



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Diagnóstico de leptospirosis en cerdos de abasto  
mediante la utilización de las técnicas serológica,  
bacteriológica, histopatológica y molecular.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

**PMVZ JOSÉ MANUEL RAMÍREZ ORTEGA**

ASESORES MVZ, M.Sc., Ph.D. Alejandro de la Peña Moctezuma  
MVZ, M. Sc., Ph.D. Cert. Pedro Juan Bautista de la  
Salle Fernando Pradal Roa



MÉXICO, D. F. OCTUBRE DE 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MIS PADRES**

Margarita y Mario, por todo su amor, comprensión, paciencia y apoyo, son la base de mi educación como persona y toda la vida les estaré agradecido, los amo.

### **A MIS HERMANOS**

Mario, por que siempre fuiste mi principal ejemplo y por todo lo que me enseñaste.

Alejandro, por los buenos recuerdos.

Miguel, por compartir conmigo tantas cosas desde pequeños, risas ratos de relajo y locuras gracias Ruquito.

Rosario, por ser mi cómplice, mi carnalita, la que me cuidaba desde pequeño, y por ser el mejor ejemplo de una mujer fuerte e inteligente.

### **A MIS AMIGOS DE LA FACULTAD**

Eva, Lucila, Nalleli, Griselda, Alejandro, Marco, Chucho, Juan Luis, Serafín, Hugo, Aldo y varios más. Por todos esos días en clase, aprendiendo juntos, por conbeber en las fiestas y permitirme conocerlos, por compartir parte de sus vidas, por estar conmigo en las buenas y en las malas, sobre todo en las más buenas. GRACIAS.

### **A MIS AMIGOS DEL TRABAJO**

Gabriela, Carolina, Israel, Gerardo, Esmeralda, Noemí (eres muy especial). Por todo los buenos momentos en el laboratorio ya sea de trabajo o diversión.

### **AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

A todo el personal de este departamento por sus comentarios y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio del GRILLEP: Olivia, Rodrigo, Carlos, Raquel, Tania, Erika M, Jorge Alejandro, Elena, Rocío y Pablo, por compartir las horas de trabajo y alguna otra de relajo.

### **A MIS ASESORES**

Alejandro De la Peña Moctezuma y Pedro Pradal Roa, por su confianza, sus consejos y sus enseñanzas. Gracias.

### **AL JURADO**

Por el tiempo dedicado para la realización de esta tesis.

### **A LOS DOCTORES**

Armando Rodríguez, Daniel Atilano, Juvencio García y Alejandra Ayanegui, por su valiosa participación para la realización de esta tesis.

### **AL DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**

Por su valiosa colaboración para la realización de este trabajo.

### **AL PROYECTO**

Este proyecto se realizó en el laboratorio del Grupo de Investigación en *Leptospira* y leptospirosis del Departamento de Microbiología e Inmunología UNAM-FMVZ. Proyecto financiado por PAPIIT (IN 205202) e (IN22286) Y UC-MEXUS-CONACYT (CN-02-54). Responsable del proyecto y tutor principal Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma.

### **A MIS GATOS Y A MIS PERROS**

Cañangas, Negra, Duque, Samis, Murci, Chiquita, Pingüica, Pelos, Güero, Tigrón, Catalina, Tacho y Tacha, que han alegrado mi vida, me enseñaron que el amor incondicional de los animales debe ser correspondido con respeto y cariño.

### **A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

Por ser mí casa en la etapa de estudiante y por brindarme todo lo necesario para prepararme como profesional y como persona.

## CONTENIDO

	PAGINA
RESUMEN	1
CAPITULO I. INTRODUCCION	2
1.1.1. LEPTOSPIROSIS	2
1.1.2. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD	3
1.1.3. AGENTE ETIOLOGICO	4
1.1.4. EPIDEMIOLOGÍA	5
1.1.5. PATOGENIA	6
1.1.6. LEPTOSPIROSIS EN LAS ESPECIES DOMESTICAS	6
1.1.7. LEPTOSPIROSIS EN CERDOS	9
1.2. JUSTIFICACIÓN	12
1.3. HIPÓTESIS	13
1.4. OBJETIVOS	13
CAPITULO II. MATERIAL Y MÉTODOS	14
CAPITULO III. RESULTADOS	27
CAPITULO IV. DISCUSION	34
CAPITULO V. CONCLUSIONES	37
CAPITULO VI. BIBLIOGRAFÍA	40
CAPITULO VII. APENDICES	48

## RESUMEN

RAMÍREZ ORTEGA JOSÉ MANUEL. DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS EN SEIS GRUPOS DE CERDOS DESTINADOS PARA ABASTO MEDIANTE LAS TÉCNICAS SEROLÓGICA, BACTERIOLÓGICA, HISTOPATOLÓGICA Y MOLECULAR. (Bajo la asesoría de los MVZ, M.Sc., Ph.D. Alejandro de la Peña Moctezuma y MVZ, M. Sc., Ph.D. Cert. Pedro Juan Bautista de la Salle Fernando Pradal Roa).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de *Leptospira* en 236 cerdos destinados para abasto en cada uno de los 6 grupos de estudio utilizando las técnicas diagnósticas de: aglutinación microscópica (AM), aislamiento bacteriológico, histopatología con las tinciones de hematoxilina y eosina (H & E) y de Warthin Starry (WS) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El diagnóstico serológico de aglutinación microscópica (AM) fue dirigido contra un panel de 10 diferentes serovariedades. Se colectaron muestras de orina y riñón de 68 cerdos y se inocularon en medio líquido Ellinghausen- McCullough-Johnson-Harris (EMJH) para aislamiento bacteriano. Los estudios patológicos consistieron en la observación macroscópica del parénquima renal y por histopatología (tinción de H & E) de 21 muestras de riñón de los 68 cerdos muestreados; de las cuales 14 tuvieron títulos en la AM al menos de 1:200 y 7 fueron negativos. Esto con el fin evaluar el grado de nefritis intersticial con infiltrado mononuclear característico de leptospirosis a nivel microscópico y detección de leptospiras en el tejido renal con la tinción de Warthin Starry. La prueba de PCR se hizo a las 68 muestras renales obtenidas y consistió en la amplificación de fragmentos de ADN de 285 pb y de 563 pb con los oligonucleótidos específicos (G1, G2 y B64I, B64II). En la AM se obtuvieron 159 (67.37%) sueros positivos a alguna serovariedad. Las serovariedades encontradas con mayor frecuencia fueron Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Canicola y Grippotyphosa. En el cultivo bacteriológico no se obtuvieron aislamientos y en la prueba de

PCR no se obtuvieron resultados positivos. En el caso de las lesiones observadas en las muestras trabajadas por histopatología, (21 riñones) teñidas con las tinciones de H & E y WS se encontró que éstas fueron similares a las producidas por *Leptospira* en todas las muestras con diferentes grados de severidad.

## I. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. REVISIÓN DE LITERATURA.

#### 1.1.1. Leptospirosis.

La leptospirosis es conocida también como: enfermedad de Weil (causada principalmente por la serovariedad *Icterohaemorrhagiae*); fiebre de los arrozales (serovariedad *Bataviae*); enfermedad de los heníficadores; enfermedad de las porquerizas (serovariedad *Pomona*); enfermedad de los manipuladores de pescados, fiebre de los 7 días (serovariedad *Hebdomadis* en Japón); fiebre otoñal japonesa (serovariedad *Autumnalis*); fiebre de cieno, fiebre de los pantanos (serovariedad *Grippotyphosa* en los trópicos) fiebre del agua; fiebre de los cosechadores; fiebre de los campos; entre otras en humanos. En perros ictericia enzootica; tífus canino; enfermedad de Stuttgart (serovariedad *Canicola* en Europa); ictericia hemorrágica; ictericia infecciosa; en bovinos agua roja; fiebre de los ratones.<sup>1, 2, 3, 4</sup> Todas estas denominaciones han sido utilizadas para describir la enfermedad producida por leptospiras según sus características epidemiológicas, clínicas, territoriales, especies afectadas o estacionalidad.

Es una enfermedad infecciosa y contagiosa de distribución mundial y considerada una de las zoonosis de mayor distribución en todo el mundo. Se contagia por contacto directo con orina o fluidos fetales, o contacto indirecto con aguas contaminadas por leptospiras patógenas con las mucosas o heridas de los huéspedes susceptibles.<sup>5</sup> En el hombre es una enfermedad de presentación aguda a crónica. Los principales signos son cefaleas, periodos febriles intermitentes, hemorragias, ictericia. En algunas especies como los cerdos y los rumiantes se caracteriza por infertilidad y abortos.<sup>6, 7</sup> Algunos otros signos varían de acuerdo a la especie a la que afecta o a la serovariedad que esté presente en la infección y al grado de lesión y a los órganos involucrados. Dentro de la epidemiología, la presencia de portadores asintomáticos y



de reservorios naturales, principalmente roedores, es de suma importancia para el mantenimiento de la leptospirosis en el medio.<sup>5</sup>

### 1.1.2. Historia.

Fue Adolfo Weil quien en 1886 describió por primera vez a la leptospirosis como enfermedad llamándola “fiebre icterica” (conocida en la actualidad como enfermedad de Weil).<sup>8</sup> En 1914 Inada e Ido descubrieron a una espiroqueta causante de la Enfermedad de Weil.<sup>5</sup> En 1920 Noguchi logró el primer aislamiento en México en un caso semejante a la fiebre amarilla.<sup>9</sup> El primer reporte de un brote de leptospirosis en México fue en 1958 en la península de Yucatán en las poblaciones de Tetz y Kinchil.<sup>10</sup> El Dr. Zavala y colaboradores realizaron un estudio en el Estado de Yucatán incluyendo animales domésticos y encontraron una seropositividad contra leptospirosis en humanos de 14.1%; en porcinos de 23.3% y en bovinos de 11.3%.<sup>11</sup> Desde ese entonces, se han hecho estudios tanto serológicos como de aislamiento en las diferentes especies. En el caso de los cerdos los antecedentes serológicos son resumidos en el cuadro 1.

**Cuadro 1 Antecedentes históricos de la leptospirosis porcina en México**

<b>AUTOR</b>	<b>AÑO</b>	<b>SEROVARIEDAD</b>
Varela <sup>10</sup>	1961	Icterohaemorrhagiae y Pomona
Rodríguez <sup>12</sup>	1969	Bratislava
Jiménez <sup>13</sup>	1971	Pomona, Australis y Ballum
Dikken <sup>14</sup>	1976	Pomona
Moles y colaboradores <sup>15</sup>	1998	Bratislava y Pomona
Chávez Trejo <sup>16</sup>	2006	Pomona

### 1.1.3. Agente etiológico.

El género *Leptospira* pertenece a la familia *Leptospiraceae* del orden *Spirochaetales*, está conformado por espiroquetas de 6 a 20 µm de longitud, las cuales muestran un gancho en uno o ambos extremos.<sup>17, 5, 7</sup> Estos microorganismos poseen una membrana citoplasmática, una capa delgada de peptidoglucano, un espacio periplásmico y una membrana externa, en forma similar a una bacteria Gram negativa.<sup>18</sup> Presentan tres tipos de movimiento: de translación, de rotación en su propio eje y de contorción. Esta movilidad se debe a la presencia de un par de flagelos periplásmicos o endoflagelos localizados entre la capa de mureína (pared bacteriana) y la membrana externa.<sup>19, 20, 21</sup> La membrana externa contiene lipolisacárido (LPS) de organización estructural comparable al LPS de las bacterias Gram negativas pero muestra menor actividad endotóxica.<sup>22, 17, 23</sup> El LPS es el principal componente antigénico, al que los anticuerpos aglutinantes del tipo IgM reaccionan.<sup>24</sup> Las leptospiras son consideradas bacterias aerobias estrictas aunque se pueden desarrollar también en condiciones microaerofílicas.<sup>25, 23</sup> Existen poco más de 250 serovariedades patógenas diferenciadas con base en la composición y estructura antigénica de sus LPS.<sup>25</sup> Actualmente se consideran quince especies de las cuales once son especies patógenas: *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. wolffii* y *L. licerasiae*. Las otras cuatro especies *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. kmety* y *L. wolbachii* son consideradas apatógenas.<sup>26, 5, 27</sup>

#### 1.1.4. Epidemiología.

La leptospirosis es una enfermedad que afecta a diferentes especies de mamíferos domésticos como caninos, rumiantes, porcinos y equinos; otras especies actúan como reservorios naturales tales como los roedores (ratas y ratones principalmente); así como animales silvestres como zorras, zorrillos, venados y mapaches, entre otros.<sup>17, 5</sup> La leptospirosis, es una zoonosis en la cual el humano se considera un huésped accidental, adquiere la infección por contacto directo con orina de animales infectados o portadores asintomáticos, o bien de forma indirecta por

contacto con agua contaminada con la orina de dichos animales.<sup>28</sup> Cabe mencionar, que las serovariedades si bien no son específicas de especie, si tienen una afinidad o relación natural con algunas especies entendida como serovariedad adaptada a especie animal, como ejemplo de estas son: *Icterohaemorrhagiae* en ratas, *Canicola* en perros, *Hardjo* en vacas y *Pomona* en cerdos.<sup>29</sup> Si bien esto no quiere decir que no se den infecciones incidentales o accidentales donde una serovariedad adaptada a una especie animal en particular, infecte a otra, lo que está determinado por la oportunidad que proporcionan los factores de manejo, del ambiente e incluso sociales, para el contacto con serovariedades provenientes de otras especies. Como ejemplos de infecciones accidentales tenemos: *Pomona* en caninos, *Icterohaemorrhagiae* o *Hardjo* en humanos y *Canicola* en porcinos.<sup>30</sup>

