anticuerpos en el suero los conejos fueron sangrados en blanco. La sangre se

centrifugó a 5,000 r.p.m. y el suero fue debidamente identificado y almacenado a -40 C hasta la preparación del conjugado.

Para precipitar las gamaglobulinas se tomaron 40 ml de cada uno de los sueros hiperinmunes de conejo. Las gamaglobulinas fueron precipitadas con una solución saturada de sulfato de amonio (78 g/100ml de agua destilada pH 7) volumen sobre volumen, a 4 C durante 24 hrs. La mezcla fue centrifugada a 6,000 r.p.m., durante 15 min; decantando el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado con agua destilada estéril agregando solo la mitad de lo que se descartó. Se volvió a precipitar con sulfato de amonio durante 2 hrs. en refrigeración, se procedió a centrifugar a 6,000 r.p.m. durante 15 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió con agua destilada estéril, con un volumen igual a la mitad del volumen original (40 ml) del suero. Esta solución de globulinas se colocó en una membrana de diálisis. Se procedió a dializar la solución en tres litros de solución salina fría cambiando la solución cada 6 horas. Para controlar que la diálisis se haya completado, se colocó en un tubo de ensaye partes iguales (2 ml) de la solución salina y solución de cloruro de bario. La diálisis se completa cuando no se forma precipitado con el cloruro de bario. Posteriormente se procedió a conocer la cantidad de proteínas totales, determinada por el método de Lowry (27). después de determinar la cantidad de gamaglobulinas presentes, se procedió a incorporar el isotiocianato de fluoresceina a la solución de gamaglobulinas a razón de 0.28 mg./ml de proteína, agregándolo poco a poco en un período de 3 a 4 hrs. Esta mezcla se deja en refrigeración durante 24 hrs. Para eliminar el exceso de fluoresceina la solución se colocó en una membrana de diálisis. La membrana se colocó en un

matraz con solución salina en refrigeración durante 3 ó 4 días, dializando hasta que la solución salina se mantuvo clara. Posteriormente el conjugado fue pasado a través de una columna de vidrio con Sephadex G 25 para separar las gamaglobulinas conjugadas con isotiocianato de las no conjugadas.

Después el conjugado se almacenó en alícuotas de 2 ml. a -40 C hasta su uso.

Posteriormente se determinó la dilución de trabajo del conjugado para lo cual se prepararon diluciones decuples hasta 1:10,000 y se evaluó haciendo preparaciones con leptospira con las cepas Palo Alto y UAM de la siguiente manera: en porta objetos se colocaron leptospiras de cada una de las cepas y se dejaron secar al aire, posteriormente se fijaron en acetona durante 30 minutos, después se lavaron las laminillas sumergiéndolas en agua destilada, posteriormente se marcó las zonas donde estaban las improntas de leptospiras con un lápiz grasoso. Realizado todo lo anterior se colocaron en cada una de las zonas marcadas, conjugado homólogo de cada cepa con la dilución decuple y se incubaron a 37 C durante 30 min en cámara húmeda.

Después de conocer la dilución óptima de trabajo se realizaron preparaciones de la misma manera como se mencionó anteriormente contra otros microorganismos como *E. coli*, *Salmonella spp.* Cabe mencionar que ambos fueron negativos a la técnica de AF.

## Fase 2 Valoración experimental de la técnica de Anticuerpos Fluorescentes en cuyes.

Se formaron tres lotes de 39 cuyes cada uno, los cuales fueron inoculados por vía intraperitoneal, con 0.5 ml. de cepa viva de leptospira cepa PA y UAM excepto el lote control que se inoculó con 0.5 ml. de medio de cultivo sin leptosiras.

De cada lote se sacrificaron 2 cuyes cada 24 hrs. post inoculación (pi), continuando el sacrificio diariamente hasta el día 19 pi. De cada cuye sacrificado o muerto por la infección, se colectaron las siguientes muestras: riñón, hígado, pulmón, sangre y orina. Estas muestras se trabajaron de la siguiente forma: los órganos (riñón, hígado y pulmón) se dividieron en dos porciones, la primera se utilizó para sembrarla en medios selectivos para leptospira (Kortoff, Cox y EMJH) (15), lo cual consistió en lo siguiente se tomó una muestra de cada órgano y se flameó en un mechero, posteriormente se colocó en un mortero agregando 8 ml de una solución de fosfatos pH 7.2 y se maceró. Después de esto se colocaron 2 gotas de esta mezcla en los medios de cultivo antes mencionados. La segunda porción de la muestra se utilizó para realizar improntas de cada muestra para ser analizadas por AF de la siguiente manera: en un abatelenguas se colocó una porción de las muestras de los órganos y se realizaron tres improntas de cada muestra en un porta objetos se identificaron con la siguiente información: número de cuye sacrificado, tipo de muestra y cepa inoculada, se dejaron secar al aire y se sumergieron en acetona fría durante 30 min. Después se lavaron en agua destilada durante 1 min, se secaron al aire y se marcaron con un

lápiz grazo, se le agregó una gota de conjugado homólogo a cada muestra y se incubó durante 30 min a 37 C en cámara húmeda.

