



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

"Aislamiento de Leptospira spp., Determinación de Niveles de Anticuerpos Específicos y Estudio Histopatológico de Riñones en Perros del D. F."

T E S I S

Que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Juan Manuel Palacios Arriaga

Asesores: M.V.Z. Raúl Vázquez Martínez
M.V.Z. M. en C. Reyna Sánchez San Martín
M.V.Z. Lemuel León Lara

México, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

I N D I C E

	Pag.
<u>Resumen</u>	1
<u>Introducción</u>	2
<u>Revisión bibliográfica</u>	
Clasificación	4
Estructura	4
Movimiento, reproducción y metabolismo	6
Taxonomía	7
Mecanismos de patogenicidad	9
Leptospirosis canina	11
Diagnóstico	22
<u>Material y métodos</u>	25
<u>Resultados</u>	30
<u>Discusión</u>	42
<u>Conclusiones</u>	44
<u>Bibliografía</u>	45

RESUMEN

Se detectó una prevalencia de 29.1% de leptospirosis canina en 158 perros callejeros de diferentes zonas del Distrito Federal utilizando la prueba de microaglutinación, aislamiento observación directa de orina, tinción argéntica a partir de riñones e histopatología. Las pruebas de microaglutinación resultaron ser las más sensibles para el diagnóstico de la leptospirosis canina. No existió correlación entre los hallazgos serológicos, bacteriológicos e histopatológicos. Se complementa este trabajo con una revisión de la literatura sobre clasificación, taxonomía, morfología, estructura y patogenia de las leptospiras así como de la leptospirosis canina y su diagnóstico.

INTRODUCCION

La leptospirosis canina es una zoonosis ampliamente distribuida en todo el mundo. Los primeros reportes de ésta enfermedad aparecen en 1917 por Courmont y Durand; en 1918 Yamano publicó un trabajo sobre la infección en perros y gatos por la llamada Spirochaeta icterohaemorrhagiae. En 1932 Klarenbeek y Schuffner diagnostican la misma enfermedad pero causada por Leptospira canicola. En 1935 Wirth y Weitere reportaron la leptospirosis canina como enfermedad de Stuttgart (74).

Posteriormente se han realizado una gran cantidad de trabajos sobre leptospirosis canina, sin embargo en México no fué sino hasta 1959 cuando Varela reportó la presencia de anticuerpos anti- Leptospira sp en perros (87).

La leptospirosis canina se caracteriza por presentar diferentes manifestaciones, tales como; anemia, ictericia, hepatitis, nefritis intersticial y fiebre, sin embargo en la mayoría de los casos la infección es subclínica, pero los perros pueden eliminar el microorganismo a través de la orina en forma intermitente, lo que puede ocasionar la diseminación de la enfermedad a otros animales y al hombre (9, 17, 31, 59, 64).

Otros estudios realizados en México por Varela se inician con la detección de anticuerpos contra Leptospira canicola y Leptospira icterohaemorrhagiae en 59 sueros de canideos, encontrando un 37.3% de sueros positivos (87).

En 1963 Félix R.R. detectó un 28.5% de sueros positivos en 596 muestras a Leptospira canicola y Leptospira icterohaemorrhagiae utilizando la prueba macroscópica en placa (26).

En 1965 González L.G. detectó un 41.7 % de sueros positivos en 326 muestras de perros callejeros contra Leptospira canicola utilizando el método de aglutinación en tubo capilar (34).

En 1966 Arroyo S.V. hizo la primera identificación de Leptospira spp utilizando el método biológico de inoculación en cuyes y además obtuvo el 11% de sueros positivos en 100 muestras a Leptospira canicola, L. icterohaemorrhagiae y L. pomona (5).

En 1979 se realizó un estudio en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. de 50 necropsias en perros callejeros encontrando un 11% de casos positivos a leptospirosis haciendo observaciones del microorganismo en microscopio de campo obscuro a partir de orina, asociándolas a lesiones renales (28).

Como se puede observar los estudios realizados sobre leptospirosis canina en México han sido escasos, la mayoría de éstos hacen énfasis en las pruebas serológicas que no siempre diferencian entre un animal sano y uno enfermo. además de que las pruebas de aglutinación en placa y tubo capilar son poco sensibles y poco específicas (40, 54).

Los diagnósticos basados únicamente en las observaciones del microorganismo en microscopio de campo obscuro a partir de orina ó sangre no resultan confiables debido a la gran cantidad de artefactos con los que se puede confundir el microorganismo (78), las lesiones patológicas por Leptospira sp en riñón se asocian frecuentemente a nefritis intersticial sin embargo ésta lesión resulta ser frecuente por otras causas y no siempre asociada a leptospirosis.

El objetivo de éste trabajo es detectar la prevalencia de leptospirosis canina en 158 animales callejeros de diferentes zonas del Distrito Federal utilizando para ello el análisis bacteriológico e histopatológico a partir de riñones y la detección de anticuerpos específicos en el suero de cada animal. Asimismo se pretende efectuar correlaciones entre los resultados obtenidos con el fin de llegar a un diagnóstico integral.

Dada la importancia del tema en Medicina Veterinaria se hace una revisión bibliográfica sobre la clasificación, taxonomía, morfología, estructura y patogenia de las leptospirosis así como de la leptospirosis canina y su diagnóstico.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Clasificación: El orden Spirochaetales, está formado por un grupo de bacterias flexuosas de aproximadamente 3 a 5 μm de largo, son organismos unicelulares y se dividen por fisión binaria transversa.

Este orden tiene una familia, Spirochetaceae que tiene 5 géneros:

1.- Spirochaeta: Miden de 5-500 μm de largo, 0.2-0.75 μm de ancho, son anaerobios ó anaerobios facultativos. Se les encuentra en aguas marinas, cloacales y contaminadas.

2.- Cristispira: Estos microorganismos miden 30-150 μm de largo y 0.5-3 μm de ancho. En microscopio de contraste de fases se observan cuerpos de inclusión ovoidales y grandes manojos ó racimos de fibrillas axiales; usualmente son comensales de moluscos.

3.- Treponema: Estos microorganismos miden 5-15 μm de largo y 0.09-0.5 μm de ancho, no producen las enzimas oxidasa y catalasa, son anaerobios, comensales de parásitos, algunos son patógenos.

4.- Borrelia: Estos microorganismos miden 10-30 μm de largo y 0.3 μm de ancho, se ignoran sus características metabólicas, las garrapatas y piojos parecen ser las fuentes de transmisión de la enfermedad.

5.- Leptospira

Morfología: El nombre Leptospira proviene del adjetivo leptos que significa delgado y de spira que significa gancho.

Estos microorganismos son helicoidales y flexuosos, miden aproximadamente 6 a 20 μm de largo y 0.1 μm de ancho, los extremos miden 0.3-0.5 μm (12, 45).

Estructura: Está compuesta de tres componentes básicos:

- a) Capa externa
- b) Fibrillas axiales
- c) Cilindro protoplasmático

Capa externa: Es la estructura que se encuentra rodeando a la célula y está compuesta de manojos de fibrillas largas y delgadas con un diámetro aproximado de 250 A° (90). Se presenta

un número diferente de capas en ciertos serotipos de Leptospira por ejemplo; L. pomona presenta 5 capas, L. canicola presenta de 3 a 5 capas y L. patoc-1 que puede presentar hasta 7 capas (91). Esta capa en la mayoría de los casos es trilaminar con algunas capas adicionales como en los ejemplos anteriores (45). la composición de esta capa es de proteínas (46.6%), carbohidratos (27%) y de lípidos (22.5%).

No existe una función específica de la capa externa, podría actuar como barrera primaria de permeabilidad, ésta capa es inmunogénica en caso de L. canicola, además de ser el sitio de acción de anticuerpos y complemento (45), otros autores la relacionan a la virulencia, ya que los serotipos que presentan más de tres capas presentan cierta resistencia a la acción de la lisozima y a la lisis por ácidos grasos libres(67).

Fibrilla axial: Morfológicamente similar al flagelo procariótico consiste de dos componentes básicos; el cilindro y su cubierta, además de un aparato de inserción con botones terminales y discos de inserción parecidos a los de las bacterias Gram negativas (45, 67, 71).

Cada organismo posee dos filamentos axiales independientes originados en los extremos opuestos (71), éstos están cubiertos por una capa interna y otra externa firmemente adherida al cilindro protoplasmático (45); la fibrilla axial se localiza en la parte más externa del cilindro protoplasmático enrollándose alrededor de éste, la composición de esta estructura es de proteínas con trazas de hexosas y pentosas.

Existen como parte de esta estructura una serie de discos de inserción aproximadamente 3 a 5 con un tamaño de 20 a 26 nm, estos se insertan en una depresión del cilindro protoplasmático directamente en la membrana, rotando libremente y permitiendo que la fibrilla axial rote también.

Cilindro protoplasmático: Este consiste de tres estructuras:

- a) Pared celular
- b) Membrana citoplasmática
- c) Contenido protoplasmático

El complejo pared-membrana celular (Membrana parietocitoplasmática) está compuesta de una capa electrodensa y una e-

lectrolúcida de 9 a 12 nm de espesor. La pared está compuesta de 90% de polisacáridos y 2-5 % de peptidoglican , existe un lipopolisacárido con actividad biológica diferente al de la endotoxina de bacterias Gram negativas (27, 45, 91).