#### 1.1.5. Patogenia.

La entrada de leptospira al huésped es principalmente por abrasiones o soluciones de continuidad de la piel, por contacto directo con las mucosas o incluso por inhalación de aerosoles. También se da la invasión transplacentaria de la madre al feto en cualquier estado de la gestación. Como sea el caso, el microorganismo pasa después a la corriente sanguínea y vía linfática a todos los tejidos pudiéndose encontrar en pulmón, hígado, riñón y bazo.<sup>5</sup> La leptospirosis tiene dos fases, independientemente de la especie animal afectada: fase inicial de leptospiremia caracterizada por presentación de fiebre por aproximadamente 7 días, en donde la bacteria se replica en sangre; y la fase de leptospiruria en la que el microorganismo se aloja en riñón y es posible su eliminación por la orina y que puede persistir de 2 a 3 meses incluso años. Al invadir los tejidos, la bacteria utiliza mecanismos de patogenicidad que provocan principalmente vasculitis y dependiendo del órgano afectado, hepatitis, nefritis y neumonía. En hembras gestantes, se producen metritis, abortos y en ocasiones meningoencefalitis.<sup>30, 31, 28</sup>

#### 1.1.6. Leptospirosis en especies domésticas.

La leptospirosis en el ganado bovino se ha asociado en un alto porcentaje con la serovariedad Hardjo, sin embargo, otras serovariedades pueden estar involucradas como Grippytyphosa, Pomona, Canicola y Bratislava.<sup>5, 6</sup> La leptospirosis bovina produce pérdidas económicas principalmente por sus efectos sobre la producción, pudiendo causar mortinatos, abortos y/o nacimiento de animales débiles, además de infertilidad.<sup>32</sup> También afecta de manera importante a la producción láctea a consecuencia del “síndrome de caída de la leche” o agalactia transitoria producida por este microorganismo. Los signos clínicos pueden ser inaparentes (Hardjobovis) o agudos y severos (Pomona e Icterohaemorrhagiae). En animales jóvenes se puede presentar un cuadro agudo grave con los siguientes signos: fiebre, ictericia, hemorragias y hemoglobinuria (agua roja) que frecuentemente es mortal, aunque hay que mencionar que esto ocurre con poca frecuencia.<sup>33</sup> En borregos y cabras la leptospirosis es rara pero se puede presentar sobre todo si los animales están en producciones intensivas, donde las serovariedades que se han reportado con mayor frecuencia son: Hardjo, Pomona y Grippytyphosa.<sup>34</sup> También se menciona a las serovariedades Pomona, Grippytyphosa, Australis, Bratislava y Sejroe como las más comunes y cuya infección producida por estas se presenta de forma aguda, hay depresión, anorexia, hemoglobinuria, puede causar aborto, las crías nacen débiles mostrando una seroconversión baja.<sup>35</sup> Los animales que sobreviven pueden permanecer, como portadores asintomáticos que excretan la bacteria en la orina.<sup>22</sup>

La leptospirosis clínica en perros es históricamente la más descrita en los animales domésticos, es de gran importancia por la cercanía de éste al ser humano. Las serovariedades comúnmente involucradas son Icterohaemorrhagiae y Canicola y en los animales afectados se observa vómito, debilidad, fiebre, hematuria, diarrea con sangre (melena) e ictericia; hay insuficiencia renal crónica lo que conduce incluso a la muerte presentándose a la necropsia nefritis intersticial crónica.<sup>5</sup>

La leptospirosis en caballos se ha reportado poco ya que no se diagnostica comúnmente, sin embargo, las serovariedades involucradas son: Autumnalis, Pomona, Australis, Icterohaemorrhagiae, Sejroe y Canicola; la signología encontrada es fiebre, anorexia, hemorragias en conjuntiva y mucosas, anemia, ictericia, debilidad, las hembras gestantes pueden abortar. En algunos caballos se desarrolla uveítis recurrente.<sup>36, 37</sup> La leptospirosis en roedores tiene mayor importancia por el papel de reservorio que juegan estos animales. El ratón común (*Mus musculus*), la rata negra (*Rattus rattus*) y la rata noruega (*Rattus norvegicus*) son las especies, ubicadas tanto en las zonas urbanas como en el campo que participan en la epidemiología de la enfermedad diseminándola al ambiente, las principales serovariedades encontradas en estas especies son: Icterohaemorrhagiae y Ballum.<sup>38</sup> El gran número de estos animales en las granjas o en las ciudades favorece la transmisión y dispersión de las leptospiras al contaminar con su orina el agua y el alimento de los animales o de las personas. La reproducción de la enfermedad en animales de laboratorio como ratones, hámsteres, cuyes, y conejos ha facilitado el trabajo en la investigación de esta bacteria.<sup>5</sup>

En humanos la leptospirosis es considerada una de las principales zoonosis a nivel mundial, la forma de contagio se da cuando el ser humano entra en contacto con agua, alimentos u otros sustratos contaminados con orina de animales con leptospirosis. La bacteria entra a través de heridas abrasiones, excoriaciones o rozaduras en la piel, o mucosas conjuntival, bucal o nasal. Los síntomas son fiebre, cefaleas, mialgias, hemorragias, ictericia, artralgias, meningitis, hepatomegalia, anemia y daño renal severo, puede ocasionar la muerte debido al daño en hígado y riñón. La sintomatología es similar a otras enfermedades por lo cual el diagnóstico oportuno es difícil al confundirse con otras enfermedades como malaria, dengue, fiebre tifoidea, influenza, neumonía e incluso gripe.<sup>39</sup>

El diagnóstico clínico de la leptospirosis en animales y en humanos es difícil, considerando la biología del microorganismo y la diversidad de signos asociados con las lesiones presentes

(uremia, ictericia, hemorragias, encefalitis, reacciones de autoinmunidad). Pruebas serológicas, como la de aglutinación microscópica (AM), son comúnmente utilizadas para demostrar la presencia de anticuerpos contra serovariedades específicas de *Leptospira* en los individuos sospechosos.<sup>22, 43, 41</sup> El diagnóstico definitivo requiere del aislamiento e identificación del microorganismo principalmente a partir de muestras como orina, sangre, líquido cerebroespinal o de la cámara anterior del ojo,<sup>5, 7</sup> o a partir de tejidos de animales muertos recientemente como hígado o riñón, o de tejidos de fetos abortados.<sup>30, 5</sup>

El aislamiento, sin embargo, es difícil debido a la fragilidad del microorganismo fuera de su hospedero así como a sus estrictos requerimientos de cultivo.<sup>40</sup> Por otro lado, el aislamiento, si bien resulta impráctico desde el punto de vista diagnóstico (hasta 6 meses o más para establecer un cultivo en el laboratorio), es de gran importancia desde el punto de vista epidemiológico ya que permite establecer medidas de control y preventivas específicas para la serovariedad involucrada.<sup>5</sup>

#### 1.1.7. Leptospirosis en cerdos.

Debido a su impacto económico, la leptospirosis tiene una especial relevancia en las empresas porcinas ya que afecta principalmente a hembras en su etapa reproductiva, reduciendo seriamente la productividad de las mismas y la rentabilidad de esta actividad pecuaria.

En México existe una población de 14,625,199 cabezas de porcinos, con un sacrificio de 4,707,109 cabezas al año, siendo una producción de carne de 307,640 toneladas. El consumo *per capita* anual fue de 15.5 kg en el año 2005, esto hace que la carne de cerdo sea, después de la de aves, la segunda más consumida, por lo cual la porcicultura es una actividad económica importante en el sector agropecuario del país<sup>42</sup> (INEGI 2007). En producción porcina la importancia de la leptospirosis se fundamenta por un lado, en las pérdidas económicas causadas por los abortos, mortinatos e infertilidad y en el riesgo de transmisión al hombre, y la persistencia del agente infeccioso en el ambiente por los portadores

asintomáticos (vacas, cerdos y perros) así como de los reservorios naturales (roedores).<sup>43, 40,</sup>

<sup>41</sup> Esta enfermedad afecta a cerdos de todas las edades, las especies y sus serovariedades más comúnmente reportadas son: *L. interrogans* serovariedades Bratislava, Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona; *L. borgpetersenii* serovariedades Tarassovi y Sejroe; *L. kirschneri* serovariedad Grippytyphosa.<sup>43, 41</sup> La infección se da principalmente por contacto directo con el microorganismo en orina o agua contaminada, con abrasiones en piel, con las membranas mucosas o por vía venérea.<sup>43</sup> Después de atravesar las mucosas, se produce un estado de leptospiremia que perdura de una a dos semanas, empieza 1 a 2 días después de la infección y puede ir acompañada de fiebre de 39.5 - 41.5°C. En este periodo se pueden recuperar leptospiras de la mayoría de los órganos del cuerpo y del líquido cefalorraquídeo. Esta fase termina al aparecer los anticuerpos circulantes detectables de 5 a 10 días postinfección, alcanzando el máximo nivel alrededor de las 3 semanas, después hay una disminución considerable. Después de la fase de leptospiremia las leptospiras se localizan en túbulos proximales renales donde se multiplican y se empiezan a eliminar por orina, fase de leptospiruria. La máxima eliminación se da en el primer mes llegando a ser de más de un millón de leptospiras por mililitro de orina,<sup>44</sup> en este periodo la eliminación es constante.<sup>45</sup> A continuación, hay un periodo de eliminación de baja intensidad e intermitente que puede durar hasta 2 años.<sup>46</sup> En cerdas preñadas, el aborto, lechones nacidos muertos y lechones nacidos débiles se dan por la presencia de infecciones intrauterinas por leptospiras en el último tercio de gestación. Estas infecciones transplacentarias se dan en la fase de leptospiremia de la madre, la bacteria supera la barrera placentaria produciendo grandes cantidades de leptospiras en todos los tejidos fetales. En el caso de infecciones por Bratislava, se da una persistencia de leptospiras en el oviducto y útero de cerdas no preñadas y en los órganos genitales de los verracos.<sup>30</sup> La infertilidad es característica en infecciones por la serovariedad Bratislava.<sup>47</sup> Las cerdas preñadas y los lechones son los que más desarrollan

infecciones clínicas, en los demás animales la presentación es subclínica. La presentación aguda coincide con la fase de leptospiremia y suele pasar inadvertida, esto sugiere que es la forma más grave y menos estudiada.<sup>44</sup>

La fase crónica se identifica por los abortos, mortinatos y lechones nacidos débiles sobre todo con Pomona.<sup>48</sup>

Los signos clínicos varían según la edad del cerdo, en lechones de 0 a 7 días hay equimosis, hemorragias circulares y sufusiones en la piel, hematuria, ictericia y muerte; en cerdos jóvenes hay debilidad, falta de apetito, ictericia, e incluso convulsiones, algunos signos de falla renal como edema subcutáneo y falla cardiaca derecha congestiva.<sup>43, 40</sup> En machos adultos, sólo se ven signos clínicos relacionados con falla renal crónica.<sup>40</sup> En hembras gestantes hay metritis y abortos sobre todo en el último tercio de la gestación, o bien presencia de mortinatos tipo I (mueren poco antes de nacer) o los lechones mueren poco tiempo después del parto.<sup>40</sup> En el plazo de una semana se forman anticuerpos aglutinantes. Los animales que se recuperan quedan como portadores asintomáticos mostrando poca ganancia de peso, debilidad y son más susceptibles a presentar otras enfermedades o retrasarse en su desarrollo (redrojos).<sup>30, 43, 41</sup>

El diagnóstico de laboratorio puede apoyarse en la demostración del agente etiológico en orina o sangre de los animales afectados, o bien en tejido renal de animales muertos o sacrificados específicamente para llevar a cabo un examen completo de las lesiones causadas por *Leptospira*. La histopatología de cortes teñidos con tinciones de plata (Warthin-Starry) o la inmunohistoquímica se utilizan para la demostración de leptospiras en tejidos.<sup>49</sup> La serología, mediante la aglutinación microscópica (AM), inmunoensayo enzimático (ELISA) y pruebas moleculares como la PCR, son opciones para confirmar el diagnóstico clínico de leptospirosis en cerdos.<sup>31, 43, 5, 50, 51, 52</sup>



La AM es la prueba más utilizada para el diagnóstico de leptospirosis en cerdos, consiste en enfrentar diluciones de sueros sospechosos con cultivos de leptospiras vivas de las diferentes serovariedades para observar una reacción de aglutinación antígeno-anticuerpo. Las serovariedades utilizadas deben ser las más comunes que se hayan reportado en la región o país.<sup>53</sup> No diferencia anticuerpos vacunales de anticuerpos producidos por infección (respuesta natural activa).

El aislamiento bacteriano se ha utilizado como apoyo para la determinación del agente que produce la leptospirosis en los cerdos, en caso de brotes es el método diagnóstico más utilizado, por la presencia del agente en el material abortado (líquidos, tejidos y el mismo feto), aunque presenta la gran desventaja de un largo periodo de incubación.

La histopatología se utiliza para dilucidar la causa de ciertas lesiones o padecimientos en los animales, en este caso la presencia de nefritis intersticial es sugestivo de la presencia de leptospirosis, aunque no es la única causa de esta lesión, si se compara con los resultados serológicos y la historia clínica, la lesión puede llegar a ser concluyente.