Las muestras de los cuyes no infectados fueron sembradas en los medios de cultivo y en estas muestras se realizaron seis improntas tres para cada conjugado (PA Y UAM).

Las muestras de fluidos de los cuyes inoculados fueron sangre y orina. De la sangre se tomó una parte y se realizó un frotis para la técnica de AF, siguiendo el mismo procedimiento para el uso del conjugado descrito anteriormente. Se sembraron dos gotas de sangre en medio de cultivo para intentar el aislamiento y finalmente se centrifugó a 3,000 r.p.m., para obtener suero y realizar la prueba de A.M. Por otra parte las muestras de orina fueron obtenidas por punción de la vejiga al momento del sacrificio y se dividió en dos porciones la primera para intentar el aislamiento y la segunda para la técnica de AF la cual consistió en realizar un frotis de la orina, el demás procedimiento ya se ha mencionado anteriormente.

Todo lo anterior fue utilizado para conocer la sensibilidad, especificidad y el valor predictivo. Las fórmulas de estos valores son los siguientes sensibilidad  $a/a+c$ ; especificidad  $d/b+d$  y el valor predictivo es  $a/a+b$  en donde:

		INOCULADOS	NO INOCULADOS	
PRUEBA DE AF	+	A	B	A+B
	-	C	D	C+D
		A+C	B+D	

  

SENSIBILIDAD	$\frac{A}{A+C}$	ESPECIFICIDAD	$\frac{D}{B+D}$	VALOR PREDICTIVO	$\frac{A}{A+B}$
--------------	-----------------	---------------	-----------------	------------------	-----------------

- A) Es igual a los verdaderos positivos detectados por la prueba
- B) Es igual a los falsos positivos, detectados por la prueba
- C) Es igual a los falsos negativos, detectados por la prueba
- D) Es igual a los verdaderos negativos detectados por la prueba

Fase 3.- Pruebas de campo del conjugado, en bovinos del Complejo Agrícola e Industrial de Tizayuca (CAIT).

Una vez estandarizada y evaluada la técnica de AF en condiciones de laboratorio, se aplicó bajo condiciones de campo, en bovinos del CAIT. Para determinar el tamaño de muestra de esta fase se siguió el método descrito por el Centro Panamericano de Zoonosis (10),

$$n = \frac{p(100-p)4}{mep^2} \cdot 100$$

En donde

n= a el tamaño de la muestra

p = prevalencia estimada

100-p = 100- prevalencia estimada

4= factor que determina el grado de confianza

mep<sup>2</sup>=margen de error por la prevalencia estimada

100 = constante

La prevalencia de leptospirosis en el CAIT, se obtuvo de datos obtenidos en 1990 (4) la cual correspondió en promedio al 46%. Por lo tanto, el Tamaño de muestra para este estudio fue de 325 bovinos pertenecientes a 64 establos del CAIT.

Se tomaron muestras de orina y sangre de 5 bovinos por establo, el muestreo fue al azar, la sangre fue tomada del paquete vascular anocaudal, con equipo vacutainer nuevo, la muestra de orina se obtuvo por estimulación de la vulva y la muestra se tomó a la mitad de la micción y se colectó en frascos estériles.

En el laboratorio la sangre se sembró en medios selectivos (mencionados anteriormente), se realizó un frotis para la técnica de AF como se describió anteriormente, se obtuvo el suero centrifugando la sangre a 3,000 r.p.m.. durante 15 min. para realizar la prueba de A.M. La orina se sembró y se fijó para su diagnóstico por AF de la misma manera que se describió anteriormente.

Las muestras de sangre y orina destinadas a la técnica de AF se trabajaron inmediatamente, los medios de cultivo con las muestras fueron observadas durante cuatro semanas y los sueros se congelaron a -20 C hasta su uso en el laboratorio

## RESULTADOS

En la etapa de elaboración del conjugado se obtuvieron los siguientes resultados el título de anticuerpos alcanzado en la mezcla de sueros hiperinmunes en conejos fueron: para la cepa PA 1:12,800 y para la cepa UAM 1:6,400; la cantidad de proteína en estos sueros por la técnica de Lowry fue de 32 y 26.8 mg./ml para los sueros hiperinmunes Palo alto y UAM respectivamente (cuadro 1).

La dilución óptima de trabajo fue de 1:100 para el conjugado PA y 1:10 para el conjugado UAM, teniendo estos una intensidad adecuada de fluorescencia (cuadro 2).

Los dos conjugados fueron confrontados contra *Salmonella spp.* y *E. coli spp.* resultando estas negativas a la prueba de AF.