Movimiento: La energía requerida para el movimiento de ésta bacteria probablemente se origina en la membrana citoplasmática y se trasmite a las fibrillas axiales por medio de discos de inserción (45). Se han reconocido tres tipos de movimiento, uno de translación sin diferenciación polar , el de una rápida oscilación o rotación sobre su eje mayor y un movimiento de flexión (10, 12). El movimiento está dado por la propulsión de ondas helicoidales que comienzan en un polo de la célula y se dirigen a otro. El extremo de la bacteria tiene forma de gancho semicircular , éste se mueve en forma circular y en dirección opuesta a las ondas helicoidales dando estabilidad y rotación al cuerpo celular (13). Existen cepas mutantes de Leptospira sp que carecen de estos ganchos característicos además de carecer de movimiento (67).

Reproducción: La división de estos microorganismos se lleva a cabo por un mecanismo de fisión binaria transversa en donde existe una constricción celular con modificación membranal y formación de nuevas fibrillas axiales en el centro de la célula madre, las células que originalmente poseen dos fibrillas axiales aparecen con cuatro fibrillas en el proceso de la división, dos en cada polo de la célula y dos en el sitio de la división (45).

Metabolismo: El género Leptospira sp se caracteriza por ser aerobio estricto , los primeros estudios establecieron que la respiración era estimulada por suero de conejo o preparaciones crudas de fosfolípidos, posteriormente se comprobó que era una cadena de ácidos grasos la que estimulaba la actividad respiratoria sirviendo las proteínas séricas como detoxificadoras para remover los efectos inhibitorios causados por los ácidos grasos libres. Estudios mas recientes demostraron que ácidos grasos tales como el palmítico y esteárico servían como fuente de carbono y energía para las leptospiras. Actualmente se han utilizado ácidos grasos saturados e insaturados de 15 a 18

carbonos para cultivar a estos microorganismos, sin embargo los ácidos grasos insaturados y los libres en forma no esterificada a bajas concentraciones inhiben el crecimiento, este efecto se produce por la propia autooxidación de estas sustancias (13).

Las leptospiras oxidan largas cadenas de ácidos grasos por medio de la beta-oxidación quedando dos fragmentos de carbono resultantes que son el CO_2 y el acetato, que posteriormente son utilizados por la vía del ciclo de Krebs (8, 77). Las leptospiras no son capaces de manufacturar los ácidos grasos de cadena larga para la biosíntesis lipídica celular, la desaturación de éstas sustancias se lleva a cabo en presencia de oxígeno molecular. Todas las leptospiras generan peróxidos durante su respiración, la enzima catalasa está presente en todas las cepas patógenas sin embargo está ausente en todas las cepas apatógenas (16). La actividad de esta enzima medida en micro moles de peróxido de hidrógeno por minuto con 1×10^9 células es de 0.0 a 4.6 en cepas apatógenas mientras que en patógenas es de 16 a 4733 excepto en L. icterohaemorrhagiae con 0.0 de actividad (6).

El género Leptospira presenta especies patógenas y apatógenas aunque en cuanto a la morfología son semejantes, presentan ciertas diferencias metabólicas:

Cepas saprofitas: Resistencia al sulfato de cobre a una concentración de 20 ppm, resistencia a la 8-azaguanina en una concentración de $200 \mu\text{g} / \text{ml}$, gran producción de la enzima oxidasa, factor hemolítico en eritrocito de ratón, supervivencia a 5° y 10°C , los mamíferos no son susceptibles a la enfermedad (42).

Cepas patógenas: Supervivencia a 13° y 15°C como temperatura mínima, son sensibles al sulfato de cobre y a la 8-azaguanina, afectan a todos los mamíferos (37, 49).

Taxonomía: En el año de 1916 Inada y col. reconocieron a las leptospiras por su apariencia típica y su patogenicidad para animales de laboratorio. Martin et al en 1917 encontró que una suspensión de leptospiras eran aglutinadas por el suero de pacientes que sufrían la enfermedad de Weil, este descubrimiento fué posteriormente utilizado por Schuffner en 1927 para el

diagnóstico básico de la leptospirosis mediante una prueba de aglutinación (citados por Dikken y Kmety - 19).

En 1972 Kmety distinguió dos sistemas aglutinógenos en las leptospiras, uno basado en antígenos termoestables y considerado como fundamental y el segundo basado en antígenos termolábiles. Los antígenos superficiales de las leptospiras responsables de la aglutinación se denominan TM (carbohidratos) y F4 (lipopolisacáridos) (3, 19).

La clasificación oficial del género Leptospira se determina por análisis de los factores antigénicos, existen antígenos denominados dominantes ó mayores y son los responsables del título homólogo y las altas aglutinaciones cruzadas con serotipos cercanos; existen otro tipo de antígenos conocidos como menores y son responsables de la aglutinación cruzada con las cepas de referencia de otro serogrupo.

La primera agrupación que se hace de las leptospiras con base al tipo de antígenos se conoce como serogrupo, las leptospiras patógenas actualmente se dividen en 19 serogrupos mientras que las apatógenas se dividen en 11 (17, 19). Las leptospiras patógenas se agrupan en la especie interrogans mientras que las apatógenas lo hacen en la especie biflexa (12, 25). Los serogrupos están constituidos cada uno por una serie de serotipos y es el serotipo la taxonomía básica de las leptospiras; cada serotipo está representado por una cepa de referencia. Los serotipos se distinguen por un cierto grado de diferencia antigénica cada nueva cepa debe ser comparada con todas las cepas de referencia dentro del serogrupo al cual pertenecen. Los serotipos se subdividen en variedades, basados en la presencia de antígenos termolábiles (19, 32) Cuadro 1.

Actualmente se desarrollan otras técnicas para la clasificación del género Leptospira como la inmunodifusión de los antígenos de los filamentos axiales y el análisis electroforético en gel de agarosa de porciones de ADN tratado con endonucleasas de restricción (ECoR₁) (56).

CUADRO 1

PRINCIPALES SEROGRUPOS Y SEROTIPOS DE LEPTOSPIRAS PATOGENAS (19).

<u>L. icterohaemorrhagiae</u>	<u>L. javanica</u>	<u>L. celledoni</u>	<u>L. malaya</u>
-icterohaemorrhagiae	-javanica	- celledoni	- malaya
-mankarso	- poi	- whitcombi	- ballum
-copenhageni	- sorex-jalna	<u>L. tarassovi</u>	-castellonis
-naam	- coxi	- tarassovi	- arboreae
-nwogolo	- sofia	- bakeri	
-dakota	<u>L. pomona</u>	- atlantae	
-sarmin	- pomona	- guidae	
-birkini	- kennewicki	- kisuba	
-smithi	- monjakov	- bravo	
-ndambari	- mozdok	- atchafalaya	
-ndahambukje	- tropica	- chagres	
-budapest	- proechimys	- rama	
-weaveri	<u>L. hebdomadis</u>	- gatuni	
<u>L. cynopteri</u>	- hebdomadis	<u>L. shermani</u>	
-cynopteri	- nona	- shermani	
-canalzonae	- kambale	<u>L. semeranga</u>	
-butembo	- kremastos	- semeranga	
<u>L. australis</u>	- worsfoldi	- patoc	
-australis	- jules	- sao-paulo	
-lora	- maru	<u>L. andamana</u>	
-muenchen	- borincana	- andamana	
-jalna	- kabura		
-bratislava	- mini		
-fugis	- szwajizak		
-bangkok	- georgia		
-peruviana	- parameles		
-pina	- hardjo		
-nicaragua	- recreo		
<u>L. grippotyphosa</u>	<u>L. medanensis</u>		
-grippotyphosa	- wolffi		
<u>L. canicola</u>	- trinidad		
-canicola	- sejroe		
-bafani	- balcanica		
-kamiyuga	- polonica		
-jonsis	- saxkoebing		
-summeri	- nero		
-broomi	- haemolytica		
-bindjei	- ricardi		
-schueffneri	<u>L. bataviae</u>		
-benjamin	- bataviae		
<u>L. autumnalis</u>	- paijan		
-autumnalis	- djatzi		
-rachmati	- kobbe		
-fort-bragg	- balboa		
-sumatrana	- claytoni		
-bangkinang	- brasiliensis		
-erinacei-auriti			
-mooris			
-sentot			
-lousiana			
-orleans			
-djasman			
-gurungi			

Mecanismos de patogenicidad

Producción de toxinas

a) Endotoxinas: Como se mencionó anteriormente la estructura de la pared de estas bacterias posee un lipopolisacárido, la presencia de ésta sustancia sugiere cierta actividad endotóxica. Existen reportes donde se intenta demostrar esta actividad mediante inoculaciones intradérmicas e intravenosas con lisados de Leptospira sp, sin embargo no se comprobó la actividad endotóxica, aún utilizando la prueba del lisado del amebocito considerada como una de las pruebas mas sensibles para detectar endotoxina (4, 27, 44, 45, 91).

b) Hemolisinas: La presencia de anemia e ictericia sugiere la presencia de hemolisinas demostrándose éstas en Leptospira canicola, L. grippotyphosa, L. autumnalis, L. australis, L. pomona y L. hebdomadis. Estas toxinas son antigénicas y estimulan la presencia de aglutininas específicas de protección, probablemente todas posean estructura semejante ya que existen reacciones de protección cruzada con hemolisinas heterólogas (41).