En el caso de la prueba de PCR, esta ha tenido un gran auge en la investigación, sin embargo en el plano clínico no se utiliza por la falta de laboratorios donde se realice esta prueba, ya sea por la falta de equipo, reactivos o por la falta de personal capacitado

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el diagnóstico de la leptospirosis se basa en la prueba de AM la cual es considerada la prueba de referencia a nivel internacional, sin embargo, ésta sólo revela la presencia de anticuerpos contra leptospira, lo que no necesariamente indica un proceso de enfermedad activa. La AM es la prueba “de oro” para el diagnóstico de leptospirosis dejando de lado la observación en campo oscuro y la histopatología, que son utilizadas como apoyo para la confirmación del diagnóstico. En la actualidad, la biología molecular se abre paso para ser utilizada como una herramienta más para el diagnóstico, y cada vez son más los adelantos en este ramo lo que ha propiciado la implementación de técnicas de laboratorio más especializadas, una de ellas es la prueba de reacción en cadena de la polimerasa PCR. Esta técnica se basa en amplificar regiones de ADN únicas del microorganismo con iniciadores específicos, los fragmentos amplificados son teñidos con bromuro de etidio y visualizados en geles de agarosa. Esta prueba es altamente sensible y específica y las muestras con las cuales se puede trabajar son orina, riñón e incluso sangre, de animales vivos o recientemente muertos o sacrificados.

## 3. HIPÓTESIS

Los títulos de anticuerpos séricos contra serovariedades patógenas de *Leptospira* tienen relación con la presencia de nefritis intersticial en tejido renal de cerdos destinados al abasto, independientemente del aislamiento bacteriano o la presencia de ADN de leptospira.

## 4. OBJETIVOS

1.4.1 Demostrar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* en muestras de suero obtenidas de cerdos destinados para abasto.

1.4.2 Demostrar la presencia de ADN de *Leptospira* en muestras de riñón y orina obtenidas de cerdos destinados para abasto.

1.4.3 Aislar leptospiras patógenas presentes en las muestras de orina y riñón obtenidas.

1.4.4 Demostrar la presencia de nefritis intersticial y de formas similares a *Leptospira* mediante histopatología.

1.4.5 Comparar los resultados de las pruebas serológica, bacteriológica, histopatológica y molecular utilizadas para el diagnóstico de leptospirosis y relacionar los hallazgos encontrados para definir la utilidad de las mismas para el establecimiento de un diagnóstico de leptospirosis.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS.

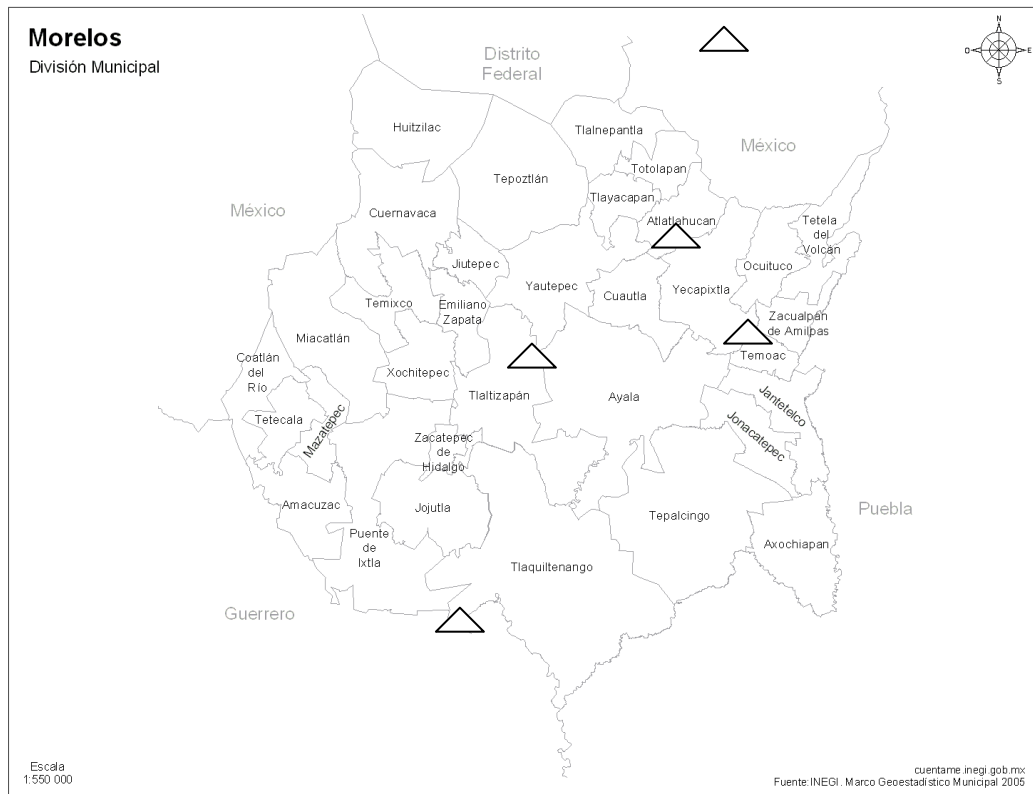
El material de laboratorio requerido para la realización de los experimentos serológicos, bacteriológicos y de biología molecular fue proporcionado por el Grupo de Investigación en *Leptospira* y Leptospirosis (GRILLEP) del Departamento de Microbiología e Inmunología y para la realización de la histopatología por el Departamento de Patología, ambos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Inicialmente, se muestrearon 168 sueros de cerdas en diferentes tercios de gestación, de 5 granjas para un estudio serológico. Del sexto grupo (rastros) se recolectó suero, riñón y orina, de 68 animales.

**Cuadro 2 Grupos estudiados.**

<b>Granja</b>	<b>Ubicación</b>	<b>No. animales muestreados</b>	<b>Tipo de producción</b>	<b>Vacunación</b>
1	Tezoyuca, Morelos	29	Ciclo completo	No
2	Yautepec, Morelos	34	Ciclo completo	No
3	Cuautla, Morelos	30	Ciclo completo	Si
4	San Pedro Atocpan, Tlahuac	42	Ciclo completo	Si
5	Puente de Ixtla, Morelos	33	Lechonera	Si
6 (Animales para abasto)	Zona del bajío	68	No aplica	Sin dato

**Figura 1 Localización de las granjas.**



**Figura 2 Área de vientres Granja 1**



**Figura 3 Área de engorda Granja 2**



**Figura 4 Área de engorda Granja 3**



**Figura 5 Área de vientres Granja 4**



Posteriormente se muestrearon 68 cerdos (machos y hembras) destinados para abasto directamente de la línea de sacrificio del rastro Los Arcos ubicado en el km 23.5 de la carretera México-Texcoco en el municipio de Los Reyes La Paz, Estado de México. Los animales provenían de los estados de Jalisco y Michoacán.

### 2.1 Toma de las muestras

En el caso de las hembras muestreadas en las granjas, se obtuvo sangre (aproximadamente de 8 a 10 ml), de la vena yugular en la fosa del cuello “golfo de la yugular” con jeringas estériles de 10 ml.

**Figura 6 Toma de muestra sanguínea.**



De los animales del rastro la sangre se colectó en el momento del degüello de los animales previa insensibilización eléctrica, en tubos Falcón® de 50 ml, identificando las muestras. Posteriormente, los animales pasaron al contenedor de agua caliente y al salir de este se abrieron los animales en canal exponiendo los órganos internos, en ese momento y en la línea del rastro se obtuvo un riñón completo en bolsas de plástico

nuevas previamente identificadas, revisando y anotando lesiones in situ; de orina se colectaron aproximadamente entre 8 y 10 ml directamente de vejiga con jeringas estériles de 10 ml. Con la finalidad de cultivar muestras frescas, los riñones y las orinas se trabajaron en el mismo rastro haciendo los cultivos y preparándolas para PCR e histopatología, las muestras de sangre fueron transportadas para la obtención del suero al laboratorio del GRILLEP.

## 2.2 Aglutinación microscópica (AM).

Una vez coagulada la sangre se separó el suero en tubos Eppendorf® y se centrifugaron a 3,000 rpm (1,062 xg). (Mspeed fug Savant SFR13K®). Los sueros así separados se conservaron en congelación a – 20°C en volúmenes de 1.5 ml hasta su uso en tubos de plástico tipo Eppendorf® debidamente identificados. Se realizaron diluciones dobles seriadas de los sueros con una dilución inicial de 1:25 (40 µl de suero y 960 µl de PBS como diluyente). En placas de 96 pozos con fondo plano, (Nunc®). Se hizo una prueba tamiz en la cual se agregan 50 µl de la dilución del suero 1:25 en cada pozo de la fila A, (cada fila era para cada uno de los sueros) mientras que en las columnas de la 1 a la 10, se colocaron 50 µl de las 10 serovariedades (ver cuadro3). Un testigo (+) y otro (-) se colocaron en las columnas 11 y 12 respectivamente. Los 50 µl de cultivo de cada una de las 10 serovariedades de leptospiras tenían de 4 a 7 días de desarrollo en medio líquido EMJH y mostraban de 200 a 400 leptospiras por campo visual con el objetivo 40X. Las serovariedades seleccionadas fueron proporcionadas por el WHO/FAO/OIE – Collaborative Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Australia and Western Pacific Region de Brisbane, Australia. Cabe mencionar que se decidió usar las 10 serovariedades del cuadro 3 por acuerdo de laboratorios que



realizan el diagnóstico de leptospirosis (GRILLEP y DPA Cerdos-FMVZ, UNAM; UAM-Xochimilco; CENASA y CENID-Microbiología).

**Cuadro 3 Serovariedades utilizadas en la prueba de AM**

ESPECIE	SEROGRUPO	SEROVARIEDAD	CEPA
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez-Bratislava
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Paidjan
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond-Utrecht IV
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3207
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin

Las mezclas suero-antígeno se incubaron a 30°C por una hora y se observaron bajo un microscopio de campo oscuro. En esta prueba, se consideró como reacción positiva aquella donde más del 50% de las leptospiras en el campo aglutinaban y como negativa cuando más del 50% de leptospiras se encontraban sin aglutinar. A los sueros que resultaron positivos en la prueba tamiz (dilución 1:50), se les realizó una serie de diluciones dobles seriadas hasta 1:6,400 para determinar el título de anticuerpos alcanzado. Colocando el suero en la columna 1 hacia abajo, en la fila A corresponde la dilución 1:50, en la B 1:100, en la C 1:200, en la D 1:400, en la E 1:800, en la F 1:1,600, en la G 1:3,200 y en la H 1:6,400. Se consideró a los sueros con título igual o mayor de 1:100 como positivos.<sup>49,5</sup>

### 2.3. Aislamiento bacteriano.

En las granjas y en el rastro se acondicionó un área para trabajar las muestras de riñón y orina, en condiciones de asepsia y con lámparas de alcohol como mecheros.

2.3.1. Orina. Las muestras de orina fueron obtenidas en un volumen mínimo de 8.5 ml mediante punción vesical con jeringas estériles, inmediatamente después de la eutanasia de los cerdos. Se tomó 0.5 ml de la muestra para inocular inmediatamente en 5 ml de medio líquido EMJH con 5-fluor-uracilo como inhibidor de contaminantes bacterianos y 0.5 ml en el mismo medio sin inhibidores.<sup>5</sup> Se realizaron dos diluciones decimales en el mismo medio y se incubaron en el laboratorio a 30°C revisándose semanalmente en el microscopio de campo oscuro durante 6 meses.<sup>5</sup>

2.3.2 Riñón. Ya en el área de asepsia, para descontaminar la superficie exterior del riñón, se sumergió en un vaso de precipitado con 250 ml de una solución de cloruro de benzalconio al 0.25% durante 10 min., para después secarse con toallas de papel estériles. El riñón así desinfectado, se cortó longitudinalmente por el borde medio externo para exponer corteza, médula y pelvícula, y se revisó el estado macroscópico del órgano. Se realizó un macerado con un rallador metálico estéril y se colectó aproximadamente 1g de tejido renal, se le adicionó 1ml de SSF estéril; 0.3 ml de la suspensión fue depositado en 5 ml de medio EMJH con 5-fluor-uracilo y otros 0.3 ml en medio EMJH sin inhibidores. Se realizaron tres diluciones decimales hasta 1:1,000 en tubos con medio EMJH sin inhibidores. Los cultivos y las diluciones se transportaron al laboratorio a una temperatura de no más de 30°C en cajas de poliestireno. Una vez en el laboratorio, tanto los cultivos como las diluciones se incubaron a una temperatura de 30°C.<sup>49</sup> Se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas semanales con la finalidad de detectar desarrollo bacteriano. Se

realizaron subcultivos mensuales en medio EMJH sin inhibidores durante 6 meses y los medios de cultivo se conservaron hasta por 4 meses.<sup>49</sup>