En el cuadro 3 se muestran los resultados de la fase experimental en la que se inocularon cuyes, se encontró que de 39 animales infectados con la cepa PA 38 fueron positivos con una sensibilidad del 97.4%. Mientras que los resultados correspondientes a los animales inoculados con la cepa UAM, los 39 cuyes fueron positivos al conjugado respectivo dando un 100% de sensibilidad. La especificidad y el valor predictivo en conjugados fue del 100% respectivamente. Cabe añadir que la prueba de AF para ambos conjugados fue capaz de detectar animales positivos a partir del primer día post inoculación (Pi), hasta el día 19 que duró el experimento (cuadro 5 y 6)

El cuadro 4 muestra los resultados de sensibilidad y especificidad de la técnica de AF contra el Aislamiento Bacteriológico (AB) cuando se aplicaron a cada una de las muestras de los cuyes inoculados con las cepas PA y UAM en donde se ve que ambos conjugados tuvieron valores de sensibilidad par AF relativamente bajos. A este respecto se puede observar que para el conjugado PA el máximo valor fue para el hígado con un 61.4% de sensibilidad, mientras que para el conjugado UAM, la sensibilidad máxima observada fue en sangre con un 69.2%. En lo que respecta a la sensibilidad del AB se observa que excepto para el riñón, todos los valores obtenidos fueron inferiores al 50%. Por lo que toca a la especificidad se ve que para ambas técnicas fue del 100%.

Al comparar el número de aislamientos en cuyes inoculados con la cepa PA contra la técnica de AF (cuadro 5), se encontró que 28 veces ambas pruebas coincidieron (+/+); 10 veces la técnica de AF fue positiva y la prueba AB negativa (+/-) y en una sola ocasión fue fluorescencia negativa aislamiento positivo (-/+).

De la misma forma se comparó el aislamiento de la cepa UAM contra la técnica de AF a partir de cualquier muestra de cuyes inoculados la una cepa homóloga (cuadro 6) y se encontró que 29 veces ambas pruebas se encontraban positivas (+/+), 10 veces resultó AF positiva, AB negativo (+/-), en este caso ningún cuye fue negativo a la técnica de AF.

En el cuadro se observa la comparación de los resultados de las pruebas de AF y de AB en diferentes muestras de los 39 cuyes inoculados con leptospira cepa PA. Como se nota la técnica de AF fue capaz de

identificar en la sangre de los cuyes inoculados con esta cepa en 21 de 39 animales (54%), mientras que por la técnica de AB en solo 12 de 39 cuyes se logró recuperar al microorganismo. La concordancia de resultados positivos o negativos para ambas pruebas fue observada en 20 de los 39 cuyes inoculados (52%). En lo que respecta a los resultados de las muestras de hígado, la técnica de AF identificó a 23 /39 cuyes (59%) y la de AB 7/39 (18%) teniendo concordancia de resultados en 15 de 39 ocasiones. En pulmón la técnica de AF demostró la presencia de leptospira en 20 ocasiones (52%) y la prueba de AB en 12 de 39 veces (31%), y ambas pruebas coincidieron en 21 veces (54%). La presencia de leptospiras en riñón detectadas por la técnica de AF se demostró en 19 ocasiones (49%) y por la prueba de AB 11 veces (29%); la reciprocidad de ambas pruebas en 19 ocasiones. Por último las muestras de orina positivas a la técnica de AF fueron 21 /39 (54%), mientras que por la prueba de AB solo se logró recuperar la cepa en 4 ocasiones (10%), coincidiendo ambas pruebas en 20 ocasiones (52%).

En el cuadro 8 de la misma manera se muestran los resultados obtenidos por muestra de cada uno de los 39 cuyes infectado con la cepa UAM en donde se demuestra que en 28 (72%) ocasiones fueron positivas las muestras de sangre a la técnica de AF y 9 (23%) a la prueba de AB concordando 16 (41%) ocasiones. La demostración de leptospiras en hígado, pulmón y riñón por la técnica de AF fue de 24 /39 veces (62%) y la recuperación de la cepa por AB en 18 ocasiones (42%) en hígado, 14/39 (36%) en pulmón y 19/39 (49%) en riñón; la concordancia entre ambas técnicas fue en 25, 21 y 28 ocasiones para hígado, pulmón y riñón respectivamente. Por último 16 (41%) muestras de orina fueron positivas a

AF y 7 (18%) a AB; la similitud en los resultados de ambas técnicas se demostró en 20 ocasiones.

En el cuadro 9 se muestran los resultados de la prueba de Aglutinación Microscópica (AM) en los sueros de los cuyes inoculados con las cepas PA y UAM de acuerdo a los días post inoculación. Como puede observarse, 16 de los 39 cuyes fueron positivos a la cepa PA (41%), mientras que 20 de los 39 animales fueron positivos a la cepa UAM (51%). La seroconversión se presentó a partir del día 5 Pi para la cepa PA y al día 4 Pi para la cepa UAM. Cabe señalar que el título máximo de anticuerpos de los cuyes inoculados con la cepa PA se alcanzó al día 11 Pi con un título de 1:3200 y para los inoculados con la cepa UAM al día 4 Pi.

Los resultados de la fase de campo se muestran en el cuadro 10, en donde se observa el número de establos que resultaron positivos a las diferentes pruebas que fueron sometidos los 5 animales de cada uno de estos para el diagnóstico de leptospira. Se observa que para la prueba serológica de AM con ambas cepas como antígenos (PA y UAM) 42/65 (64.6%), fueron positivos en donde al menos un animal fue positivo a esta técnica diagnóstica; 20 de 65 (30.8%) establos tuvieron animales positivos a la Observación Microscópica (OM) de leptospiras en muestras de orina; en 25/65 (38.5%) establos se tuvieron observaciones de leptospira en orina por medio de la técnica de AF con el conjugado PA y 20 de 65 establos (30.8%) fueron positivos a AF con el conjugado UAM. Por último 47/65 establos (72.3%), al menos un animal fue positivo a cualquiera de las pruebas diagnósticas mencionadas.