Algunos autores relacionan esta eritrolisis al contacto directo de la bacteria con eritrocitos, sin embargo se reporta que existen pseudoespiroquetas formadas por elongaciones de la membrana de los eritrocitos que pueden confundirse fácilmente con leptospiras adheridas a los glóbulos rojos por lo que este mecanismo no está claro (15, 78).

c) Toxina citopática: La gran cantidad de cambios patológicos de los endotelios vasculares y epitelios tubulares sugieren la presencia de factores tóxicos. En 1967 Miller y Wilson reportan la presencia de hemorragias en tejido intersticial con ruptura de capilares, en 1974 Marshall reporta la degeneración y necrosis de las células del epitelio tubular así como degeneración de microvellosidades en túbulos contorneados proximales; en 1976 el mismo autor menciona la presencia de edema intersticial y daño al endotelio de vasos sanguíneos renales; en 1979 DeBrito et al reporta lesiones de tipo hemorrágico en hígado, riñón, pulmón y músculo esquelético de cuyes y humanos; en 1980 Higgins y Cheville encontraron alteraciones hepáticas y daño al epitelio de túbulos contorneados de riñón.

todas estas alteraciones estan relacionadas a la presencia de toxina citopática (15, 18, 44, 47, 58, 60).

En 1979 De Brito, Bohm y Yasuda proponen un mecanismo de acción para ésta toxina mencionando que daña a las células endoteliales de capilares causando dilatación del retículo endoplásmico rugoso y ensanchamiento mitocondrial , el endotelio dañado se hincha afectándose la permeabilidad, posteriormente existen aberturas intercelulares y paso de eritrocitos , estos cambios explican la lesión más prominente en la leptospirosis que es la gran cantidad de hemorragias. El daño vascular provoca una disminución en el suministro de oxígeno produciendo necrosis en segmentos de los capilares (18).

Las lesiones del epitelio tubular son sugeridas por Cheville et al mencionando que existe migración de las leptospiras a través de la pared tubular (15), Marshall reporta que existe una degeneración y necrosis de las células epiteliales de los túbulos renales con pérdida de microvellosidades , sin embargo estas lesiones se asocian a la producción de toxina ya que no parece ser daño mecánico (58).

En 1973 Knight et al detecta este factor tóxico en el plasma de animales afectados demostrando el efecto citopático en monocapas de células fibroblásticas tipo L en 24 hs., este factor tóxico tiene afinidad por el mucopolisacárido de los fibroblastos existiendo una pérdida de actividad de este factor cuando hay formación de coágulos ya que éste se adsorbe al ácido siálico , componente de tipo mucopolisacárido de la molécula de fibrinógeno. La destrucción de la capa de fibroblastos se realiza en 9 días utilizando leptospiras completas , en 6 días cuando se utiliza el sobrenadante de cultivos del microorganismo y en 24 hs. utilizando el plasma conteniendo el factor , esta citotoxicidad aparece a las 12 hs. posinfección declinando su actividad a las 48 hs. (53).

Otros estudios han demostrado que la inoculación de extractos de hígado y riñón de animales afectados a cuyes por vía intraperitoneal reproduce las manifestaciones clinico-patológicas (4).

Reacciones de hipersensibilidad

La gran cantidad de cambios patológicos observados principalmente en riñón , muestra que existen reacciones de hipersensibilidad humoral causando una serie de cambios relacionados a un proceso inmunológico ; Morrison y Wright en 1976 demuestran la presencia de anticuerpos de la clase IgG en túbulo renales proponiendo que las lesiones de nefritis intersticial son causadas por reacciones de hipersensibilidad con depósitos de complejos inmunes y fijación de complemento con el consecuente daño celular debido a la acción de enzimas provenientes de polimorfonucleares (63). Asimismo, la gran cantidad de células plasmáticas , linfocitos y macrófagos en hígado y riñón sugieren una fuerte respuesta inflamatoria con procesos inmunológicos responsables de hepatitis y nefritis (9). Existen algunas hipótesis con respecto a este fenómeno , como son la sensibilización local durante la infección aguda y la reacción recurrente debida a una dosis provocativa de antígeno , así como la localización y persistencia del microorganismo con estimulación local de anticuerpos y reacción celular, algunos autores sugieren la exposición de antígenos ocultos debido al daño celular con reacciones de autoinmunidad (11, 63).

Aunque la leptospirosis es un padecimiento de tipo sistémico en su fase aguda , los hallazgos mas frecuentes de lesiones se asocian al tejido renal , la persistencia del microorganismo en éste órgano se asocia a la producción de ureasa utilizando a la urea como fuente de nitrógeno (13, 47).

LEPTOSPIROSIS CANINA

Etiología: La leptospirosis canina es una enfermedad infecto-contagiosa causada principalmente por Leptospira canicola y L. icterohaemorrhagiae sin embargo dada la diversidad de serotipos existentes la enfermedad en el perro puede ser causada por cualquier serotipo de leptospira patógena.

Los estudios realizados en diferentes partes del mundo señalan los siguientes serotipos detectados en sueros de perro.

Alemania

(1974) L. copenhageni, L. autumnalis, L. grippotyphosa, L. hebdomadis, L. sejroe y L. saxkoebing (30).

Brasil.	(1975)	<u>L. canicola</u> , <u>L. grippotyphosa</u> , <u>L. bataviae</u> , <u>L. butembo</u> y <u>L. pyrogenes</u> (38).
Formosa	(1975)	<u>L. canicola</u> y <u>L. icterohaemorrhagiae</u> (55)
Australia	(1976)	<u>L. pomona</u> , <u>L. hardjo</u> , <u>L. tarassovi</u> , <u>L. australis</u> , <u>L. grippotyphosa</u> y <u>L. pyrogenes</u> (38).
Austria	(1976)	<u>L. grippotyphosa</u> , <u>L. serjoe</u> , <u>L. icterohaemorrhagiae</u> , <u>L. sorex-jalna</u> , <u>L. bratislava</u> y <u>L. canicola</u> (48).
Estados Unidos	(1979)	<u>L. grippotyphosa</u> (9).
Rhodesia.	(1979)	<u>L. canicola</u> (7).

Asímismo una encuesta serológica internacional realizada en el año de 1976 nos revela los siguientes serotipos identificados en 24 países utilizando un total de 11 522 sueros (73).

<u>L. canicola</u>	<u>L. pomona</u>	<u>L. hyos</u>
<u>L. icterohaemorrhagiae</u>	<u>L. bataviae</u>	<u>L. saxkoebing</u>
<u>L. hebdomadis</u>	<u>L. javanica</u>	<u>L. bratislava</u>
<u>L. grippotyphosa</u>	<u>L. sejroe</u>	<u>L. ballum</u>

Como se puede observar , la distribución de ésta enfermedad en perros es mundial encontrándose diseminada en mayor o menor grado en todos los países del mundo, sin embargo es más frecuente en países de clima caluroso ya que estas condiciones climáticas favorecen el desarrollo de la enfermedad. El siguiente cuadro nos muestra la incidencia de la leptospirosis canina en diversas partes del mundo según Ryu en el año de 1976 (73).

Sudamérica	11.1%
Asia	10.1%
Europa	3.4%
Norte América	2.4%

Los estudios realizados para conocer la incidencia y prevalencia de la enfermedad se basan principalmente en reacciones de tipo serológico, siendo muy importante hacer notar que la leptospirosis canina es de tipo subclínico principalmente. La presentación de la enfermedad se asocia a la época de lluvias , teniendo mayor incidencia en los meses de julio a octubre, también se le asocia a la presencia de animales silvestres que actúan

como portadores de la enfermedad (46, 73, 85, 89).

Las características biológicas del género Leptospira determina que una gran cantidad de especies actúen como portadores asintomáticos ya que el microorganismo no puede sobrevivir mucho tiempo fuera de un huésped debido a condiciones de pH, temperatura y nutrientes esenciales. Dentro de un huésped las leptospiras poseen afinidad por riñón, lo que provoca que el microorganismo sea eliminado por la orina pudiendo permanecer fuera del huésped hasta 15 días (85).

Otra forma de diseminación se relaciona a los hábitos sexuales del perro al lamer los órganos genitales de la hembra en la época de celo (46), provocando que la enfermedad sea más común en machos (33, 69). La diseminación de la enfermedad por la ingestión de animales afectados o por algunos insectos como las garrapatas no parece ser tan importante en la epidemiología de la leptospirosis canina.

Se debe tomar en cuenta que la leptospirosis canina es una zoonosis y que tiene gran distribución principalmente en zonas urbanas donde se localizan grandes poblaciones de perros sin control sanitario (31).

Patogenia: La vía de entrada de las leptospiras al organismo puede ser :

- a) Oral.
- b) Por mucosas.
- c) Por escoriaciones en la piel.
- d) Por vía respiratoria (aerosoles).
- e) Transplacentaria (no común en perros).

No se ha comprobado que las leptospiras penetren la piel intacta (33, 84, 88).