**Figura 7 Corte transversal del riñón**



**Figura 8 Rallador utilizado para macerar**



**Figura 9 Macerado de la muestra**



**Figura 10 Inoculación**



#### 2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

De la muestra de orina, se depositaron 7.5 ml en un tubo plástico estéril conteniendo 2.5 ml de solución de fijado (solución salina fisiológica estéril, con 0.1 M de EDTA y 0.5% de formalina). De igual forma se tomó 0.5 ml de la suspensión de tejido renal obtenido mediante raspado y se depositó en un tubo eppendorf conteniendo 1 ml de la misma solución de fijado. En el laboratorio, se procedió a realizar la extracción de ADN para la prueba de PCR utilizando el sistema QIAamp® DNA Mini Kit (QUIAGEN®) para purificación de ADN a partir de muestras de tejido. Siguiendo el protocolo, primero se pesaron aproximadamente 25 mg del macerado de riñón contenido en la solución de fijado, en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se congeló en nitrógeno líquido para facilitar la lisis del tejido. Se agregaron 180 µl de la solución amortiguadora ATL® y 20 µl de solución de Proteinasa K®, se mezcló y se incubó a una temperatura de 56°C en baño María hasta completar la lisis del tejido (de 14 a 16 horas). Después, se adicionaron 200 µl de la solución amortiguadora AL®, se mezcló durante 15 segundos y se incubó a 70°C durante 10 minutos. Se adicionaron 200 µl de etanol al 100 % y se mezcló hasta obtener una solución homogénea. Se pasó toda la solución a través de una columna QIAamp Spin®, con un tubo de 2 ml provistos en el sistema. Se centrifugó a 6,000 x g (8,000 rpm) durante 1 minuto. La columna fue transferida a otro tubo limpio y se adicionaron 500 µl de la solución amortiguadora AW1®; nuevamente se centrifugó y se transfirió la columna a otro tubo limpio y se adicionaron 500 µl de la solución amortiguadora AW2®; se centrifugó entonces a 20,000 x g (14,000 rpm) durante 3 minutos. Se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se le agregaron 200 µl de la solución amortiguadora AE® y se incubó de 1 a 5 minutos. a temperatura ambiente y se centrifugó finalmente a 6,000 x g (8,000 rpm) durante 1 minuto. La solución así obtenida contiene el ADN extraído y

purificado de la muestra de riñón. En el caso de las orinas se siguió el mismo protocolo sólo que en lugar de la solución ATL® se utilizó la AVL® y previo a la lisis, la muestra de orina se centrifugó a 16, 000 x g (13,000 rpm). Se realizó la medición del ADN extraído con un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000 UV/Visible) utilizando una cubeta de cuarzo con capacidad de 1 ml, colocando 999 µl de agua destilada y 1 µl de la muestra de ADN se midió la absorbancia obteniendo un rango de material de ADN en ng/µl con la siguiente fórmula: lectura a 260 nm x fd 50x fd 1000, donde fd = factor de dilución. Las muestras de orina así como las muestras de riñones de cerdos sacrificados en rastro, se analizaron mediante la prueba de PCR utilizando inicialmente dos pares de oligonucleótidos previamente diseñados para la detección de leptospiras patógenas: G1y G2 que amplifica un fragmento de 285 PB para las especies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. meyeri*. Y B64-I y B64-II que amplifican un fragmento de 563 pb para la especie *L. kirschneri*.<sup>54, 55</sup> Estos iniciadores fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM. Se utilizó una solución de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a una concentración de 10 mM cada uno y Taq Polimerasa 5 U/µl ambos de la marca Roche (Fast Star Taq ADN Polymerase). La prueba de PCR consistió de una fase inicial de desnaturalización del ADN a 94°C durante 5 minutos; seguida de una fase de desnaturalización de 94°C durante 30 segundos, y a continuación una fase de alineación con oligonucleótidos a 55°C durante 45 segundos y una fase de extensión a 72°C durante 50 segundos. Esta serie de fases se repitió durante 40 ciclos. Finalmente, una fase de 72°C durante 7 minutos.<sup>56, 57</sup> El ADN amplificado se visualizó y fotografió en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y expuesto a la luz ultravioleta en un transiluminador (FOTODINE®).<sup>58, 59</sup>

## 2.5. Histopatología.

Se seleccionaron 21 riñones, (14 positivos y 7 negativos a la prueba de AM) de Durante la colección de muestras se tomaron de los riñones seleccionados muestras representativas, realizando cortes transversales de 2.0 cm. de grosor en promedio, abarcando corteza, médula y pelvícula renal. Dichos fragmentos se fijaron por inmersión en formalina amortiguada al 10% a temperatura ambiente. Una vez fijadas las muestras, se procesaron con la técnica rutinaria para histología, se embebieron en parafina, haciéndose cortes de 4 a 5  $\mu\text{m}$  de grosor. Las muestras de riñón cuyos títulos de anticuerpos séricos en la prueba de AM fueron de 1:200 o mayores, se remitieron para realizar cortes histológicos y teñirlos con hematoxilina y eosina (HE) así como con la tinción argéntica de Warthin –Starry.<sup>49, 60</sup> Para la revisión de las laminillas se consideraron los siguientes aspectos: En el caso de la tinción de HE para cada laminilla, se revisaron por completo las secciones de riñón con el objetivo seco débil (10X), desde la corteza hasta la pelvícula renal, y en caso de presentarse alguna lesión o alteración, se revisaron con detalle con el objetivo seco fuerte (40X). Los criterios aplicados para determinar grado y extensión de la lesión fueron los siguientes: En el intersticio se buscaría la presencia de células inflamatorias, neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, células multinucleadas y presencia de fibrosis; en los túbulos, si existía degeneración, necrosis y células inflamatorias; en los glomérulos, si había engrosamiento de la cápsula y en el ovillo si presentaba proliferación celular o membranal. En el caso de la tinción de Warthin – Starry, se llevaron a cabo dos revisiones, la primera en seco fuerte (40X) y la segunda en inmersión (100X), revisándose 50 campos aleatorios en cada revisión, buscando formas semejantes a leptospira.<sup>61, 62</sup>

## 2.6. Análisis estadístico.

El análisis descriptivo se presenta en algunos casos como frecuencias y en otros como proporciones con intervalos de confianza del 95%, prevalencias (con lesiones renales) y seroprevalencias (Cuadro 3 serovariedades). Los cálculos se realizaron con los datos presentados en el Apéndice 1 (base de datos) programando las fórmulas en Excel 2000®, las figuras se desarrollaron con base en los resultados de proporción e intervalos de confianza. Los títulos de anticuerpos fueron expresados como media geométrica del código (MGC) de la dilución (1:100=1, 1:200=2, 1:400=3, 1:800=4,) IC=95% y títulos recíprocos (ver cuadro 4). En la media geométrica los valores 0 son excluidos, por lo cual las medias geométricas del título sólo representan a los animales seroreactores positivos y excluyen a los negativos, las medias geométricas de los títulos fueron calculadas únicamente para el análisis estadístico descriptivo. Se realizó la transformación del título codificado al título recíproco para expresar su valor de acuerdo al valor de la dilución original, considerando a la título 1:100 con el código 1 y así sucesivamente. (Ver cuadro 5).

### Cuadro 4 Formulas utilizadas

- **Proporción (%)**= No. de muestras positivas\*100/(n), donde n= número de animales muestreados e intervalo de confianza (IC) al 95%= [(Proporción (%)  $\pm$  1.96\*Raíz (((Proporción)\*(100-Proporción))/(n)))]], donde n= número de animales muestreados.
  - **Media geométrica del título codificado**=  $\sqrt[n]{(y_1)(y_2)(y_3)\dots(y_n)}$ , (donde n= número de seroreactores positivos).
  - **Error estándar**= desviación estándar\* del título codificado /  $\sqrt{n}$  (donde n= número de seroreactores positivos).
- \*Desviación estándar =  $\sqrt{\frac{\sum (X-X)^2}{n-1}}$        $\sqrt{\sum (X-X)^2/n-1}$
- **Intervalo de confianza al 95%**= media geométrica del título codificado  $\pm$  1.96 \* Error estándar.
  - **Título recíproco**=  $2^{(MGC)} * (50)$ , donde 50 es la base de la dilución utilizada y 2 representa el intervalo de doble dilución.
  - **Regresión logística** razón de momios



**Cuadro 5 Ejemplo de la manipulación de títulos, títulos codificados y transformación a título recíproco.**

No. muestra	Título	Código	Estadístico	
1	1:100	1	No. muestras	5
2	negativo		No. seroreactores	4
3	1:200	2	MGC	2.2
4	1:400	3	Error estándar	1.2
5	1:800	4	IC 95%	0.6
MGC		2.2	MGC (± IC 95%)	2.2 (± 0.6)
			Título recíproco	1:281.3

El análisis estadístico para la asociación granja y seroconversión a *Leptospira*, (ver serovariedades cuadro3) fue investigada utilizando  $\chi^2$  ( $p \leq 0.05$ ). De los animales muestreados en rastro se utilizó regresión logística ( $p \leq 0.05$ ) y razón de nomios (OR) con las variables seroprevalencia Bratislava y con lesión renal (macroscópica y microscópica). Los análisis se realizaron con los programas NCSS 2000 y PASS 2000.

63

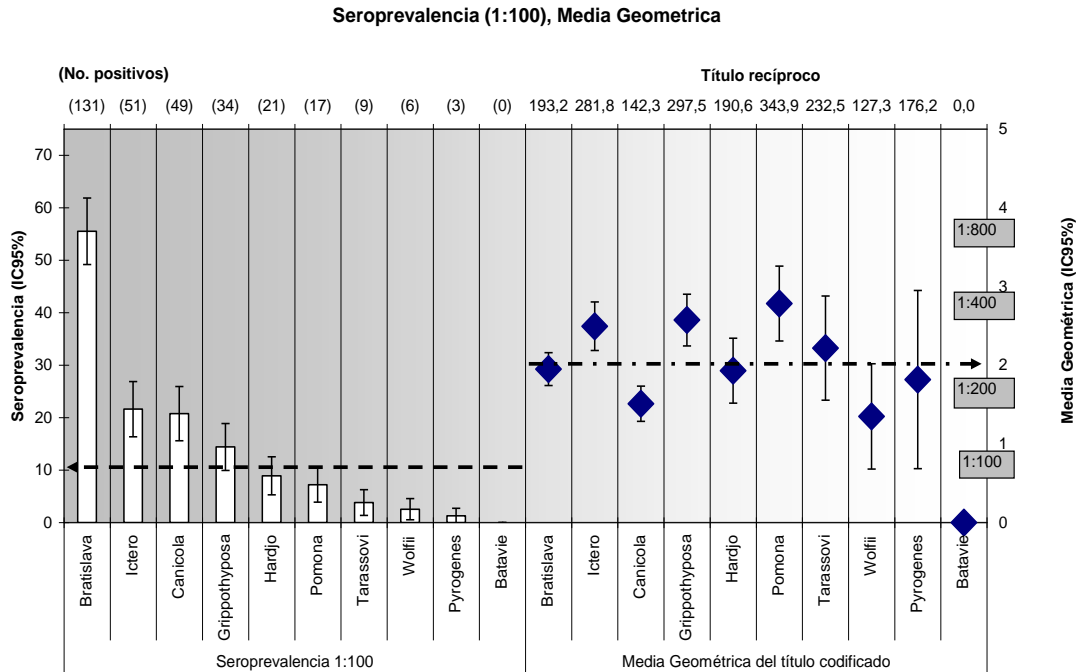
### III. RESULTADOS

3.1 Aglutinación microscópica (AM). Se muestrearon 236 animales provenientes de 5 granjas y de un rastro, de los cuales 159 (67.3%) (IC 95% 61.3-73.3%) fueron seroreactores positivos a una o varias de las 10 serovariedades incluidas en el panel de serología utilizando como punto de corte la dilución 1:100.

Los resultados totales de seroprevalencia por serovariedad con un punto de corte de 1:100 (IC 95%) y título recíproco fueron los siguientes: Bratislava 55.5% (49.1-61.8%) (1:193.2); Icterohaemorrhagiae 21.6% (16.3-26.8%) (1:281.8); Canicola 20.8% (15.6-25.9%) (1:142.3); Grippotyphosa 14.4% (9.9-18.8%) (1:297.5); Hardjo 8.8% (5.2-12.5%) (1:190.6); Pomona 7.2% (3.9-11%) (1:343); Tarassovi 3.8% (1.37-6.2%)

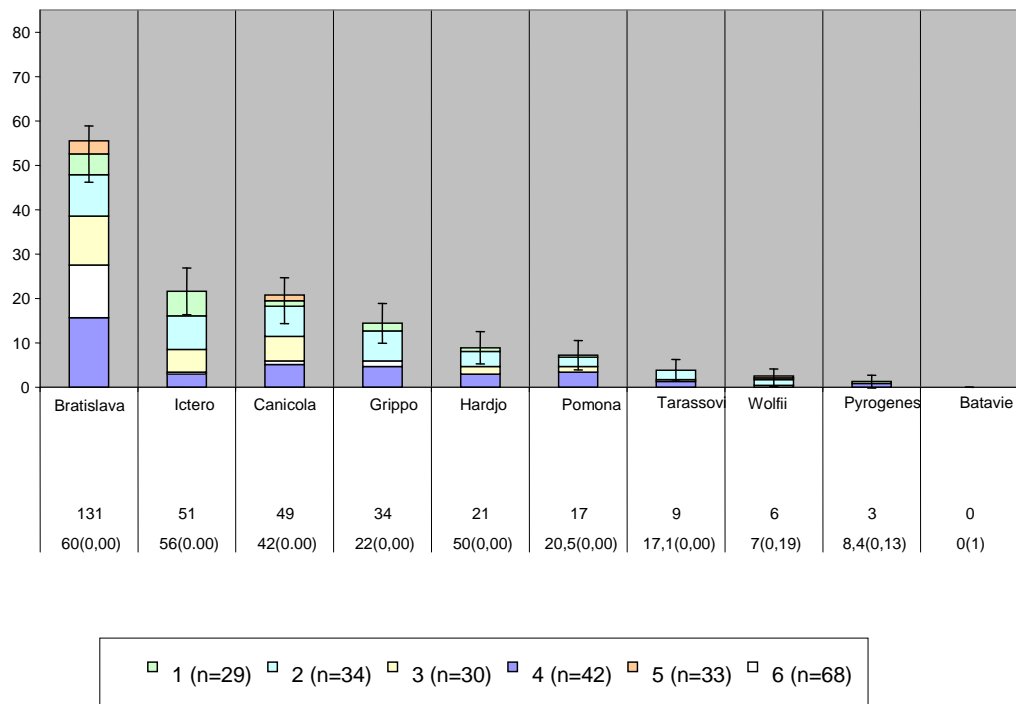
(1:232); Wolffii 2.5% (0.5-4.5%) (1:127.3); Pyrogenes 1.2% (-0.16-2.7%) (1:176.2) y ningún seroreactor a Batavie (figura 11).