En el cuadro 11 se muestran los resultados de los diagnósticos aplicados a las vacas del CAIT con lo cual se muestra que en Tizayuca se encontró una seroprevalencia del 6.7% para la cepa Palo Alto y 28% para la cepa UAM. Los animales que fueron positivos a la técnica de AF conjugado Palo Alto 10.1% y UAM 5.8%; y en cuanto a las veces que se pudieron observar leptospiras al microscopio de campo oscuro fue un 8.3%. La discrepancia de los resultados observados en este cuadro será comentada en el capítulo de discusión.

## DISCUSION

La detección de leptospiras en bovinos a partir de muestras de orina y/o sangre (dependiendo de la fase de la infección), podría ayudar a reducir la difusión de la enfermedad, proponer tratamientos oportunos en los animales enfermos así como medidas de prevención en los animales susceptibles.

En este estudio se demostró la alta sensibilidad y especificidad que tiene la técnica de AF, ésto se confirmó con los resultados obtenidos en la fase experimental, en donde se muestra que la técnica de AF fue más rápida en demostrar al microorganismo que el aislamiento, por otro lado, detectó mas veces leptospiras que la observación microscópica. Aunque la serología fue el diagnóstico que determinó anticuerpos en una mayor frecuencia de animales en la muestra, ésta no necesariamente refleja el estado de portador o convalecencia del bovino positivo a esta prueba (16).

El primer inconveniente que se encontró al tratar de montar la técnica de AF fue al elaborar los sueros hiperinmunes, ya que se tuvieron que realizar varios ensayos para obtener los sueros hiperinmunes de calidad, porque de ésto dependía el éxito o fracaso de dicha técnica diagnóstica. Cabe mencionar que los títulos obtenidos (cuadro 1), son mayores o iguales a los reportados por otros autores que han trabajado con dicha técnica diagnóstica (2, 9, 12, 14, 19).

Las diluciones de trabajo (cuadro 2), fueron consideradas satisfactorias para ambos conjugados porque al momento de hacer las observaciones al microscopio de epifluorescencia permitía observar sin ninguna dificultad a las leptospiras presentes en muestras de cuyes en la fase experimental o en orinas de los bovinos de la fase de campo.

Los valores obtenidos en cuanto a sensibilidad para los conjugados PA y UAM fueron de 97.4 y 100% respectivamente; ésto representa que estos biológicos tienen un buen nivel diagnóstico en cuanto a determinar a los verdaderos infectados con leptospira. La especificidad para ambos conjugados fue del 100%, lo que revela la capacidad que tiene la técnica de AF para demostrar que los animales están infectados con *Leptospira spp* o dicho en otra forma no se encontraron falsos negativos en las muestras de órganos y/o fluidos de los cuyes infectados en la fase experimental de este estudio. Por último el valor predictivo de la prueba fue del 100%, indicando que la prueba es confiable a una prevalencia del 50% como en el caso de la fase experimental de este estudio. Estos datos de sensibilidad, especificidad y valor predictivo se obtuvieron cuando al menos una muestra de órgano y/o fluido de los cuyes inoculados en forma experimental fueran positivas lo que concuerda con otros investigadores (9, 14, 19).

Al analizar los resultados por grupos de muestras de los cuyes (sangre, hígado, pulmón, riñón, u orina), la sensibilidad disminuyó considerablemente, no así la especificidad (cuadro 4), la cual se mantuvo en 100% para ambos conjugados. Esta disminución de la sensibilidad de la técnica de AF por órgano o fluido probablemente se debió a que en la

fase de la enfermedad en la que fueron tomadas las muestras los órganos más afectados fueron los hígados de los animales inoculados y por lo tanto también se detectó leptospira en sangre en el caso de ambos conjugados. En el caso del conjugado PA las muestras de sangre e hígado tuvieron una sensibilidad con el 56 y 61% respectivamente; en el caso del conjugado UAM las mismas muestras mostraron una sensibilidad de 69 y 61% respectivamente. Con esto se puede decir que en estos animales la leptospirosis se presentó en forma aguda afectando ambas cepas al hígado y por consiguiente se detectó a la leptospira en sangre en forma septicémica con lo que se corrobora lo publicado por Ellis (16), en donde menciona que en casos de leptospirosis aguda el órgano que se ve más afectado es el hígado. Cabe hacer mención, que al intentar recuperar las cepas inoculadas en los cuyes por aislamiento, solo se logró en más de un 50% en las muestras de riñón de los cuyes inoculados con la cepa UAM, siendo todas las demás recuperaciones inferiores a el 40%. Con ésto se puede deducir que, a pesar de que la sensibilidad se ve disminuida en ambos conjugados es mejor emplear la técnica de AF que el aislamiento.