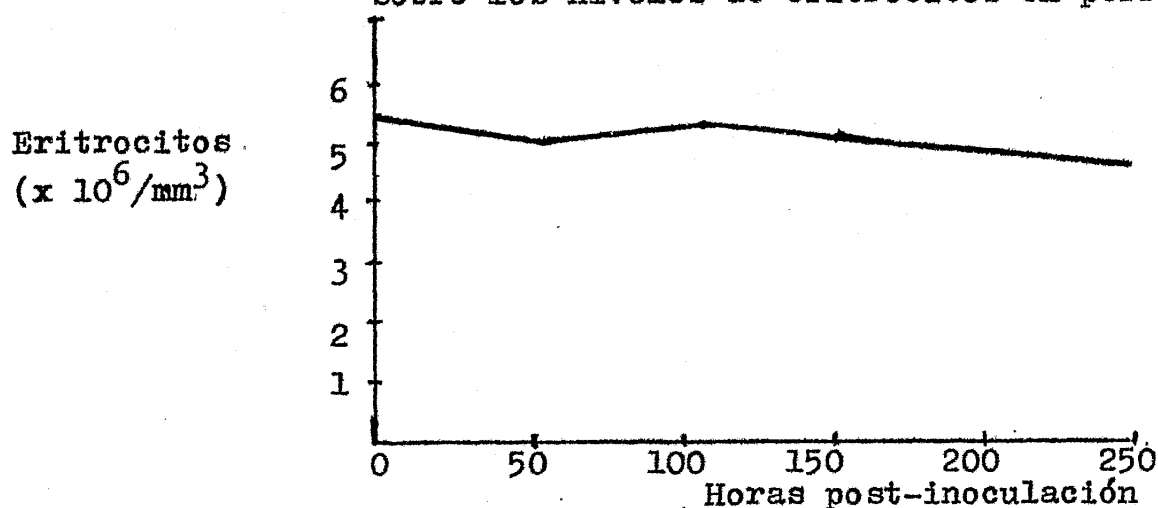
La enfermedad se ha dividido por algunos autores en síndromes agudos, subagudos, urémicos (Enfermedad de Stuttgart) y subclínicos o inaparentes; asimismo se relaciona a L. icterohaemorrhagiae con los cuadros agudos y a L. canicola con cuadros crónicos, sin embargo no existen diferencias substanciales en cuanto a la virulencia de ambos serotipos pudiéndose lograr experimentalmente signos agudos con cualquier cepa patógena (14, 18, 33, 38, 61, 62, 88).

Leptospirosis aguda

Como se mencionó anteriormente no es un tipo de enfermedad común en perros, sin embargo se reporta éste síndrome en algunos casos.

La primera fase de la enfermedad comienza cuando las leptospiras alcanzan el torrente sanguíneo y/o vías linfáticas, en este momento comienza la reproducción acelerada del microorganismo, esta fase conocida como leptospiremia tiene una duración de 4 a 7 días con los consecuentes cambios (89): Los glóbulos rojos disminuyen paulatinamente como se muestra en la

Gráfica 1: Efecto de la inoculación de Leptospira interrogans sobre los niveles de eritrocitos en perro (51).



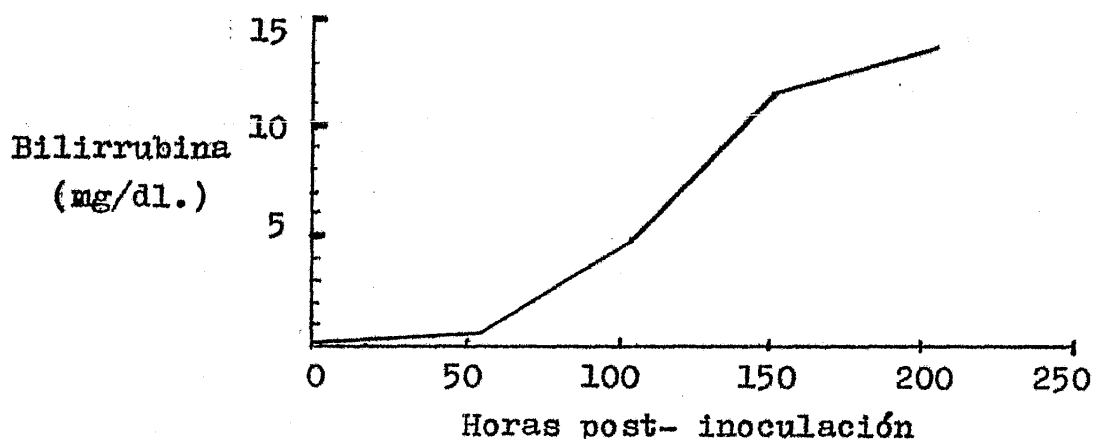
Esta ligera disminución de la cuenta eritrocítica se relaciona a la presencia de factores hemolíticos citados anteriormente (43).

Los primeros signos son: postración y elevación de la temperatura de 39.7 a 40.5°C (64), posterior a esto se presentan signos de deshidratación e ictericia de acuerdo al grado de liberación de los pigmentos hemáticos con índices ictericos que fluctúan entre 48 y 110 unidades y aumentos en la bilirrubina total en sangre como se muestra en la gráfica 2 (22, 44, 62, 84)

El hematocrito se encuentra entre 32-38%, la sedimentación entre 12-35 mm/hora (9), en algunos casos se detecta anemia de tipo normocrómico normocítico. La leptospirosis en sus fases iniciales provoca neutropenia y posteriormente una neutrofilia que comienza el día 3-4 posinfección y alcanza su máximo el día 6-8 (9, 61).

Gráfica 2.

Efecto de la inoculación de Leptospira interrogans sobre los niveles sanguíneos de bilirrubina (51).



En esta etapa el mecanismo de patogenicidad que entra en juego es la producción de toxina , que en condiciones experimentales aparece en la sangre a las 12 hs. posinfección y alcanza sus máximos niveles a las 24 hs. declinando a las 48 hs. (53). Como se mencionó anteriormente , éste factor causa daño a los endotelios vasculares provocando hemorragias que varían en número e intensidad, dependiendo del grado de infección al que este sujeto el animal. El factor tóxico al provocar daño a los endotelios vasculares hace que las células subendoteliales se muestren hinchadas conteniendo vacuolas autofágicas , posteriormente se produce necrosis en diferentes segmentos de los capilares formando áreas en donde los eritrocitos escapan produciendo hemorragias intersticiales (18, 44, 60). Esta lesión es la más prominente en casos agudos presentando el animal una gran cantidad de petequias y equimosis distribuidas en la piel (dermis y tejido subcutaneo), mucosas nasales, faringe, traquea, bronquios, lengua, peritoneo gástrico, intestino, cápsula del hígado, vejiga, pancreas, riñones y miocardio; existe tambien daño muscular con miositis y elevación de las enzimas musculares como la creatinina y la fosfoquinasa sérica (22, 62). Los cambios hematológicos muestran aglutinación de plaquetas con formación de trombos, existe una trombocitopenia menor a 20 000 células/mm³; experimentalmente se ha demostrado que extractos de L. canicola y L. icterohaemorrhagiae causan agregación de plaquetas in vitro (35 51), estos cambios se asocian a la presencia de hemorragias en

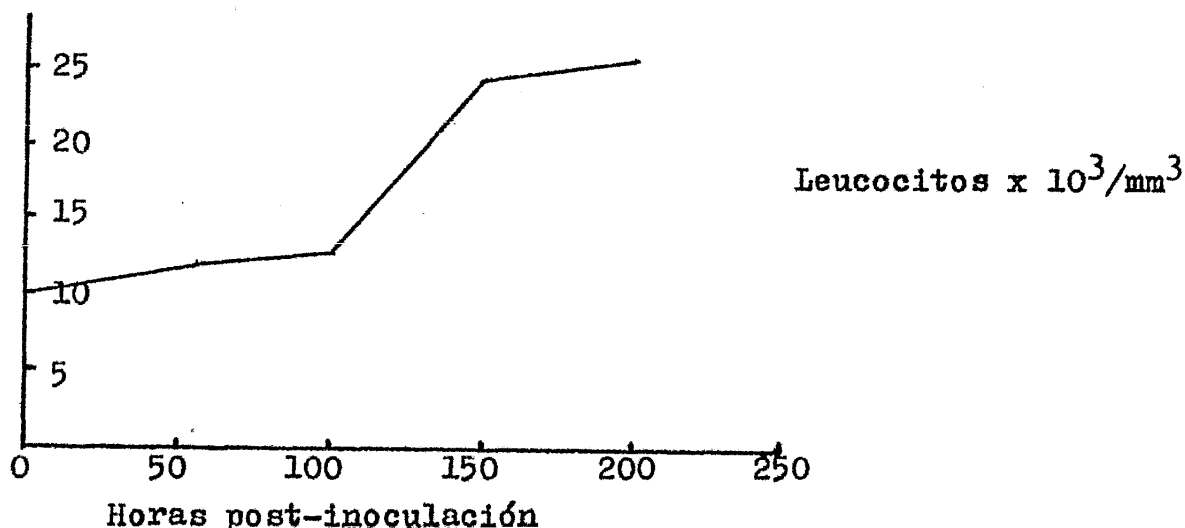
tejidos alveolares (18). En ocasiones se observa coagulación intravascular diseminada, sin embargo ésta se asocia a estadíos posteriores de la enfermedad con daño hepático (9, 22, 44).