**Figura 11. Panel izquierdo seroprevalencia por serovariedad e IC 95%, punto de corte 1:100. Panel derecho media geométrica del título codificado e IC 95%. Las líneas punteadas indican en el panel izquierdo una seroprevalencia del 10%, en tanto en el panel derecho indica una dilución de 1:200**



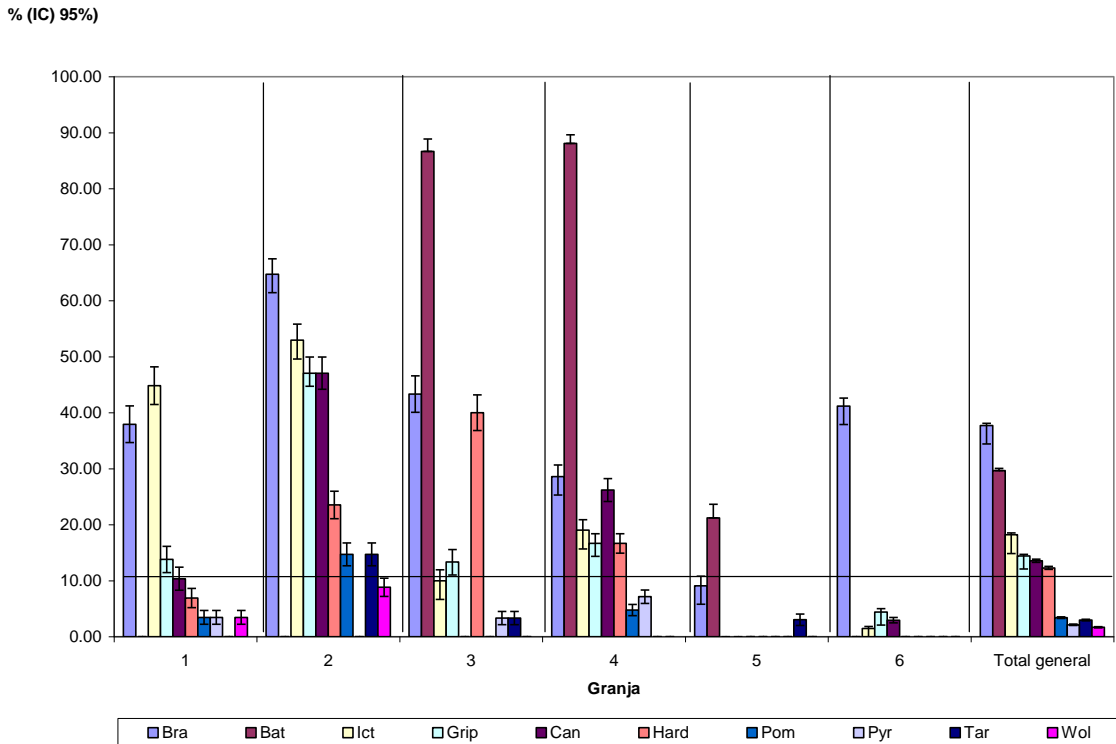
Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las seroprevalencias entre las 6 granjas muestreadas para las serovariedades Bratislava ( $\chi^2$ , 60.0 ( $p \leq 0.00$ ), Icterohaemorrhagiae ( $\chi^2$ , 56.0 ( $p \leq 0.00$ ), Canicola ( $\chi^2$ , 42.0 ( $p \leq 0.00$ ), Grippytyposa ( $\chi^2$ , 22.0 ( $p \leq 0.00$ ), las cuales están arriba del punto de corte de 10%; Hardjo ( $\chi^2$ , 50.0 ( $p \leq 0.00$ ), Pomona ( $\chi^2$ , 20.5 ( $p \leq 0.00$ ) y Tarassovi ( $\chi^2$ , 17.1 ( $p \leq 0.00$ ) tuvieron seroprevalencias menores al 10%. (Figura 12).

**Figura 12. Seroprevalencia total por serovariedad y por granja (IC 95%)**  
 Seroprevalencia (IC 95%)



Cuatro de las granjas muestreadas (de la 1 a la 4) mostraron una mayor diversidad en la seropositividad donde los animales muestreados son hembras en cría del primero, segundo y tercero tercios de la gestación. La granja lechonera y los animales del rastro (5 y 6) mostraron la menor diversidad. La serovariedad Bratislava es la predominante en todas las granjas (figura 13).

**Figura 13. Seroprevalencia por Granja y por serovariedad.**



La distribución de títulos predominantes, donde se observan seroreactores independientes fueron Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa y Pomona. (Figura 13) donde las diferencias entre granjas para las primeras tres serovariedades se observan en las granjas 1 a la 4 (Figura 13).

En la figura 13 también se aprecia que la serovariedad Bratislava es la predominante en todas las granjas, le siguen en orden decreciente Icterohaemorrhagiae, Canicola y Pomona.

3.2 Aislamiento bacteriano. En esta prueba no se obtuvieron resultados positivos, después de la revisión semanal de los tubos no se detectó ningún desarrollo que indicara la presencia de leptospiras. Se revisó hasta 10 meses después de haber sembrado las muestras y las diluciones.

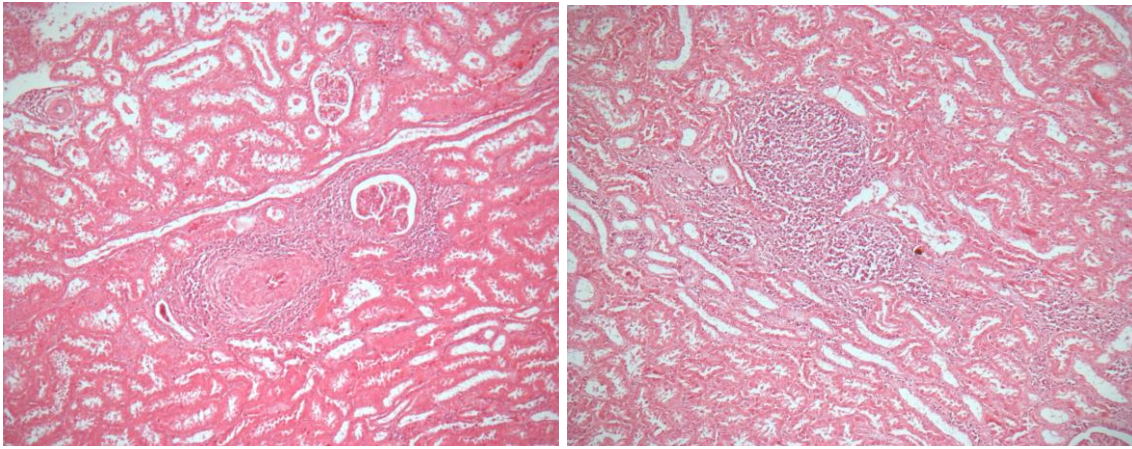
3.3 Prueba de PCR. El material obtenido a partir de la extracción de ADN fue de 50 a 350 ng/ $\mu$ l en las muestras de riñón y en el caso de las muestras de orina la mayor cantidad de ADN encontrada fue de 50 ng/ $\mu$ l. El resultado de las muestras de riñón y de orina fue negativo considerando que no hubo fragmentos amplificados de ADN de *Leptospira*.

3.4 Histopatología. De las muestras de riñón trabajadas, (muestras del rastro) se encontraron diferentes lesiones, las cuales se describen a continuación: se encontró nefritis intersticial linfoplasmocitaria de insípida a moderada multifocal, con degeneración y necrosis tubular leve a moderada multifocal y glomerulitis membranoproliferativa leve multifocal en todas las muestras remitidas, con diferentes grados de severidad.

En el caso de la tinción argéntica de Warthin-Starry, los positivos fueron las muestras: 5, 6, 8, 10, 11, 18, 19 y 21. Encontrándose formas similares a leptospira con el objetivo 100x.

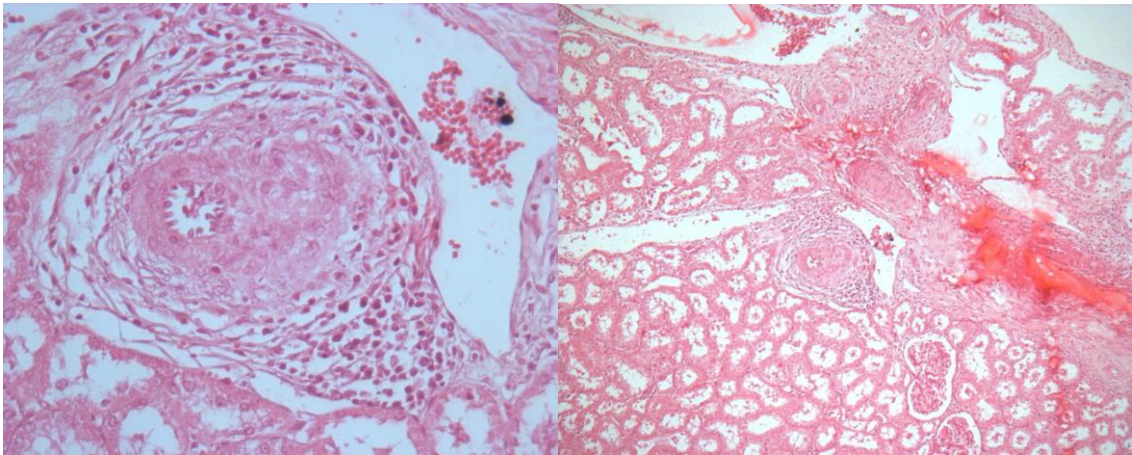
**Figura 15. Nefritis intersticial linfoplasmocitaria moderada multifocal con glomerulitis membrano proliferativa leve multifocal.**

**Figura 16. Nefritis intersticial linfoplasmocitaria moderada a severa multifocal, con necrosis tubular leve multifocal y glomerulitis membranosa leve multifocal.**

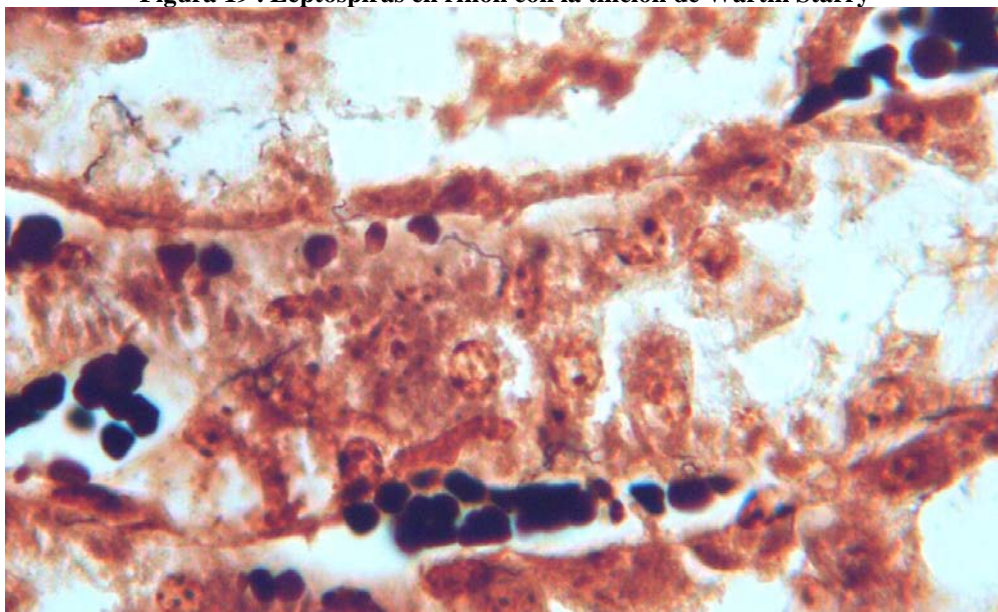


**Figura 17. Nefritis intersticial linfoplasmocitaria moderada multifocal, con glomerulitis membranoproliferativa leve multifocal.**

**Figura 18. Nefritis intersticial linfoplasmocitaria moderada multifocal, con glomerulitis membranoproliferativa leve multifocal.**

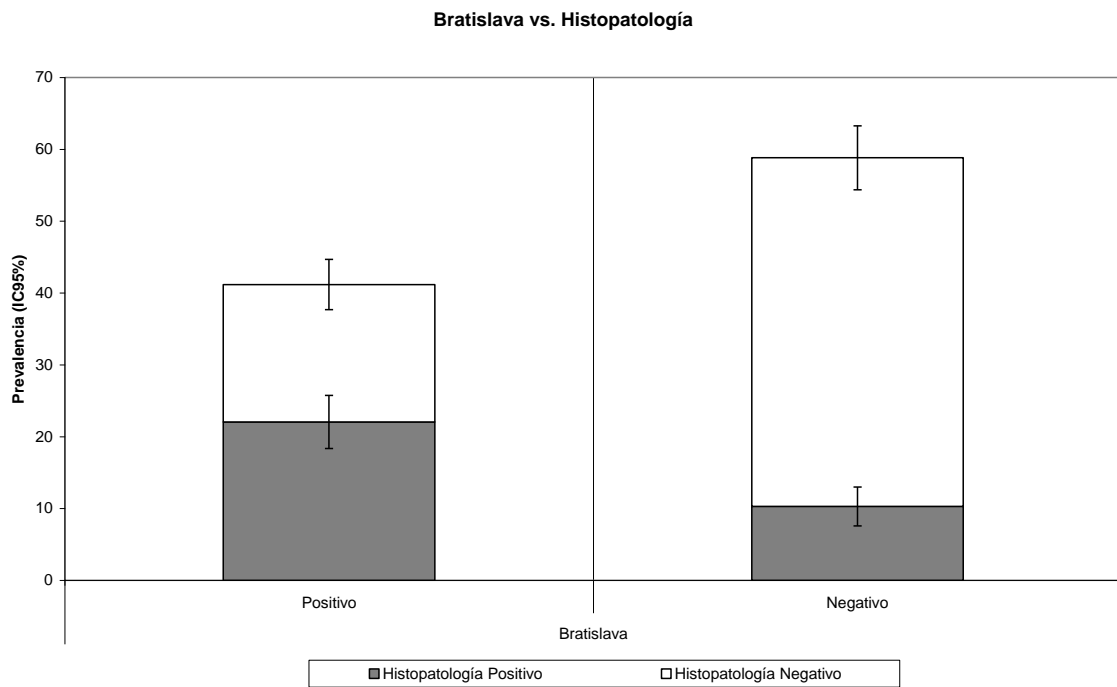


**Figura 19 . Leptospiras en riñón con la tinción de Wartin Starry**



Se realizaron diferentes análisis de asociaciones entre lesión macroscópica, lesión microscópica y serología a Bratislava ya que en estas muestras fue la serovariedad predominante, donde fueron utilizadas la regresión logística y Razón de momios (Figura 19).