La efectividad de la técnica de AF con respecto a el aislamiento quedó demostrada (cuadro 7), ya que solo en 12 cuyes se pudo recuperar la cepa PA de sangre y pulmón representando solo el 31% de los animales inoculados, mientras que por la técnica de AF se demostró a la leptospira en más del 50% de las muestras excepto en riñón (49%), además de que la contaminación de la muestra no fue un factor importante en la técnica de AF que pudiera alterar los resultados obtenidos, esto también está demostrado anteriormente por otros

investigadores (19, 38). Esta comparación demuestra el valor diagnóstico que tiene la técnica de AF con respecto al aislamiento y más si se toma en cuenta que las cepas de leptospira empleadas para la infección de los animales de laboratorio, están ya adaptadas a los medios de cultivo que se emplearon para la recuperación de las mismas a partir de los animales inoculados.

Una vez valorada la técnica de AF, se procedió a probarla bajo condiciones de campo aplicándola en muestras de orina y sangre de bovinos lecheros del CAIT; la intención de evaluar a ésta técnica diagnóstica solo en éstas muestras fue por demostrar la presencia de animales enfermos o portadores sanos en dicha cuenca, empleando también el aislamiento y la Observación Microscópica en Campo Oscuro (OM).

En el cuadro 10 se muestra la presencia de animales con algún antecedente de leptospirosis tomando como unidad muestral al establo en donde se encontró que en la mayoría de estos tienen por lo menos a un animal positivo a alguna de las técnicas utilizadas en este trabajo (72.3%), este dato se observa aumentado, principalmente por los animales positivos a la serología ya que 42/65 (64.6%) establos tienen animales con antecedentes serológicos a alguna de las dos cepas de leptospira empleadas en este estudio. Por otra parte los establos con animales positivos a las técnicas de AF conjugado UAM u OM, solo 20/65 (30.8%) resultaron positivos y con el conjugado PA 25/65 (38.5%). Dados los porcentajes tan elevados de establos que tienen animales que presenten alguna reacción a las pruebas diagnósticas, es indispensable

continuar con las medidas de tratamiento, control y prevención que hasta hoy se emplea en el CAIT ya que de otra forma este problema pudiera provocar daños mas severos.

Cuando los resultados obtenidos se analizaron tomando como unidad muestral a la vaca en producción del CAIT (cuadro 11), se obtuvieron los siguientes datos: como se puede observar hay una diferencia entre los resultados serológicos y los obtenidos por AF, en cuanto a la cepa detectada, ya que por la prueba de AM, la cepa UAM (serovariedad *hardjo*) fue más frecuente que la cepa PA (serovariedad *icterohaemorrhagiae*), mientras que el diagnóstico por AF la cepa PA fue más frecuente que la cepa UAM, esto podría ser debido al uso de bacterinas específicas que contienen a la cepa UAM en algunos de los establos de la cuenca y estos biológicos no contienen dentro de su fórmula a la cepa PA, por lo que se detectan en mayor proporción anticuerpos contra UAM.

La razón por la que las muestras de orina (cuadro 11) fueran las únicas que fueron positivas por las técnicas de AF (ambos conjugados) y OM, podría ser debido a que en los bovinos adultos la infección por leptospira enfermedad se encuentra en forma crónica, en donde el microorganismo se aloja en los riñones y se elimina a través de la orina (5, 7, 8, 15, 16).

Cabe aclarar que de todas las muestras tomadas de los bovinos del CAIT se intentó el aislamiento, hasta el momento de realizar este informe se tienen algunos cultivos sospechosos que contiene a microorganismos

parecidos morfológicamente a leptospiros, pero la contaminación rebasa al crecimiento de estos organismos. También se ha intentado la purificación de estos posibles aislamientos a través de la inoculación de cuyes sin éxito, por lo que se seguirán manteniendo estos cultivos mediante pases mensuales hasta obtener su purificación.