En la fase aguda se llega a observar daño al sistema nervioso encontrándose hemorragias en meninges, neuritis del plexo braquial y los nervios vago y ciático produciendo manifestaciones neurológicas (53, 62).

Esta primera fase de leptospiremia trae como consecuencia los siguientes signos en el perro; inflamación y dolor muscular colapso cardiovascular, taquicardia, arritmia, hiperventilación epistaxis, melena, tos, tonsilitis, rinitis, conjuntivitis, bronconeumonía, vómito, constipación y pérdida de peso (38, 51, 70, 84). Estos signos pertenecen a una septicemia generalizada.

Al momento de la entrada del microorganismo, un animal no inmune responderá tardíamente a la infección, los signos más agudos se presentan en éstos animales reproduciéndose las leptospiras más rápido que la formación de anticuerpos (46). La enfermedad se caracteriza por una leucocitosis, sin embargo en algunos casos se reporta una leucopenia temprana (70). Las cuentas leucocitarias en perros inoculados experimentalmente se muestran en la gráfica número 3.

Grafica 3. Efecto de la inoculación de *Leptospira interrogans* sobre los niveles de leucocitos en sangre (51).



Otros autores reportan una leucocitosis al tercer y cuarto día con las cuentas más altas el día 6-8 con 38 000 células/mm³ (62). La presencia de leucocitos inicia la defensa del organismo con la fagocitosis y la subsecuente formación de anticuerpos, el primer tipo de gamma globulina detectada es del tipo IgM, apareciendo posteriormente las IgG (85), esto trae como consecuencia una hipergammaglobulinemia (9). Los títulos positivos para L. icterohaemorrhagiae se detectan al día 4-7 posinfección mientras que para L. canicola se detectan el día 6-11 (85). Se demuestran también aglutininas séricas que inhiben la actividad hemolítica de las leptospiras (41).

Los anticuerpos específicos llegan a alcanzar sus niveles máximos a las 3-4 semanas posinfección (88), con la progresiva formación de anticuerpos la septicemia tiende a disminuir ya que la severidad de la infección es indirectamente proporcional a la presencia de anticuerpos específicos (39).

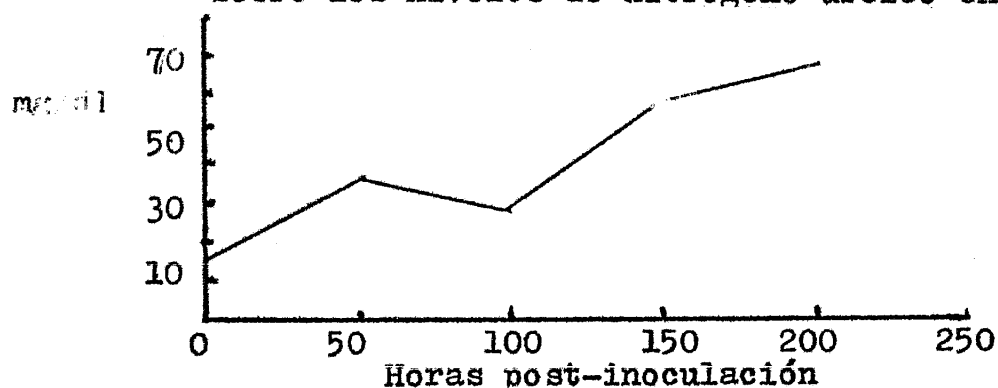
En la leptospirosis canina así como en la equina se presenta un síndrome de enfermedad ocular en esta etapa aguda. Existe una infección epiescleral con petequias en la conjuntiva hemorragias subconjuntivales y uveítis anterior (22, 51, 62, 88) también se detectan aglutininas en el humor acuoso.

Los signos de la enfermedad aguda se presentan principalmente en la fase de leptospiremia, sin embargo la presencia de anticuerpos específicos en la sangre provoca la disminución de las leptospiras y el paso del microorganismo a diferentes órganos principalmente riñón, este paso se realiza por vía hematogena causando el mismo tipo de daño a los endotelios vasculares (15). Las leptospiras pasan al tejido intersticial persistiendo en éste sitio, experimentalmente se ha demostrado que el día 4 posinfección se localizan en el tejido intersticial, el día 10 las leptospiras migran por las uniones intercelulares de la lámina tubular localizándose el día 16 dentro del lumen de los túbulos contorneados proximales (57). La presencia de toxinas citopáticas provoca un daño a las microvellosidades de la lámina túbular (15, 60). Las células se encuentran inflamadas con las mitocondrias hinchadas y cristolisis, en algunos casos las células obliteran el lumen, las leptospiras se localizan también

en las membranas basales (15), existe degeneración y necrosis de las microvellosidades del epitelio tubular, los trastornos celulares traen como consecuencia una disfunción renal con proteinuria, hematuria, albuminuria y urobilinógeno en la orina pudiendo causar la muerte del animal.

La persistencia de las leptospiras en los túbulos renales provocan posteriormente la fase de leptospiruria, ésta se registra a las 72 hs. posinfección y posteriormente entre la segunda y cuarta semana (51), la excreción de leptospiras por orina depende de la cantidad de microorganismos que alcancen los túbulos renales, se reportan excreciones continuas de 4 y 7 días (88). La falla renal ocasiona una elevación en el nitrógeno ureico en sangre como se muestra en la gráfica 4.

Gráfica 4 Efecto de la inoculación de *Leptospira interrogans* sobre los niveles de nitrógeno ureico en sangre (51).



Esta uremia provoca en el animal ulceración lingual, gastritis, enteritis hemorrágica, endocarditis y necrosis subpleural de los músculos intercostales (33, 64).

Los signos mencionados anteriormente corresponden a las fases agudas, subagudas y urémicas de la enfermedad, sin embargo la leptospirosis aparece principalmente como una enfermedad de tipo crónico, ésta fase está dada por el paso del microorganismo a diferentes órganos y su persistencia en éstos por tiempo indefinido.

La presencia de anticuerpos y mecanismos de defensa inespecíficos del suero son la causa de que la leptospiremia disminuya pasando el microorganismo a riñón e hígado principalmente.

Leptospirosis crónica

Esta condición en el perro da lugar a leptospiruria intermitente, presencia de lesiones en hígado y riñón con insuficiencia renal.

La leptospirosis renal comprende dos fases ; una tubular en donde se manifiesta el estado de leptospiruria y otra intersticial que posteriormente dá lugar a nefritis intersticial de tipo focal y difuso, esta condición se describe como un proceso en el cual existe fibrosis del tejido intersticial , usualmente acompañada por una marcada infiltración de células mononucleares y pérdida de funcionalidad en las nefronas. Las lesiones tubulares en este caso son más severas que las lesiones glomerulares (88).

Las leptospiras como se mencionó anteriormente pasan de la vía hematógica a la fase intersticial; en este paso provocan una infiltración de linfocitos, células plasmáticas e histiocitos (9, 43), asimismo las toxinas producidas por el microorganismo incrementan la permeabilidad de capilares peritubulares principalmente en la unión corticomedular provocando edema. Posteriormente se observa necrosis de éstos capilares provocando la salida de eritrocitos y ocasionando hemorragias en el intersticio (18). Conforme ésta condición progresa se observa la presencia de fibroblastos modificados que contienen actina, iniciándose un proceso de fibrosis intersticial. En la fase tubular se observa al principio una ligera inflamación tubular provocando en las células dilatación del retículo endoplásmico (15, 18); asimismo se observan vacuolas citoplasmáticas , gránulos de pigmento y nucleos picnóticos (88), posteriormente la inflamación de las células tubulares bloquea el lumen tubular , las leptospiras se pueden localizar en las membranas basales (15) y asociadas a las microvellosidades , la degeneración se lleva a cabo principalmente en los túbulos contorneados proximales cerca de los glomérulos (15, 18, 57, 62, 64, 88).

Los cambios glomerulares son: hiperemia, dilatación de capilares , expansión e hiper celularidad de areas mesangiales , adherencia y engrosamiento de las capas parietales (15), asimismo se localizan pequeñas cantidades de proteína en espacios

vasculares (88); posteriormente puede llegar a encontrarse fibrosis de la cápsula de Bowman (9).

La gran afluencia de linfocitos y células plasmáticas se observa como una serie de pequeños focos de color gris que se localizan en el área subcapsular, cortical y medular (58, 64), la fibrosis del riñón se observa en áreas en donde existe una gran destrucción de túbulos, incrementándose ahí el número de capilares, las leptospiras se pueden localizar en diversas áreas, tales como: uniones endoteliales de las venas renales, tubulos contorneados, espacios peritubulares, membranas basales tubulares e intersticio (18, 47, 52, 57, 58, 60).