**Figura 19. Relación entre serología positiva (Bratislava) y lesiones en histopatología.**



Se observó una relación estadísticamente significativa para el modelo de regresión logística [ $\chi^2$ , 20.2 ( $p \leq 0.00$ ): variable de respuesta “lesión histopatológica positiva”, con las variables de efecto “lesión Macroscópica” [ $\chi^2$ , 6.8 ( $p \leq 0.00$ ) OR, 21.2 (IC 2.1-210)]; y “serología positiva a Bratislava  $\geq 1:100$ ” [ $\chi^2$ , 7.48 ( $p \leq 0.00$ ) 5.5 (IC 1.6-18.7)]. Se observó una relación estadísticamente significativa para el modelo de regresión logística [ $\chi^2$ , 20.3 ( $p \leq 0.00$ )] variable de respuesta “serología a Bratislava  $\geq 1:100$ ”, con las variables de efecto “Lesión Macroscópica” ( $\chi^2$ , 0.0 ( $p \leq 0.9$ ) y “Lesión microscópica” ( $\chi^2$ , 7.48 ( $p \leq 0.00$ ) 5.5 (IC 1.6-18.7).

#### IV. DISCUSIÓN

La prueba de AM sigue siendo la más específica, sin embargo el hecho de sólo detectar anticuerpos contra leptospira no determina la presencia de la enfermedad. Al inicio de este trabajo se planteo el tomar muestras de suero, obtener el titulo de anticuerpos y así determinar de que animales (los que tuvieran títulos de 1:100 o mas altos) muestrear riñón y orina para aislamiento y PCR. El muestreo serológico se realizo entre los meses de Julio a Septiembre, tomando en cuenta que es la época del año donde hay mayor precipitación pluvial y por lógica las condiciones más favorables (encharcamientos) para la presencia de Leptospira en las granjas. Los niveles de bioseguridad eran variables, algo que no se tenía contemplado evaluar pero que si nos indica algunos puntos interesantes. En la granja 5 (lechonera) se tenía un programa de cuarentena, vacunación y el flujo de animales era controlado, obteniendo un seroprevalencia baja con solo tres serovariedades presentes (Bratislava, Canicola y Wolffi) y con títulos bajos. En las granjas 3 y 4 que eran de ciclo completo, se tenía calendario de vacunación pero no existían áreas de cuarentena, el mismo manejo y la introducción de animales para recría favorecían la existencia de los problemas con Leptospira y otras enfermedades aunque no limitaba la producción si se nos indico que existían abortos en estas épocas del año. Dando como resultado una alta seroprevalencia a varias de las serovariedades utilizadas. En el caso particular de la granja 1, el nivel de bioseguridad era pobre ya que no contaba con programa de vacunación, los límites de la granja con otras instalaciones no existían, se alimentaba a los animales con pollo crudo de granjas cercanas. Se tenía convivencia con perros que estaban en la granja, existían encharcamientos; además tenían problemas de otras enfermedades. El resultado una alta seroprevalencia a diferentes serovariedades de Leptospira. De las muestras de rastro la



nula información nos deja con poco que analizar aunque la presencia de Bratislava sigue siendo significativa.

En el caso de las granjas analizadas los resultados nos indican en primer plano que aquellas en las que la bioseguridad y la aplicación de medidas sanitarias son mejores la seroprevalencia es menor en comparación con las que no contaban con estas medidas. La serovariedad con mayor seroprevalencia sigue siendo Bratislava, la cual en el momento del estudio no se tenía incluida en las bacterinas utilizadas para inmunizar contra *Leptospira*. De acuerdo a otros estudios tanto a nivel mundial como a nacional, donde también se reporto a Bratislava como la más encontrada hay que mencionar que esta serovariedad ha tenido una importante presencia en los últimos años en las granjas de cerdos.

**Cuadro 6 Reportes serológicos. (\*)Bovinos, (\*\*) Humanos.**

AUTOR Y AÑO	LUGAR	SEROVARIEDAD	PORCENTAJE
Boqvist S. <i>et al</i> 2002 <sup>64</sup>	VIETNAM	Bratislava	51.7
Cisneros MA. <i>et al</i> 1995-2000 <sup>65</sup>	MEXICO	Bratislava	22.5
*Atxaerandio R. <i>et al</i> 2005 <sup>66</sup>	ESPAÑA	Bratislava	25.4
Burriel AR. <i>Et al</i> 2003 <sup>67</sup>	GRECIA	Bratislava	45.6
**Céspedes M <i>et al</i> 2004 <sup>68</sup>	PERU	Bratislava	38.60
Ramírez JM 2008	MEXICO	Bratislava	

En el caso del aislamiento es conocido que el microorganismo es de lento desarrollo *in vitro* y la mayoría de las veces no se logra el aislamiento por los contaminantes e inhibidores presentes en la muestra, aun si se tratase de una muestra diagnosticada como positiva en AM. La dificultad para muestrear a partir de los animales de las granjas dada por la poca coordinación (cambios en los horarios de matanza, diferentes destinos de lo animales y tratos con terceras personas) afecto la disposición de los animales y la oportunidad de estar presentes en el momento del sacrificio de estos animales para poder obtener las muestras determino el muestrear a partir de rastro, donde se sacrificaban cerca de 500 animales procedentes de diferentes estados del país

principalmente de Jalisco, Michoacán, Querétaro, Veracruz, la rapidez del proceso no permitió en algunos casos la obtención adecuada de las muestras para serología, aislamiento y PCR. Sin embargo se implementó un área donde trabajar en condiciones de asepsia. A pesar de esto no se obtuvieron aislamientos. Cabe mencionar que la eliminación intermitente, así como el número de microorganismos viables determina una mayor o menor probabilidad de aislamientos. Otros factores como la temperatura (mayor a 20°C), un pH bajo y la lisis celular son factores que contribuyen a la muerte de la *Leptospira*.<sup>8</sup>

En el caso de la prueba de PCR el resultado muestra que la extracción es de suma importancia, la calidad del ADN que se obtiene de las muestras, la hemoglobina, sales biliares, así como variaciones de pH, pueden actuar como inhibidores de la PCR.<sup>70</sup>

En este caso no se pudo amplificar ningún segmento de ADN de *leptospira* de las muestras trabajadas, posiblemente por el tiempo transcurrido entre la toma de muestra y la extracción de ADN, además del tiempo para correr las muestras por PCR. Se realizaron varias extracciones a partir de los tejidos viendo que en algunos casos con muestras inoculadas en el laboratorio (antes de realizar la extracción se le adicionaba cultivos de *leptospiras* cuantificados) se obtenía una amplificación de ADN de *leptospira*, comparándolos con los controles, los cuales eran cultivos purificados de *leptospiras*, y observando que pasados algunos días estos mismos riñones inoculados en el laboratorio dejaban de amplificar, independientemente de la extracción utilizada se debe realizar la amplificación inmediatamente obtenido el extracto de ADN.

En el caso de histopatología los resultados encontrados al comparar con los de AM se observó que existe relación estadísticamente significativa entre el título de anticuerpos y las lesiones en algunos riñones. Hay que mencionar que la serovariedad Bratislava y la presencia de lesiones en Histopatología concuerdan con otros estudios en México donde

se reporta a Bratislava como la más seroprevalente por encima de serovariedades como Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola y Grippytyphosa.<sup>15</sup>

En otros casos las lesiones pudieran estar relacionadas con deficiencias vitamínicas y otras enfermedades presentes en los cerdos muestreados. La falta de información de las granjas en cuanto a que enfermedades se han dado, programas de cuarentena y vacunación; y en el caso de las muestras obtenidas del rastro, en cuanto a de que animales provienen, que enfermedades, tratamientos, programas de nutrición tuvieron nos deja abierta la discusión si estas lesiones se deben a otras etiologías, como deficiencias de vitamina A o circovirus.<sup>40</sup>

## V. CONCLUSIONES

1.- La prueba de AM demostró ser la más útil para la detección de animales seroreactores ya que el manejo de la muestra, en este caso suero, es más fácil y la realización así como la interpretación no es tan complicada. Sin embargo, el hecho de sólo detectar anticuerpos contra leptospira es indicativo que el animal muestreado fue vacunado o estuvo en algún momento en contacto con el agente, sin poder determinar si estuvo en un proceso de leptospirosis.

2.- La mayor seroprevalencia de la serovariedad Bratislava concuerda con los estudios serológicos de los últimos 10 años. Sin embargo este es un indicativo de que esta serovariedad es la más presente aunque poco diagnosticada por la falta de una presentación clínica.<sup>69, 62, 71</sup>

3.- En el caso del aislamiento bacteriano, se confirmó que es difícil esto se debe a los requerimientos de la bacteria y a la presencia de otras bacterias (contaminación de la muestra), en el caso de la toma de la muestra en el rastro después de haber pasado al animal por el contenedor de agua caliente probablemente esto provoco lisis celular y liberación de hemoglobina incluso eliminando a los microorganismos, cabe mencionar que leptospira no resiste temperaturas mayores a 41-42 °C, en medios de cultivo en el laboratorio.<sup>5</sup> El manejo de antibióticos es otro factor a considerar ya que estos se utilizan de rutina en las producciones porcinas incluso como aditivos en los alimentos concentrados lo que interfiere con el aislamiento. Los aislamientos que se han logrado en otros estudios han sido a partir de brotes de abortos.<sup>72</sup> Hay que mencionar que teniendo un mejor manejo de la muestra, una historia clínica completa y un previo diagnóstico serológico positivo a leptospirosis es más factible lograr un aislamiento y una identificación del agente.

4.- En la prueba de PCR es claro que el punto más importante al realizar esta prueba es en la extracción del ADN de las muestras frescas, no congeladas y la realización inmediata de la prueba después de la extracción. Sin embargo, es de suma importancia detectar la presencia del agente para determinar la existencia de una infección. Recordemos que la AM solo detecta anticuerpos presentes en el animal, no indica que exista el agente en ese momento. La utilización de antibióticos en los animales ya sea como promotores de crecimiento o en caso de tratamiento nos dificulta la posibilidad de aislar al agente y de posteriormente obtener ADN de *Leptospira* de este tipo de muestras. La eliminación intermitente de leptospiras, la acidificación de la orina, pH menor a 6.8 evitan la detección de ADN de los microorganismos. <sup>5</sup>

5.- En cuanto al estudio histopatológico cabe mencionar que sirve para confirmar un diagnóstico de leptospirosis sobre todo cuando se cuenta con las pruebas de AM y PCR, es importante mencionar que para un buen diagnóstico en el caso de la leptospirosis se requiere primero de una buena historia clínica, de la complementación de las pruebas de AM y PCR, y en el caso de animales a los que se les realice necropsia, la histopatología para confirmar el diagnóstico. Si las lesiones son producidas exclusivamente por el agente o si es causada por otros factores.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- 1.- González GJA. Leptospirosis. Monografía Univ. Central de Las Villas, Cuba.1989.
- 2.- Ferguson TR. Leptospirosis surveillance 1990-1992. Communicable Disease Report 3:47-48, 1993.
- 3.- 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.
- 4.- Fresno CC. Leptospirosis. Una aproximación al tema. Control Nacional de Información de Ciencias Médicas. Departamento de servicios especiales de información. C. Havana. 1996.
- 5.- Faine S. Leptospira and Leptospirosis. 2<sup>nd</sup> ed. Melbourne: MediSci, 1999.
- 6.- Radostitis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino . McGraw Hill-Interamericana España 1999.
- 7.- Levett PN. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews 2001; 14(2): 296-326.
- 8.- World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. International Leptospirosis Society. Malta. 2003
- 9.- Noguchi H, Kligler IJ. Immunological studies with a strain of leptospira isolated from a case of yellow fever in Merida Yucatán. The journal of experimental medicine. Vol. 32, 627:637 New York, 1920.
- 10.- Varela G, Zavala J. Estudio de la leptospirosis en Yucatan. Revista Mexicana de Medicina, Tomo XLII, 904: 485-486. 1962
- 11.- Zavala VJ, Pinzon CJ, Flores CM, Damian CA. La leptospirosis en Yucatán. Estudio serológico en humanos y animales. Revista Salud Publica de Mexico. 1984. 26; 3: 254-259.