Por todo lo anterior se concluye que la Técnica de AF con los dos conjugados (PA y UAM) elaborados en este trabajo, es una herramienta diagnóstica útil y necesaria en el problema de la leptospirosis bovina, las muestras de preferencia serían de la orina de los animales sospechosos de sufrir la enfermedad o en su caso muestras de hígado, pulmón, riñón y sangre de fetos abortados, dado que se demostró en la fase experimental, que la técnica de AF con estos conjugados tienen una buena sensibilidad y especificidad.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALEXANDER, A. D. (1980) Serological diagnosis of leptospirosis. In Rose, N.R. y Fiedman, J. Editores. Manual of Clinical Immunology 2ª Ed. American Society for Microbiology. Washington, DC. 100 - 136.
- 2.- AKIYOHI, K.J. (1979) Fluorescent antibody techniques and their applications. University of Tokyo press. 59 - 76.
- 3.- ARIMITSU, Y. (1988). A new method for diagnosis of leptospirosis: A Microcapsule Agglutination (MCA) test. *Isr. J. Vet. Res.* **44** (1):1 - 8
- 4.-ARTEAGA, T.G., ROSALES, C.O., TORRES, B.J. y MENDEZ,R.I. (1991). Leptospirosis bovina en el Complejo Agroindustrial Tizayuca, Hgo.: Prevalencia y consideraciones epidemiológicas. Tesis de Maestría FMVZ-UNAM México.
- 5.- BANDA, R.V., TORRES, B.J. y SALOMON, S.A. (1985). Determinación serológica y aislamiento de leptospira en animales domésticos. Tesina de Licenciatura de la Universidad Autónoma Metropolitana. México
- 6.- BANDA, R.V., LUNA, A.M., MOLES, C.L. y TORRES. B.J. (1992). Estudio retrospectivo de leptospirosis bovina. Diagnóstico serológico de 1987 a 1991. Reunion Nacional de Investigación Pecuaria. P.275. Chihuahua, Chihuahua. México. Memorias
- 7.- BOLIN, C.A., THIERMANN, A.B. y HANDSAKER, A.L. (1989). Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type hardjo-bovis infection of pregnant cattle. *Am. J. Vet. Res.* **50** (1): 161 - 165.
- 8.- BOLIN, C.A., ZUERNER, R.L. y TRUEBA, G. (1989). Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type hardjo-bovis in bovine urine. *Am. J. Vet. Res.* **50** (7): 1001 - 1003.
- 9.- BOULANGER, P. y REBERTSON, A. (1961). ¡Fluorescein labeled antibody techniques for the demonstration of *Leptospira pomona*. *Canad. J. Comp. Med. and Vet. Sci.* **25**: 299 - 306.
- 10.- CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS (1973). Procedimientos para estudios de prevalencias de enfermedades crónicas en el ganado. *Org. Panam. de la Salud. OMS. Nota técnica N° 18.*

- 21.- GONZALEZ,G.J, BANDA, R.V., MOLES, C.L., TORRES, B.J. y AVILA, F.D. (1992). Frecuencia de seropositivos contra *Leptospira* en ganado de leche de tres municipios de Jalisco México. XIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. p. 0-359 Santiago de Chile. **Memorias**
- 22.- GONZALEZ, D. y ORTEGA, M.L. (1970). Estudio epizootológico de leptospirosis en México 1968 1970. **Sanidad Animal SAG: 29 - 33.**
- 23.- HANSON, L.E. y TRIPATHY, D.N. (1981). Research for resolution of leptospiral field problems. **Porc. 85th Annual Meeting United States Animal Health Assoc.: 192 - 202.**
- 24.- LEON, L.L. (1976). Estudio serológico por aglutinación microscópica de la leptospirosis en bovinos y cerdos en México. Sección de serología **Centro Nacional de Sanidad Animal SARH. México. Reporte de actividades**
- 25.- MACKINOSH, C.G., MARSHALL, R.P. y BROUGHTON, E.S. (1980). The use of a *hardjo pomona* vaccine to prevent leptospiruria in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. **N. Z. Vet. J. 28: 174 - 177.**
- 26.- MILLAR, B.D., CHAPPEL, R.J. y ALDER, B. (1987). Detection of leptospire in microbiological fluids using DNA Hybridization. **Vet. Microbiol. 15: 71 - 78.**
- 27.- MORILLA, G.A. y BAUTISTA, C.G. (1987). Inmunofluorescencia. Ed. Diana Técnico. 1ª Ed. p.p. 97 - 126. México.
- 28.- PALIT, A. y GULASEKHARAM, J. (1973). Genus specific leptospiral antigen and it's possible use in laboratory diagnosis. **J. Clin. Pathol. 26: 7 - 16.**
- 29.- PALMER, M.F. (1988). Laboratory diagnosis of leptospirosis. **Med. Lab. Sci. 45: 174 - 178**
- 30.- SANDHU, T.S. y WHITE, F.H. (1972). Evaluation of macroscopic plate test and indirect immunofluorescence test to detect leptospiral antibodies in bovine serum. **Cand. J. Comp. Med. 36 (enero): 34 - 37.**
- 31.- SESHAGARI, A.R. y KESHAVA, S.B. (1983). Rapid plate test antigen for serodiagnosis of leptospirosis. **Indian Vet. J. 56: 683 - 689.**