El daño ocasionado a las estructuras renales está relacionado a la acción indirecta de las leptospiras por sus toxinas, sin embargo también se propone que las lesiones observadas sean debidas a reacciones de autoinmunidad (9). Existe una gran cantidad de células plasmáticas productoras de anticuerpos en el intersticio, así como linfocitos recién activados que sugieren una reacción de tipo celular (15). Estudios inmunopatológicos han detectado grandes cantidades de antígeno en túbulos proximales y en menor grado en los distales y en la lámina tubular. Se han observado también grandes cantidades de antígeno granular en focos en el intersticio así como dentro de los macrófagos, sugiriendo que la nefritis en cierto grado sea causada por reacciones antígeno-anticuerpo (65, 83, 86).

Las lesiones macroscópicas en riñones afectados son: palidez, en ocasiones se observan más pequeños, firmes y duros al corte. La cápsula se encuentra engrosada y adherente, principalmente en la corteza se observan una serie de focos de color gris (50, 88).

Las leptospiras también se pueden localizar en las fases crónicas en hígado, en donde se asocian a las siguientes lesiones microscópicas; destrucción de hepatocitos, desorientación de cordones hepáticos, hiperplasia de las células de Kupfer, necrosis focal de las células hepáticas, fibrosis de las zonas periportales, congestión sinusoidal, éstasis biliar periportal intracanicular. Los hepatocitos se encuentran con pérdida de citoplasma, basofilia, citoplasma granular, núcleo pálido y vé-

sicular, hinchazón nebulosa, vacuolización (9, 44). Existe también infiltración de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y en menor grado neutrófilos y eosinófilos (88).

Macroscopicamente el hígado se encuentra grande, friable y en ocasiones congestionado (9). En el estudio seroquímico se reporta alteración de las enzimas como alanina aminotransferasa fosfatasa alcalina, aspartato amino transferasa y transaminasa glutámico oxalacética (9, 44).

Esta disfunción provoca trombocitopenia e hipoprotrombinemia afectándose la coagulación (35, 38). La persistencia del microorganismo en hígado no se presenta frecuentemente, sin embargo se reporta una hepatitis activada tipo crónico en perros así como cirrosis e insuficiencia hepática asociada a L. ictero haemorrhagiae, L. bataviae, L. butembo y L. canicola (9).

En ocasiones los nódulos linfáticos se encuentran afectados mostrando edema, hemorragias, incremento de las células reticulares y eritrocitos en la región medular (79).

La fase crónica de la leptospirosis se debe a que el microorganismo permanece viable en el riñón dentro de los túbulos renales y en el intersticio formando microcolonias. La leptospiuria se inicia en la semana 2-4 posinfección y continúa indefinidamente; se reportan anticuerpos específicos detectados en orina a títulos de 1:200 en el día 18-44 posinfección, las leptospiras son excretadas por orina cuando existe un pH de 6.6 a 8, orinas con un pH menor son negativas a leptospiuria (85).

Las leptospiras persisten por tiempo indefinido en tejido renal, se ha propuesto que éstas permanecen en los túbulos contorneados fuera del sistema inmune, de los plasmacitos renales y los quimioterapéuticos, se propone también que la leptospirosis crónica se relaciona al gradiente osmótico-corticomedular, ya que la hiperosmolaridad inhibe la migración de leucocitos, además de que el flujo relativamente pequeño de sangre a la médula renal limita la cantidad de quimioterapéutico que podría eliminar la infección (20, 24).

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la leptospirosis se basa en 5 puntos principales:

- 1) Observación directa del microorganismo en campo oscuro: Es el método más práctico para detectar la presencia del microorganismo en fluidos y órganos, sin embargo tiene que realizarse en fases tempranas de la enfermedad 4 hs. después de tomada la muestra. Las muestras elegidas son; orina, sangre, líquido cefalorraquídeo o bien triturados de órganos en solución salina fisiológica (32, 40, 78).
- 2) Aislamiento a partir de diferentes órganos y tejidos: Este representa el único método de diagnóstico definitivo sin embargo resulta laborioso y tardado. Los medios de cultivo utilizados pueden ser el Stuart, Fletcher, Korthof, Cox y Vervoort con suero de conejo como fuente de ácidos grasos y el EMJH y BSA-T-80 con preparaciones de ácidos grasos (32, 40).
- 3) Pruebas de tipo serológico:
 - a) Aglutinación en tubo capilar utilizando antígeno muerto (81).
 - b) Aglutinación macroscópica en placa. Se mezclan los antígenos en grupos para evitar realizar la prueba con cada uno de los antígenos (32).
 - c) Prueba de aglutinación microscópica o aglutinación-lisis. Prueba desarrollada en 1927 por Schuffner y Mochtar extensamente utilizada en los laboratorios de diagnóstico, utiliza antígeno vivo expuesto a diferentes diluciones del suero. Las diluciones se observan microscópicamente y sueros con una alta concentración de anticuerpos darán como resultado la lisis de las leptospiras, conforme disminuye la cantidad de anticuerpos se observan masas de color blanco brillante con contornos redondeados en donde se observan leptospiras. con movimiento lento, los sueros negativos no aglutinan a las leptospiras observándose éstas aisladas y uniformemente distribuidas en todo el campo (32, 40, 54, 82).
 - d) Aglutinación microscópica rápida (RMAT). Esta prueba desarrollada en 1970 por Ryu consiste en tomar una muestra de

sangre del perro sospechoso e impregnándola en una tira de papel filtro, ésta se envía al laboratorio en donde 1 cm de la tira se coloca en 1 ml de solución buffer de fosfatos a 22°C, el tubo se agita y una gota del contenido se coloca en una placa junto a una gota de antígeno se mezcla y se deja reposar 5 minutos observándose al microscopio para detectar aglutinación (69, 72, 73).

- e) Fijación de complemento. Utiliza antígeno soluble sin embargo no es muy utilizada en el diagnóstico de la leptospirosis ya que provoca reacciones inespecíficas (82).
- f) Inmunoabsorbencia enzimática (ELISA). Esta prueba desarrollada recientemente para el diagnóstico de la leptospirosis se compara en sensibilidad a la prueba de radioinmunoensayo, detectando tanto IgG como IgM (1, 2).
- g) Inmunofluorescencia directa e indirecta. Se utiliza principalmente para detectar leptospiras en órganos, sangre y orina (29, 80).
- h) Inmunidad celular. La prueba se conoce como leptospirina y está formada por extractos de Leptospira canicola, L. icterohaemorrhagiae, L. grippityphosa y L. tarassovi, se aplica en forma intradérmica, las reacciones positivas se detectan como áreas de eritema de más de 9 mm a las 8, 10 y 24 hs. (75, 76)

4) Tinciones: El uso de tinciones argénticas utilizadas en histopatología como la de Levaditi, Dobell, Jahmel y Young son útiles en la demostración del microorganismo en diferentes tejidos como riñón e hígado sin embargo éstas pueden confundirse con precipitados del colorante, además de que las leptospiras en ocasiones pierden su forma y no retienen el colorante, la detección de leptospiras en éstos tejidos no indican el serotipo al cual pertenecen (21, 32).

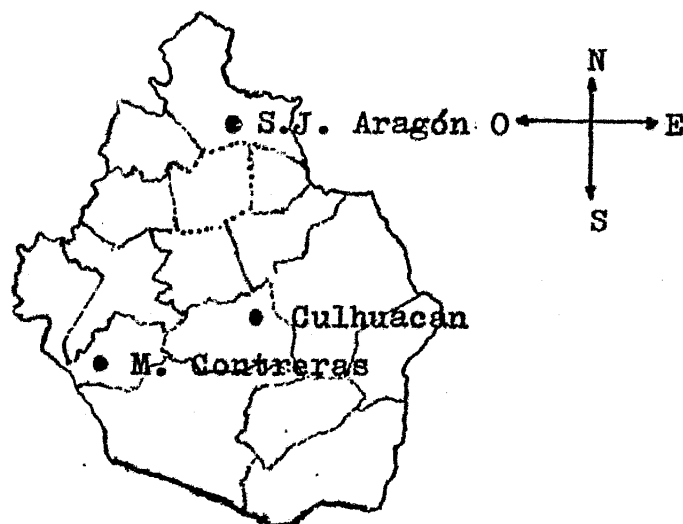
El uso de tinciones en frotis directos a partir de muestras clínicas no es muy utilizado en el diagnóstico ya que las características del microorganismo lo hacen difícil de detectar en el microscopio óptico común, algunas de éstas tinciones son la de violeta de metilo fenicada, la tinción negativa con solu-

ción de rojo congo y la de Ryu con fucsina básica (32).

5) Pruebas biológicas: El animal de elección primaria para el diagnóstico de la leptospirosis es el hamster de 21 días de edad, el cuy de 4 semanas y el pollito de 1 día en quienes produce signos de septicemia (5, 32).

MATERIAL Y METODOS

El siguiente estudio fué realizado en tres centros de control canino localizados en el Distrito Federal, dichos centros se localizan en el área de Culhuacán, San Juan de Aragón y Contreras, su ubicación se muestra en el siguiente plano:



Los perros obtenidos en estos centros son capturados en la vía pública, mantenidos durante 72 hs. y posteriormente sacrificados en caso de que no sean reclamados por sus dueños; el método de sacrificio es a base de inhalación de monóxido de carbono o descarga eléctrica.

El número total de perros trabajados fué de 158, distribuidos de la siguiente manera:

Centro de Culhuacan	33
Centro de Contreras	50
Centro de San Juan de Aragón.	75

Los perros fueron elegidos sin importar raza, sexo y edad; los muestreos fueron realizados entre el período comprendido de junio a octubre de 1980 y de junio a septiembre de 1981.