- 12.- Rodríguez HGA. Exploración serológica de leptospirosis y brucelosis en el ganado bovino y porcino con historia clínica de aborto. Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México. 1969
- 13.- Jiménez AA. Exploración serológica de leptospirosis en cerdos. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México, 1971.
- 14.- Dikken H. Leptospirosis. Dirección General de Sanidad Animal. Secretaria de agricultura y ganadería. México, 1976.
- 15.- Moles CLP, Urrutia VRM, Diosdado VF, Morrilla GA. Frecuencia de leptospira interrogans en unidades de producción porcina del altiplano de México. Revista Veterinaria México, Mexico Vol.29 (1) 49-52,1998.
- 16.- Chávez TR. Análisis de los resultados obtenidos en el diagnóstico serológico de leptospirosis en animales de 1989 a 2004 en el departamento de Microbiología e Inmunología. Tesis de licenciatura. FMVZ. UNAM. 2006.
- 17.- Heath SE, Johnson R. Leptospirosis. JAVMA 1994; 205:1518-1523.
- 18.- Yanagawa R, Faine S. Morphological and serological análisis of leptospiral structure. Nature 1966; 211:823-826.
- 19.- Nauman KR, Holt CS, Cox DC. Purification ultrastructure and composition of axial filaments from *Leptospira*. J Bacteriol 1979; 137:1406-1412.
- 20.- Vinh T, Adler B, Faine S. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. J Gen Microbiol 1986; 132:103-109.
- 21.- Picardeau M, Brenot A, Saint Girones I. First evidence for gene replacement in leptospira spp. Inactivation of *L. biflexa* flab results in no motile mutants deficient in endoflagella. Molecular microbiology. France, 40 (1) 189-199, 2001.

- 22.- Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization, Publication No. 67. Geneva Switzerland. 1982.
- 23.- Trueba G. Biología de *Leptospira*. Memorias del Simposio internacional sobre *Leptospira* y leptospirosis en las Américas, Memorias. México 2004.
- 24.- Jost BH, Adler B, Faine S. Reaction of monoclonal antibodies with species specific determinants in *Leptospira interrogans* outer envelop. J Med Microbiol; 27:51-57. 1988.
- 25.- .- Krieg NR, Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 8<sup>th</sup> ed. Vol. I. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989.
- 26.- Ramadass P, Jarvis BDW, Corner RJ, Penny D, Marshall RB. Genetic characterizations of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. Int J Syst Bacteriol; 42:215-219. 1992.
- 27.- Subcomite de Taxonomia de *Leptospira*, Quito Ecuador, 2007.
- 28.- Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. London: Wolfe, 1994.
- 29.- Adler B, de la Peña –Moctezuma A. *Leptospira*. 3 ed. Iowa: Blackwell Publising Ltd, 2004.
- 30.- Ellis WA. Leptospirosis. J Small animal practice; 27: 683-692. 1986.
- 31.- Cole JR. Spirochetes. In: Carter GR, Cole JR, editors. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. San Diego: Academic Press Inc; 5 : 41-51. 1990.
- 32.- Ellis WA. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet. clin. North. Am., Food anim. Pract. 10. 1994.
- 33.- Ellis WA. Recent developments in bovine leptospirosis. Vet. Annu., 23, 91-95. 1983.
- 34.- Kingscotte B. *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in cattle in the south Okanagan district of British Columbia, Canada. Vet J. 26, 328-332. 1985.



- 35.- Little TWA, Parker BNJ, Stevens AE, Hathaway C and Markson LM. Innaparent infection of sheep in Britain by leptospire of the Australis serogroup. Res. Vet. Sci. 31:386-387. 1981.
- 36.- Kemenes F, Surjan J, Kasza L. Studies on equine leptospirosis with emphasis on eye lesions (equine periodic ophthalmic). Annalus Immunologiae Hungariae. 24:345-355. 1984.
- 37.- López PM, Ortega SC, Atilano LD, Dela Peña MA. Detección de anticuerpos contra leptospira interrogans en equinos dedicados a la producción de sueros hiperinmunes. Revista Veterinaria México, México 29 (2) 173- 179 1998.
- 38.- Carter ME, Cordes DO. Leptospirosis and other infections of rattus rattus and rattus norvergicus. New Zeland Vet. J. 28:45-50. 1980.
- 39.- Guidelines for the the control of leptospirosis. Geneva, WHO. (1982). World Health Organization. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneve, Switzerland; 1982; Publication N° 67).
- 40.- Taylor DJ. Leptospirosis. In: Taylor DJ, editor. Pig Diseases. 7<sup>th</sup> ed. Bury St Edmunds: St Edmunds bury Press, 2006.
- 41.- Plonait H, Bickhardt K. Manual de las Enfermedades del Cerdo. 2<sup>a</sup> ed. Zaragoza: Acribia, 2001.
- 42.- Dirección en internet: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>
- 43.- Ellis WA. Leptospirosis. In: D´allaire S, Mengeling WL, Straw BE, Taylor DJ, editors. Diseases of swine. 8<sup>th</sup> ed. Ames Iowa: Iowa State University Press, 1999.
- 44.- Morse et al., E.V. Morse, D.C. Baver, R.F. Langham, R.W. Lang and D.E. Ullrey, Experimental leptospirosis. IV. Pathogenesis of porcine *Leptospira pomona* infections. Am. J. Vet. Res. (1958), pp. 388–394.
- 45.- Hodges RT, Carter ME, Almand KB, Neddell W, Holland JTS, Lewis SF and Lake DE. An evaluation of the semi-automated complement fixation test and the microscopic

agglutination test for the serological diagnosis of bovine leptospirosis. *New Zealand Vet. J.* vol. 27 No. 5: 101-102. 1979.

46.- Mitchell A, Robertson AH and Boulanger P. Some observations on the diagnosis and epidemiology of leptospirosis in swine. *Can. J. Comp Med Vet Sci. Canada.* 30(8) 211-217. 1966.

47.- Hathaway SC. Porcine leptospirosis. *Pig new inform.* 6:31-34. 1981.

48.- Fennestad KL and Borg Petersen C. Experimental leptospirosis in pregnant sows. *J. Infect. Dis.* 116:57-66. 1966.

49.- Myers D. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de leptospirosis. *Nota Técnica No. 30*, Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis. OPS, 1985.

50.- Barocchi MA, Alberti KO, Ramos S, Tucundua M, Galvao M, Riley LN. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 191-195.

51.- Bulach DM, Kalambaheti T, De la Peña-Moctezuma A, Adler B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2002; 2: 375-380.

52.- Harkin KR, Rostho YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM. Comparison of polymerase Chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 9: 1230-1233.

53.- Thiermann A.B. Leptospirosis: current developments and trends. *JAVMA* 1984.184, 722-725.

54.- Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Shoone GJ, Van Eys GJJM, Everard COR, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 1691-1700.

- 55.- Murgia, R., Riquelme, N., Baranton, G. and Cinco, M. (1997). Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic *Leptospira* occurring in water. *FEMS Microbiology Letters* 148(1): 27-34.
- 56.- Gerritsen MJ, Olyhoek T, Smitts MA, Bokhout BA. Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semi quantitative detection of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo subtype Hardjobovis in bovine urine. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2805-2808.
- 57.- Bal, A.E., Gravekamp, C., Hartskeerl, R.A., De Meza-Brewster, J., Korver, H. and Terpstra, W.J. (1994). Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology* 32(8): 1894-1898.
- 58.- Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G. and Saint Girons, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 30(9): 2219-2224. (1992).
- 59.- Merien, F., Perolat, P., Mancel, E., Persan, D. and Baranton, G. Detection of *Leptospira* DNA by polymerase chain reaction in aqueous humor of a patient with unilateral uveitis. *Journal of Infectious Diseases* 168: 1335-1336. (1993).
- 60.- Wild CJ, Greenlee JJ, Bolin CA, Barnett JK, Haake DA, Cheville NF. An improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using antileptospiral antibodies on renal tissue. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14:20-24.
- 61.- Cheville NF, Cutlip RC. Ultrastructure of renal lesions in pigs with acute leptospirosis caused by leptospira Pomona. *Vet pathol* 1980, 17:338-351
- 62.- Boqvist S, Montgomery JM, Hurst M. *Leptospira* in slaughtered fattening pigs southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. *Veterinary Microbiology* 2003, 361-368.
- 63.- Hintze J, NCSS and Pass number cruncher statistical systems. Kaysville Utah, [Http://www.ncss.com](http://www.ncss.com) (copyright 2001).

- 64.- Boqvist S, Chau BL, Gunnarsson A, et al. Animal- and herd-level risk factors for leptospiral seropositivity among sows in the Mekong delta, Vietnam. *Preventive Veterinary Medicine*; 53:233-245. 2002
- 65.- Cisneros MA, Moles LP, Gavaldon D, Rojas N, Torres JI. Serología diagnóstica de leptospirosis porcina en México 1995-2000. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias-Microbiología, México. 2002.
- 66.- Atxaerandio R, Aduriz G, Ziluaga I, Esteban JI, Maranda L, Mainar-Jaime RC. Serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection and its association with abortions in cattle in northern Spain. *The Veterinary Record* 156:376-380 (2005).
- 67.- Burriel AR, Dalley C, Woodward MJ. Prevalence of leptospira species among farmed and domestic animals in Greece. *Veterinary record* 2003, 153 146-148.
- 68.- Cespedes M, Fernandez R, Rimarachín R, Taípe H, Cenepo J, Mori y Gonzales M, Torres I, Castillo C, Balda L, Tapia R, Gonzalez D, Glennly M. Leptospirosis: una enfermedad zoonótica hiperendémica en la Provincia de Coronel Portillo. Ucayali, Perú. *Rev peru med exp salud publica* 21(2), 2004.
- 69.- Bolin ca, Cassells JA, Hill HT, Frantz JC, Nielsen JN. Reproductive failure associated with *Leptospira interrogans* serovar *bratislava* infection of swine. *J Vet Diagn Invest* 1991, 3:152-154.
- 70.- Lucchesi P. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.37 no.2 Uberaba Mar. 2004
- 71.- Naito M, Sakoda Y, Kamikawa T, Nitta Y, Hirose K, Sakashita M, Kurokawa S, Kida H. Serological evidence of leptospiral infection in pig populations in different districts in Japan. *Microbiol. Immunol. Japan* , 51 (6), 593-599, 2007.

72.- Cisneros PMA, Ramírez NR, Torres BJ, Moles CLP, Gavaldón RD, Rojas SN, *et al.* First report of *Leptospira interrogans* serovar *portland-vere* isolation in México from a swine leptospirosis outbreak. Proceedings 14th International Pig Veterinary Society Congress, July 7-10 (Bologna) Italia, 1996:336.

**APENDICE 1**

**BASE DE DATOS**

Tabla 1.- Base de datos para los resultados de serología (microaglutinación) en base a título de la dilución.												
No. consecutivo	Suero	Granja	Batavie	Bratislava	Canicola	Grippotyphosa	Hardjo	Icterohaemorrhagie	Pomona	Pyrogenes	Tarassovi	Wolfii
76	1	1	0	800	0	0	0	0	0	0	0	0
77	2	1	0	100	0	0	0	800	0	0	0	0
78	3	1	0	0	0	0	0	800	0	0	0	0
79	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	5	1	0	100	0	0	0	800	0	0	0	0
81	6	1	0	400	0	0	0	0	0	0	0	0
82	7	1	0	200	0	0	0	800	0	0	0	0
83	8	1	0	100	0	100	0	200	0	0	0	0
84	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	10	1	0	0	100	0	200	100	0	0	0	0
86	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
87	12	1	0	0	0	0	0	800	0	0	0	0
88	13	1	0	0	0	400	0	0	0	0	0	0
89	14	1	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0
90	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
91	16	1	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
92	17	1	0	0	0	0	100	400	0	0	0	100
93	18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	20	1	0	400	100	0	0	800	0	0	0	0
96	21	1	0	0	0	800	0	0	800	0	0	0
97	22	1	0	400	0	0	0	0	0	0	0	0
98	23	1	0	0	200	0	0	800	0	0	0	0
99	24	1	0	0	0	0	0	200	0	400	0	0
100	25	1	0	0	0	0	0	400	0	0	0	0
101	26	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
102	27	1	0	0	0	400	0	200	0	0	0	0
103	28	1	0	800	0	0	0	0	0	0	0	0
104	29	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	1	2	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
106	2	2	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
107	3	2	0	0	100	0	0	800	0	0	0	0
108	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109	5	2	0	200	100	0	0	0	0	0	0	0
110	6	2	0	800	0	0	0	0	0	0	0	0
111	7	2	0	100	0	0	0	800	0	0	0	0
112	8	2	0	400	0	0	0	0	0	0	0	0
113	9	2	0	400	0	0	0	0	0	0	0	0
114	10	2	0	100	200	200	0	800	800	0	0	0
115	11	2	0	800	200	400	0	400	0	0	0	0
116	12	2	0	200	100	400	0	0	0	0	0	0
117	13	2	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
118	14	2	0	400	100	0	100	400	0	0	0	0
119	15	2	0	800	800	400	200	0	0	0	0	0
120	16	2	0	200	100	800	0	400	0	0	0	0
121	17	2	0	800	100	800	0	200	200	0	100	100
122	18	2	0	0	0	400	400	400	0	0	400	0