- 21.- GONZALEZ,G.J, BANDA, R.V., MOLES, C.L., TORRES, B.J. y AVILA, F.D. (1992). Frecuencia de seropositivos contra *Leptospira* en ganado de leche de tres municipios de Jalisco México. XIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. p. O-359 Santiago de Chile. Memorias
- 22.- GONZALEZ, D. y ORTEGA, M.L. (1970). Estudio epizootológico de leptospirosis en México 1968 1970. **Sanidad Animal SAG:** 29 - 33.
- 23.- HANSON, L.E. y TRIPATHY, D.N. (1981). Research for resolution of leptospiral field problems. **Porc. 85th Annual Meeting United States Animal Health Assoc.:** 192 - 202.
- 24.- LEON, L.L. (1976). Estudio serológico por aglutinación microscópica de la leptospirosis en bovinos y cerdos en México. Sección de serología Centro Nacional de Sanidad Animal SARH. México. **Reporte de actividades**
- 25.- MACKINOSH, C.G., MARSHALL, R.P. y BROUGHTON, E.S. (1980). The use of a *hardjo pomona* vaccine to prevent leptospirosis in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. **N. Z. Vet. J.** 28: 174 - 177.
- 26.- MILLAR, B.D., CHAPPEL, R.J. y ALDER, B. (1987). Detection of leptospires in microbiological fluids using DNA Hybridization. **Vet. Microbiol.** 15: 71 - 78.
- 27.- MORILLA, G.A. y BAUTISTA, C.G. (1987). Inmunofluorescencia. Ed. Diana Técnico. 1ª Ed. p.p. 97 - 126. México.
- 28.- PALIT, A. y GULASEKHARAM, J. (1973). Genus specific leptospiral antigen and it's possible use in laboratory diagnosis. **J. Clin. Pathol.** 26: 7 - 16.
- 29.- PALMER, M.F. (1988). Laboratory diagnosis of leptospirosis. **Med. Lab. Sci.** 45: 174 - 178
- 30.- SANDHU, T.S. y WHITE, F.H. (1972). Evaluation of macroscopic plate test and indirect immunofluorescence test to detect leptospiral antibodies in bovine serum. **Cand. J. Comp. Med.** 36 (enero): 34 - 37.
- 31.- SESHAGARI, A.R. y KESHAHA, S.B. (1983). Rapid plate test antigen for serodiagnosis of leptospirosis. **Indian Vet. J.** 56: 683 - 689.

- 32.- SMITH, R.E., HENCH, E.C. y REYNOLDS, I.M. (1971). Experimental leptospirosis in pregnant ewes. VI immunofluorescence in the diagnosis of fetal leptospirosis. **Am J. Vet. Res.** **32 (12)**: 2104 - 2106.
- 33.- STALHEIM, O.H.V. (1971). Leptospirosis diagnosis by immunofluorescence: improved procedure for antigen preparation. **Am. J. Vet. Res.** **32 (12)**: 2107 - 2109.
- 34.- THIERMANN, A.B. (1982). Experimental leptospiral infection in pregnant cattle with organisms of the *hebdomadis* serogroup. **Am. J. Vet. Res.** **43**: 780 - 784.
- 35.- THIERMANN, A.B. (1983). Bovine leptospirosis: bacteriological versus serological diagnosis of cows at slaughter. **Am. J. Vet. Res.** **44 (diciembre)**: 2244 - 2245.
- 36.- THIERMANN, A.B. (1984). Leptospirosis current developments and trends. **J. A. V. M. A.** **184 (6)**: 722 - 725.
- 37.- THIERMANN, A.B. y GARRETT, M.S. (1983). Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* and *pomona* in cattle. **Am. J. Vet. Res.** **44 (5)**: 884 - 887.
- 38.- VAN EYS, G.J.J.M., GRAVEKAMP, C., GERRITSEN, M.J., QUINT, W., CORNELISSEN, M.T.E., TER SCHEGGET, J. y TERPSTRA, W.J. (1989). Detection of leptospires in urine by polymerase Chain Reaction. **J. of Clin. Microbiol.** **27 (10)**: 2258 - 2262.
- 39.- VARELA, G., VAZQUEZ, A. y MANCERA, L. (1958). Investigación de aglutininas para *Leptospira icterohaemorrhagiae* en Estados de la República Mexicana. **Rev. Inst. Salub. y Enf. Trop.** **1**: 31 - 36.
- 40.- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1967). Current problems in leptospirosis research. Reporte de un grupo de expertos de la O.P.S. **Wld. Hlth.Org. Techn. Rep. Ser.** **380**.
- 41.- YANAGAWA, R. y ADACHI, Y. 1977. Identification of some Japanese leptospiral strains as serotypes *copenhageni* and *icterohaemorrhagiae* by precipitin absorption test in gel. **Zbl. Bact. Hyg. Abs. Orig.A.** **237**: 95 103.
- 42.- ZAVALA, V.J., PINZON, D.J., FLORES, C.M. y DAMIAN, C.A. (1984). Leptospirosis en Yucatán. Estudio serológico en humanos y animales. **Salud Pública en México** **26 (3)**: 254 - 259.

**CUADRO 1**  
**CARACTERISTICAS DE LOS SUEROS HIPERINMUNES**  
**DE CONEJO PARA LA PREPARACION DE LOS CONJUGADOS**  
**DE LEPTOSPIRA**

<b>C E P A S</b>	<b>TITULO DEL SUERO HIPERINMUNE</b>	<b>PROTEINA mg/ml</b>
<b>PALO ALTO</b>	<b>1:12,000</b>	<b>32</b>
<b>U A M</b>	<b>1:6,400</b>	<b>26.8</b>

**CUADRO 2**  
**DETERMINACION DE LA DILUCION OPTIMA DE DOS**  
**CONJUGADOS DE LEPTOSPIRA**

DILUCIONES	CONJUGADO PALO ALTO	CONJUGADO U A M
SIN DILUIR	+++	+++
1:10	+++	++
1:100	++	+
1:1,000	+	-
1:10,000	-	-

+++ FLUORESCENCIA EXCESIVA

+ FLUORESCENCIA ESCASA

++ FLUORESCENCIA OPTIMA

- FLUORESCENCIA NEGATIVA

**CUADRO 3**  
**SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALOR PREDICTIVO**  
**DE LOS CONJUGADOS DE LEPTOSPIRA**