Una vez sacrificados los animales se procedió a la necropsia . se tomaron asépticamente ambos riñones en bolsas de polietileno , sangre y orina por punción directa de vena cava y vejiga respectivamente; éstas dos últimas se colectaron con jeringas estériles.

Las muestras fueron enviadas a los laboratorios de Bacteriología y patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., así como al Departamento de serología de la Dirección General de Sanidad Animal de la S.A.R.H., las muestras obtenidas se distribuyeron para los siguientes estudios:

- ORINA Observación directa en microscopio de campo obscuro.
- RIÑÓN (1)- Siembra en medios de cultivo.
(2)- Histopatología
- SUERO Detección de anticuerpos específicos por medio de la prueba de microaglutinación

Orina: La muestra fué colocada asepticamente en tubos de 13 x 100 y centrifugada a 3000 x/g durante 10 minutos, posteriormente utilizando una asa microbiológica se realizó un frotis húmedo del sobrenadante y se observó en el microscopio de campo obscuro a un aumento de 400 X (32, 40, 78).

Exámen bacteriológico: El órgano fué limpiado de la grasa perirrenal, se sumergió en una solución de cloruro de benzalconio (1:1000) durante 10 minutos, se secó con una gasa estéril y se tomó la muestra utilizando una pipeta Pasteur estéril que se introdujo en ambos polos del órgano y en la parte media, colectándose así tejido renal de diferentes planos, cada muestra fué sembrada en tres ml. de medio de cultivo Stuart[®] y Ellinghausen; se utilizaron 3 tubos conteniendo tres ml de cada uno de los medios por riñón (36, 40, 66).

Los cultivos fueron incubados a 30°C durante 12 semanas, se realizaron frotis de los tubos cada semana y se observaron en microscopio de campo obscuro.

Una vez detectado el crecimiento, se procedió a realizar resiembras a partir del cultivo original, con el fin de obtener cultivos puros, cuando se observaron tubos contaminados conteniendo leptospiras se procedió a realizar diluciones decimales del cultivo original y filtración con filtros Millipore[®] de 0.45 μ m con el fin de descontaminar los cultivos (66).

Los cultivos puros de Leptospira sp fueron utilizados para los siguientes estudios:

a) Determinación de la especie: Esta se realizó sembrando las cepas en medio de cultivo conteniendo Sulfato de Cobre a una concentración de 20 ppm, asimismo las cepas se cultivaron a 5° y 15°C. Se hizo la inoculación de las cepas a cuyes de 3 y 4 semanas (37, 49).

b) Determinación del serotipo: Para este estudio se prepararon antisueros de las cepas aisladas, éstas se cultivaron en 25 ml de medio de cultivo Ellinghausen; una vez detectada la pureza de los mismos se procedió a centrifugarlos a 5000 x/g durante 25 minutos, el sedimento se resuspendió en 13 ml de una solución conteniendo 0.5% de formalina, 12% de cloruro de sodio y 20% de glicerina, esta suspensión fué inoculada por vía endovenosa a conejos de 3.5 a 4 kg a dosis de 1, 2, 4 y 6 ml a intervalos de 7 días; 5 días después de la última inoculación se procedió a sangrar a los animales para obtener todo el suero posible. El suero fué centrifugado y esterilizado pasándolo por filtros Millipore^{&&} de 0.65 y 0.45 μ m y mantenido en congelación a -20°C (32).

La determinación del serotipo se realizó exponiendo el antisuero problema a 14 antígenos conocidos (cepas vivas) realizando la prueba de microaglutinación, el serotipo de la cepa fué identificado en donde el antisuero mostró su título más alto (19).

Suero: Las muestras de sangre se refrigeraron durante 2 a 4 hs. con el fin de obtener la mayor cantidad de suero posible, éste fué tomado asépticamente con una pipeta Pasteur estéril y depositado en tubos estériles de 13 x 100 mm, los sueros fueron centrifugados a 3000 x/g durante 10 minutos con el fin de sedimentar eritrocitos y evitar la hemólisis. Los sueros que mostraban hemólisis después de centrifugados o que se encontraban contaminados fueron desechados, los sueros se almacenaron a -20°C.

& Difco, Detroit Michigan.

&& Millipore, Bedford Massachusetts.

Se realizó una dilución del suero 1:25 con un volumen final de 3 a 5 ml. dependiendo de la cantidad de suero, posteriormente se realizaron dos diluciones dobles consecutivas de 1:50 y 1:100 en volúmenes de 0.2 ml, para ésto se utilizaron placas de microtitulación. Cada una de estas dos diluciones fué expuesta a 0.2 ml de antígeno (14 antígenos por suero) e incubados a 25°C durante 3 hs. asimismo se utilizó un control negativo con antígeno y solución salina.

Los antígenos constituidos por leptospiras viables fueron proporcionados por el Centro Panamericano de Zoonosis en Argentina y se enlistan a continuación:

GENERO	ESPECIE	SEROTIPO	CEPA/REFERENCIA
1.- <u>Leptospira</u>	<u>interrogans</u>	<u>hardjo</u>	hardjoprajtino &
2.- "	"	<u>hebdomadis</u>	hebdomadis &
3.- "	"	<u>sejroe</u>	M84 &
4.- "	"	<u>wolffi</u>	3705 &
5.- "	"	<u>icterohaemorrhagiae</u>	RGA
6.- "	"	<u>canicola</u>	Hond Utrecht
7.- "	"	<u>pomona</u>	pomona
8.- "	"	<u>tarassovi</u>	perépelicin
9.- "	"	<u>grippotyphosa</u>	Moska V
10.- "	"	<u>pyrogenes</u>	salinem
11.- "	"	<u>australis</u>	ballico
12.- "	"	<u>bataviae</u>	Van Tienen
13.- "	"	<u>autumnalis</u>	Akiyami A
14.- "	"	<u>ballum</u>	castelloni

&

Serogrupo hebdomadis

Cada uno de estos antígenos fué cultivado en medio Ellinghausen durante 7 días a 30°C, los cultivos que se utilizaron para la prueba fueron estandarizados a 200 leptospiras por campo con un objetivo de 40 x, ésto se logró diluyendo el cultivo con una solución buffer de fosfatos pH-7.

La lectura de la prueba se indentificó de la siguiente manera:

<u>N° de la reacción</u>	<u>% de leptospiras aglutinadas</u>
1	25
2	50
3	75
4	90 - 100

Los sueros que aglutinaban 50% o más de las leptospiras en la dilución 1:100 se consideraron positivos y de estos sueros se hicieron diluciones dobles hasta encontrar su título final (32, 40, 55).

Histopatología

Organos provenientes de perros serologicamente positivos fueron trabajados para histopatología, todos estos riñones se colocaron previamente en una solución de formol al 10%.

Se realizaron cortes por inclusión en parafina de cada órgano y se tiñieron con la técnica de hematoxilina- Eosina con el fin de detectar los cambios histopatológicos y con la tinción argéntica de Jahmel para observar directamente a las leptopiras en el tejido (21, 32).

RESULTADOS

Observación directa a partir de orina: De los 158 casos trabajados únicamente se observaron 87 muestras de orina, de éstas se identificó al microorganismo en 4 casos, la identificación se realizó en base a la morfología y a los movimientos típicos de las leptospiras, en 7 casos más se observaron estructuras parecidas, sin embargo aunque mostraban morfología similar no poseían movimiento propio.

El total de observaciones se muestran en la siguiente tabla:

	N ^o	%
<u>Leptospira sp</u>	4	4.5
Estructuras parecidas	7	8.0
TOTAL	11	12.6

Aislamiento: De 158 casos sembrados se logró el aislamiento en 6 casos correspondiendo al 3.79% del total.

El crecimiento del microorganismo se detectó por observación directa de los medios de cultivo en microscopio de campo oscuro a los siguientes días:

Cepa Aislada (+)	Detección posinoculación (días)
AC1	16
AC2	16
AC3	8
AA4	64
AA5	16
AA6	8

(+) Identificación = AC: Culhuacan
ACo: Contreras
AA: Aragón

Las cepas fueron purificadas mediante filtración y diluciones, las 6 cepas fueron identificadas como Leptospira interrogans, las pruebas efectuadas para la detección de la especie se muestran en la siguiente tabla:

CEPA	CuSO ₄	Desarrollo a 5°C	15°C	Inoculación/cuye
AC1	-	-	+	np (*)
AC2	-	-	+	+
AC3	-	-	+	np
AA4	-	-	+	np
AA5	-	-	+	np
AA6	-	-	+	np

(*) np = no probada

La cepa número 3 (AC3) fué inoculada a 3 cuyes de 4 semanas por vía intraperitoneal a dosis de 1.5 ml de cultivo de 7 días de incubación , a los 7 días posinoculación 2 cuyes murieron mostrando las siguientes lesiones; congestión de bazo e hígado , petequias y hemorragias en forma generalizada. El otro cuyé fué sacrificado mostrando ictericia generalizada, las leptospiras fueron detectadas a partir de sangre mediante observación directa en microscopio de campo obscuro.