No. consecutivo.	Suero	Granja	Batavie	Bratislava	Canicola	Grippotyphosa	Hardjo	Icterohaemorrhagie	Pomona	Pyrogenes	Tarassovi	Wolfii
123	19	2	0	0	100	400	100	0	0	0	0	0
124	20	2	0	0	0	400	0	0	0	0	0	0
125	21	2	0	400	200	400	0	100	400	0	0	0
126	22	2	0	400	100	800	200	400	0	0	200	200
127	23	2	0	800	100	0	0	200	0	0	0	0
128	24	2	0	100	200	400	100	800	0	0	0	0
129	25	2	0	0	0	0	0	200	0	0	0	0
130	26	2	0	0	0	0	200	200	400	0	800	100
131	27	2	0	0	0	800	0	0	0	0	0	0
132	28	2	0	0	0	0	0	800	200	0	0	0
133	29	2	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
134	30	2	0	800	400	100	200	800	0	0	200	0
135	31	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
136	32	2	0	100	0	400	0	800	0	0	0	0
137	33	2	0	800	0	0	0	800	0	0	0	0
138	34	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
139	1	3	0	800	0	0	0	0	0	0	0	0
140	2	3	0	800	400	0	0	200	0	0	0	0
141	3	3	0	200	0	0	0	100	0	0	0	0
142	4	3	0	800	0	0	0	100	0	0	0	0
143	5	3	0	200	0	0	0	200	0	0	0	0
144	6	3	0	400	0	0	0	100	0	0	0	0
145	7	3	0	800	200	0	0	0	0	0	0	0
146	8	3	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
147	9	3	0	800	0	0	0	0	0	0	0	0
148	10	3	0	400	0	0	0	0	0	0	0	0
149	11	3	0	800	200	0	0	0	0	0	0	0
150	12	3	0	800	0	0	0	400	0	0	0	0
151	13	3	0	800	0	0	0	0	0	0	0	0
152	14	3	0	800	0	0	0	0	0	0	0	0
153	15	3	0	400	400	0	0	200	400	0	0	0
154	16	3	0	400	400	0	400	200	0	0	400	400
155	17	3	0	400	0	0	0	0	800	0	0	0
156	18	3	0	400	0	0	0	400	0	0	0	0
157	19	3	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0
158	20	3	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0
159	21	3	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0
160	22	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
161	23	3	0	800	0	0	0	0	0	0	0	0
162	24	3	0	400	0	0	0	0	0	0	0	0
163	25	3	0	100	200	0	0	0	0	0	0	0
164	26	3	0	400	400	0	200	0	0	0	0	0
165	27	3	0	800	200	0	100	0	0	0	0	0
166	28	3	0	400	0	0	0	0	0	0	0	0
167	29	3	0	800	100	0	400	200	0	0	0	0
168	30	3	0	800	400	0	0	0	800	0	0	0











<b>Tabla 2.- Resultados de Cultivo, PCR, Tinciones de Warthin –Starry (W-S) y Hematoxilina-Eosina (H&amp;E) y descripción de lesiones histopatológicas en animales muestreados en rastros. 1= Positivo, 0=Negativo</b>					
<b>Suero No.</b>	<b>Cultivo</b>	<b>PCR</b>	<b>W-S</b>	<b>H&amp;E</b>	<b>Descripción de Lesiones</b>
1	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	
6	0	0	0	1	N.I. Lp. Leve Multif C/Deg Hidrop Leve Multif
7	0	0	0	0	
8	0	0	0	0	
9	0	0	0	0	
10	0	0	0	0	
11	0	0	0	1	N.I. Lp. Discreta Mf. C/Necr Tubular De Leve A Moderada Mf Glom Prolif Leve
12	0	0	0	0	
13	0	0	0	0	
14	0	0	0	0	
15	0	0	0	0	
16	0	0	0	1	N.I. Lp. Leve Mf. Glomerulitis Proliferativa Leve
17	0	0	0	0	
18	0	0	0	0	
19	0	0	0	0	
20	0	0	0	1	N.I. Lp. Leve Mf. C/Necr Tubular Leve Mf. Glomerulitis Membrano Prolif. Leve
21	0	0	0	0	
22	0	0	0	0	
23	0	0	1	1	N.I. Lp. Leve Mf. C/Necr Tubular Leve Mf Glomerulitis Membranoprolif Leve
24	0	0	0	0	
25	0	0	1	1	N.I. Lp. Moderada Mf. C/Necr Tubular Leve Mf. Glomerulitis Proliferativa Leve
26	0	0	0	0	
27	0	0	0	0	
28	0	0	0	1	N. I. Lp. Moderada Mf.C/Necr Tubular Leve Mf. Glomerulitis Membranosa Leve
29	0	0	0	0	
30	0	0	1	1	N.I. Lp. Leve Mf.C/Necr Tubular Leve Mf. Glomerulitis Proliferativa Leve
31	0	0	0	1	N.I. Lp. Leve Mf.C/Necrtubular Leve Mf. Glomerulitis Membranoprolif. Leve
32	0	0	0	0	
33	0	0	0	0	

Suero No.	Cultivo	PCR	W-S	H&E	Descripción de Lesiones
34	0	0	1	1	N.I.Lp. Moderada Mf. C/Glomerulitis Membranoprolif. Leve
35	0	0	0	0	
36	0	0	0	0	
37	0	0	0	0	
38	0	0	0	0	
39	0	0	0	0	
40	0	0	1	1	N.I. Lp. Leve Mf. C/Glomerulitis Proliferativa Leve Mf.
41	0	0	0	1	N.I.Lp. Insípida Mf. C/Glomerulitis Membranoproliferativa Leve Mf
42	0	0	0	0	
43	0	0	0	0	
44	0	0	0	1	N.I. Lp. De Leve A Moderada Mf. C/Glomerulitis Membranoprolif. Leve Mf.
45	0	0	0	0	
46	0	0	0	0	
47	0	0	0	0	
48	0	0	0	1	N.I.Lp. Modera Mf. C/Degen Y Negr Tub De Leve A Moder Mf. Glomerulitis Membran Leve Mf.
49	0	0	0	0	
50	0	0	0	0	
51	0	0	0	1	N.I. Lp. Leve Mf.C/Negr Tubular Leve Mf. Glomerulitis Proliferativa Leve Mf
52	0	0	0	1	N.I.Lp. Leve Mf. C/Degen Y Negr Tubular Leve Mf. Glomerulitis Membranoproliferativa Leve Mf.
53	0	0	0	1	N.I.Lp. Leve Mf. C/Degen Y Negr Tubular Leve Mf. Glomerulitis Membranoproliferativa Leve Mf.
54	0	0	0	0	
55	0	0	0	0	
56 Sv1	0	0	0	0	
57 Sv2	0	0	1	1	N.I.Lp. Leve Mf. C/Degen Y Negr Tubular Leve Mf. Glomerulitis Membranoproliferativa Leve Mf.
58sv3	0	0	0	0	
59 Sv4	0	0	0	1	N.I.Lp. Leve A Moder Mf. C/Degen Y Negr Tubular Leve A Moderada Mf. Glomerulitis Prolif Leve A Moderada Mf.
60 Sv5	0	0	1	0	
61 Sv6	0	0	0	0	
62 Sv7	0	0	0	0	
63 A	0	0	0	0	
64 B	0	0	0	1	N.I. Lp. Leve A Moderada Mf.C/Glomerulitis Membranoproliferativa Perioarteritis Lp.Moderada Mf.
65 C	0	0	0	0	
66 D	0	0	1	1	Ni. Lp. Leve Mf. C/Degen Y Negr Tubular Leve A Moderada Mf. Glomerulitis Proliferativa Leve Mf.
67 E	0	0	0	0	
68 37	0	0	0	0	
<b>Total Positivos</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>21</b>	

## APÉNDICE 2 CULTIVOS Y SOLUCIONES

### MEDIO DE CULTIVO – EMJH (Ellinghausen- McCullough-Johnson-Harris)

1 litro 1x

#### Ingredientes de medio basal

a) En 800 ml de agua destilada se agrega y disuelve:

- Fosfato disódico anhídrido ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1.0 g
- Fosfato monopotásico anhídrido ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.3 g
- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) 1.0 g

Agregar Soluciones Stock cada una en 100 ml de agua destilada.

- Cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 25 g / 100 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  1.0 ml
- Tiamina HCl .5 g de Tiamina HCl / 100 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  1.0 ml
- Piruvato de sodio 10 g / 100 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  1.0 ml
- Glicerol al 10% 1.0 ml

b) En 150 ml de agua destilada se agrega y se disuelve:

- Suero de albúmina bovino 10 g

c) En 50 ml de agua destilada se agrega y se disuelve:

- Piruvato de sodio 0.2 g
- Sulfato de sodio anhídrido ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 0.1 g
- Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.01 g
- Tween 80 1.250 ml

Soluciones Stock en 100 ml de dH<sub>2</sub>O.

1. Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	1.5 g / 100 ml dH <sub>2</sub> O	0.7 ml
2. Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	1.5 g / 100 ml dH <sub>2</sub> O	0.7 ml
3. Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.4 g / 100 ml dH <sub>2</sub> O	1.0 ml
4. Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0.3 g / 100 ml dH <sub>2</sub> O	0.1 ml
5. Vitamina B <sub>12</sub>	0.1 g / 100 ml dH <sub>2</sub> O	0.2 ml
6. Glicerol 20%	20 ml glicerina / 100 ml dH <sub>2</sub> O	0.5 ml
7. Sulfato manganoso (MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.1 g / 100 ml dH <sub>2</sub> O	1 ml

Procedimiento para el medio basal

1. Los ingredientes del medio basal se agregan en un matraz con 800 ml de dH<sub>2</sub>O,
2. se mantiene en agitación hasta disolver por completo.
3. Ajustar pH a 7.4.
4. Filtrar con filtro de .22 nm.
5. Embasar en un matraz estéril y esterilizar.
6. Almacenar a 30° C por 48 hrs

\*(Myers D, 1985).

Procedimiento para los demás ingredientes

1. En un vaso de precipitado disolver albúmina en 150 ml de dH<sub>2</sub>O.
2. En otro vaso de precipitado disolver los ingredientes del inciso c.
3. Ya disuelto se pasan los ingredientes del paso 2 al vaso donde se disolvió la albúmina dando un volumen de 200 ml.
4. Mezclar y ajustar pH a 7.4.



5. Realizar filtrado con filtros de .65, .45 y .22 mm no estéril y por último Ser filtrado con filtro de .22 mm estéril y se vacía a un matraz estéril.
6. Almacenar a 30° C por 48 hrs.
7. A las 48 hrs. Se observará si las soluciones están limpias y no están precipitadas.
8. Se procede a realizar el vaciado de los 200 ml en el matraz donde se encuentra el medio basal.
9. En tubos de 10 ml se hace el embasado del medio para posteriores cultivos de la bacteria.
10. Los tubos pueden permanecer a temperatura ambiente.

#### SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS

a) Solución amortiguadora de Sorensen:

- Fosfato disodico (Anhidro) ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )      8.33 g
- Fosfato monopotasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )      1.09 g
- Agua destilada      1 litro

El pH debe ser de 7.6

b) Solución salina fisiológica:

- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )      8.5 g
- Agua destilada      1 litro

Se mezcla 40 ml de la solución (a) con 460 ml de (b). El pH final debe ser 7.2.

**APENDICE 3****LISTA DE ABREVIATURAS**

AM	Aglutinación microscópica
ADN	Acido desoxirribonucleico
AL	Solución amortiguadora de lisis
ATL	Solución amortiguadora de lisis de tejido
AVL	Solución amortiguadora
AW1	Solución de lavado 1
AW2	Solución de lavado 2
LPS	Lipopólisacarido
EDTA	Etilenediaminotetraacetico
EMJH	Ellinghausen- McCullough-Johnson-Harris
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SAF	Solución amortiguadora de fosfatos
SSF	Solución salina fisiológica
pH	Potencial de iones de Hidrogeno

**APENDICE 4****LISTA DE CUADROS**

- 1.- Antecedentes históricos
- 2.- Grupos estudiados
- 3.- Serovariedades utilizadas en la prueba de AM
- 4.- Formulas utilizadas
- 5.- Ejemplo de la manipulación de títulos, títulos codificados y transformación a titulo recíproco
- 6.- Reportes serológicos

**LISTA DE FIGURAS**

- 1.- Mapa de la ubicación
- 2.- Área de vientres granja 1
- 3.- Área de engorda granja 2
- 4.- Área de engorda granja 3
- 5.- Vista frontal del área de vientres granja 4
- 6.-Toma de muestra sanguínea
- 7.- Corte transversal de riñón
- 8.- Rallador estéril utilizado para macerar
- 9.- Macerado de la muestra
- 10.- Inoculado de la muestra en el medio de cultivo
- 11.- Seroprevalencia, media geométrica
- 12.- Seroprevalencia total por serovariedad y por granja
- 13.- Seroprevalencia por granja y serovariedad
- 14.- Distribución total de títulos
- 15-18.- Nefritis intersticial en diferentes grados
- 19.- Relación entre serología positiva y lesiones en histopatología