	<b>C O N J U G A D O S</b>	
	<b>CEPA PALO ALTO</b>	<b>CEPA U A M</b>
<b>SENSIBILIDAD</b>	<b>97.4 %</b>	<b>100 %</b>
<b>ESPECIFICIDAD</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>
<b>VALOR PREDICTIVO</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>

## CUADRO 4

**VARIACION DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA  
DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES Y AISLAMIENTO EN AMBOS  
CONJUGADOS**

CONJUGADOS	TIPO DE MUESTRA	SENSIBILIDAD		ESPECIFICIDAD	
		AF* %	AISSL*	AF* %	AISSL*
PALO ALTO	SANGRE	56.4	30	100	100
	HIGADO	61.4	17	100	100
	PULMON	51.2	30	100	100
	RIÑON	48.7	28	100	100
	ORINA	51.2	10	100	100
U A M	SANGRE	69.2	23	100	100
	HIGADO	61.5	46	100	100
	PULMON	58.9	38	100	100
	RIÑON	65.4	53	100	100
	ORINA	41.0	17	100	100

\* AF ANTICUERPOS FLUORESCENTES

+ AISL AISLAMIENTO





## CUADRO 7

**COMPARACION DE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE  
ANTICUERPOS FLUORESCENTES Y DE AISLAMIENTO  
BACTERIOLOGICO EN MUESTRAS DE 39 CUYES  
INOCULADOS CON LA CEPA PALO ALTO**

MUESTRAS	ANTICUEROS FLUORESCENTES		AISLAMIENTO BACTERIOLOGICO		CONCORDANCIA ENTRE AMBAS PRUEBAS %
	•	%	•	%	
SANGRE	21	54	12	31	52
HIGADO	23	59	7	18	39
PULMON	20	52	12	31	54
RIÑON	19	49	11	29	49
ORINA	21	54	2	6	52

• CONCORDANCIA DE RESULTADOS POSITIVOS O NEGATIVOS  
A AMBAS PRUEBAS

**CUADRO 8**  
**COMPARACION DE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE**  
**ANTICUERPOS FLUORESCENTES Y DE AISLAMIENTO**  
**BACTERIOLOGICO EN MUESTRAS DE 39 CUYES**  
**INOCLADOS CON LA CEPA UAM**

MUESTRAS	ANTICUEROS FLUORESCENTES		AISLAMIENTO BACTERIOLOGICO		* CONCORDANCIA ENTRE AMBAS PRUEBAS %
	+	%	+	%	
SANGRE	28	72	9	23	41
HIGADO	24	62	18	47	65
PULMON	24	62	14	36	54
RIÑON	24	62	19	49	72
ORINA	16	41	7	18	52

\* CONCORDANCIA DE RESULTADOS POSITIVOS O NEGATIVOS  
A AMBAS PRUEBAS

## CUADRO 9

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE AGLUTINACION  
MICROSCOPICA EN SUEROS DE CUYES INFECTADOS  
CON LAS CEPAS PALO ALTO Y UAM

CEPA	DIAS POST INOCULACION																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
PALO +	0	0	0	0	0	2	1	1	1	*	*	1	1	1	1	1	2	2	1
PALO -	2	2	2	2	2	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	0	*

\* CUYES NO MUESTREADOS

CEPA	DIAS POST INOCULACION																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
UAM +	0	0	0	2	2	2	2	1	1	1	1	1	*	1	2	2	*	1	1
UAM -	2	2	2	0	0	0	0	*	*	*	*	*	*	*	0	0	*	*	*

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## CUADRO 10

**RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS APLICADAS  
A LOS BOVINOS MUESTREADOS DE 65 ESTABLOS DEL CAIT**

		E S T A B L O S		
PRUEBAS DE DIAGNOSTICO	TIPO DE MUESTRA	TOTAL	NUMERO DE POSITIVOS	%
A M	SUERO	65	42	64.6
O M	ORINA	65	20	30.8
AF PA	ORINA	65	25	38.6
AF UAM	ORINA	65	20	30.8
CUALQUIER PRUEBA	SUERO ORINA	65	47	72.3

AM AGLUTINACION MICROSCOPICA      AF PA ANTICUERPOS FLUORESCENTES PALO ALTO  
OM OBBERVACION MICROSCOPICA      AF UAM ANTICUERPOS FLUORESCENTES UAM

## CUADRO 11

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS APLICADAS  
A BOVINOS DEL CAIT

		B O V I N O S		
PRUEBAS DE DIAGNOSTICO	TIPO DE MUESTRA	TOTAL	NUMERO DE POSITIVOS	%
AM <sup>*</sup> PALO ALTO	SUERO	325	22	7
AM UAM	SUERO	325	91	28
AF <sup>**</sup> PALO ALTO	ORINA	325	33	11
AF UAM	ORINA	325	20	6
OM <sup>***</sup>	ORINA	325	27	9

\* AM = AGLUTINACION MICROSCOPICA  
\*\* AF = ANTICUERPOS FLUORESCENTES

\*\*\* OM = OBSERVACION MICROSCOPICA