Debido a que todas las cepas aisladas fueron identificadas mediante las pruebas citadas en la tabla anterior no se justificó realizar pruebas biológicas con todas las cepas sino con una elegida al azar.

El serotipo de cada una de las cepas fué determinado mediante la elaboración de antisueros, los títulos fueron mayores o iguales a 1:12800 con la cepa homóloga.

Los antisueros de las cepas aisladas reaccionaron con los siguientes antígenos con la prueba de microaglutinación; Leptospira canicola, L. autumnalis, L. pyrogenes, L. ballum, L. icterohaemorrhagiae y L. sejroe. La identificación del serotipo de las cepas aisladas correspondió en los 5 casos a L. canicola (100%), los títulos de los antisueros con cada antígeno se muestran en la siguiente tabla:

CEPA	ict	sej	can	aut	pyr	ball
AC1	-	1:400	1:6400	1:800	-	1:800
AC2	1:1600	-	1:12800	-	1:1600	1:200
AC3	1:3200	-	1:25600	1:400	1:1600	1:400
AA4	-	1:200	1:12800	1:3200	-	1:400
AA5	1:1600	-	1:25600	1:200	1:800	1:800
AA6	1:1600	-	1:12800	1:200	1:800	1:400

ict. = L. icterohaemorrhagiae; sej. = L. sejroe; can. = L. canicola; aut. = L. autumnalis; pyr. = L. pyrogenes; ball = L. ballum.

Serología: Los resultados obtenidos de las pruebas de microaglutinación efectuadas en 158 sueros dieron 46 casos positivos, ésto tomando en cuenta los sueros que mostraron el 50% de las células aglutinadas en la dilución 1:100 ó más, lo que representa un 29.1% del total de sueros trabajados, la siguiente tabla nos muestra el patrón de aglutinación y los títulos finales de cada suero a 14 antígenos conocidos.

SUERO	TITULO FINAL (1:x)													
	har	heb	sej	wol	pom	tar	can	pyr	gri	ict	aus	bat	aut	bal
SC22			200											
SC47						100	200							
SC49							800		100					200
SC58						100	400	1600	100				800	1600
SC68							6400						800	800
SC75							1600						200	1600
SC79							100							
SC88						100	12800	1600		100				
SCo9	100													
SCo10				100					200					100
SCo14	400													
SCo16						400	6400	200						
SCo18	400													
SCo19						6400	25600	400		1600			400	
SCo22						1600	200							
SCo23			100											
SCo24	800													
SCo25						200	6400	400						
SCo26						200	6400							
SCo28						1600	400							
SCo35				100		400	6400	100		12800				
SCo39						400	200							
SCo36			100			400	100			100				
SCo41						400	3200							
SCo42	200			100		400	1600		400					
SCo50						1600	6400			3200				
SA1						100	25600	100						
SA4							200						100	
SA6				100										
SA10							6400			3200				
SA13	100													
SA15						100	3200	100						
SA16				100		100	100	100		400			100	
SA18						100	100							
SA21							1600							
SA22						100								
SA29	100		100				800	100		100			200	
SA33							1600	1600	100		100			
SA35	800													
SA50			100											
SA56	100													
SA57							12800		100					100
SA60	100						400	100	100	100				
SA64										100				
SA67	100					100	25600	100	200					100
SA73						100	200			100				

har = L. hardio; heb = L. hebdomadis; sej = L. seiroe; wol = L. wolffi; pom = L. pomona;
 tar = L. tarassovi; can = L. canicola; pyr = L. pyrogenes; gri = L. grippotyphosa;
 ict = L. icterohaemorrhagiae; aus = L. australis; bat = L. bataviae; aut = L. autumnalis; bal = L. ballum.

La gran cantidad de anticuerpos que se encontraban en algunos sueros dió como consecuencia que éstos reaccionaran a más de un antígeno con títulos positivos, la siguiente tabla nos muestra el número de sueros que reaccionaron a más de un antígeno:

Nº DE SUEROS	Nº DE ANTIGENOS	%
14	1	30.4
11	2	23.9
9	3	19.6
4	4	8.7
4	5	8.7
4	6	8.7

El título más alto se detectó en 3 sueros (6.5%) correspondiendo a 1:25600 con Leptospira canicola.

La siguiente tabla muestra el número de sueros que presentaron reacciones menores a 1:100 o sea, hasta un título de 1:50 éstas reacciones se consideran negativas y se agrupan como reacciones miscelaneas dadas por reacciones inespecíficas.

Nº DE SUEROS	SEROTIPO	%
7	hardjo	7.07
2	hebdomadis	2.02
8	sejroe	8.08
0	wolffi	0
2	pomona	2.02
14	tarassovi	14.1
21	canicola	21.2
10	pyrogenes	10.1
4	grippotyphosa	4.04
13	icterohaemorrhagiae	13.1
2	australis	2.02
1	bataviae	1.0
4	autumnalis	4.0
11	ballum	11.1

La siguiente tabla muestra la prevalencia de anticuerpos en contra de 14 serotipos en las tres áreas muestreadas (títulos mayores ó iguales a 1:100 unicamente).

AREA	har	heb	sej	wol	pom	tar	can	pyr	gri	ict	aus	bat	aut	bal
CULHUACAN														
N ^o de sue-														
ros (+)	-	-	1	-	-	3	7	2	2	1	-	-	3	4
(%)	-	-	3.0	-	-	9	21.2	6	6	3	-	-	9	12
CONTRERAS														
N ^o de sue-														
ros (+)	5	-	2	-	3	11	12	5	-	6	-	-	1	2
(%)	10	-	4	-	6	22	24	10	-	12	-	-	2	4
SN. J. ARAGON														
N ^o de sueros														
(#)	6	-	2	-	2	9	13	7	4	5	1	-	3	3
(%)	8	-	2.6	-	2.6	12	17	9	5	6	1.3	-	4	4

A continuación se muestra el número de sueros que resultaron positivos a diferentes diluciones con cada uno de los antígenos, esta tabla está hecha en base al total de sueros trabajados.

SEROTIPO	DILUCION (1:x)									
	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	
hardjo	6	1	2	2	-	-	-	-	-	-
hebdomadis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sejroe	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-
wolffi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pomona	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tarassovi	12	2	7	-	1	-	2	-	-	-
canicola	3	4	2	2	5	2	7	2	3	
pyrogenes	7	2	2	-	3	-	-	-	-	-
grippotyphosa	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-
ict...	5	1	2	-	1	2	-	1	-	-
australis	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bataviae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
autumnalis	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-
bellum	5	1	-	1	2	-	-	-	-	-
TOTAL	55	15	16	7	12	4	9	3	3	
(%)	48.2	13.1	14	6.1	10.5	3.5	7.8	2.6	2.6	

Las siguientes tres tablas muestran las características de cada animal muestreado, así como el serotipo al cual resulto positivo con el título más alto en cada centro de control canino:

CULHUACAN

ANIMAL N°	SEXO	EDAD	SEROTIPO	TITULO
SC22	M	3 años	sejroe	1:200
SC47	M	3 años	canicola	1:200
SC49	H	4 meses	canicola	1:800
SC58	H	1 año	pyrogenes	1:1600.
SC68	M	1 año	canicola	1:6400
SC75	M	-	autumnalis	1:6400
SC79	H	-	canicola	1:100
SC88	M	-	canicola	1:12800

CONTRERAS

SCo9	M	5 meses	hardjo	1:700
SCo10	M	1.5 años	icterohaemorrhagiae	1:200
SCo14	H	2 años	hardjo	1:400
SCo16	M	2 años	canicola	1:6400
SCo18	M	5 años	hardjo	1:400
SCo19	H	1 año	canicola	1:25600
SCo22	M	3 años	canicola	1:1600
SCo23	H	1 año	sejroe	1:100
SCo24	H	4 años	hardjo	1:800
SCo25	H	2 años	canicola	1:6400
SCo26	M	5 años	canicola	1:6400
SCo28	M	2 años	tarassovi	1:1600
SCo35	H	2 años	canicola	1:6400
SCo36	H	1 año	tarassovi	1:400
SCo39	M	2 años	tarassovi	1:400
SCo41	M	4 años	canicola	1:3200
SCo42	M	2 años	canicola	1:1600
SCo50	M	5 años	canicola	1:6400

SAN JUAN DE ARAGON

SA1	M	8 meses	canicola	1:25600
SA4	H	8 meses	canicola	1:200
SA6	M	2 años	pomona	1:100
SA10	H	1 año	canicola	1:6400
SA13	M	1 año	hardjo	1:100
SA15	M	1 año	canicola	1:3200
SA16	M	2 años	icterohaemorrhagiae	1:400
SA18	M	3 años	tarassovi	1:100
SA21	M	2 años	canicola	1:1600
SA22	M	4 años	tarassovi	1:100
SA29	H	1 año	canicola	1:800
SA33	H	2.5 años	canicola	1:1600
SA35	M	-	hardjo	1:800
SA50	M	3 años	sejroe	1:100
SA56	H	1 año	hardjo	1:100
SA57	M	2 años	canicola	1:12800
SA60	H	4 años	canicola	1:400
SA64	H	1 año	icterohaemorrhagiae	1:100
SA67	M	5 años	canicola	1:25600
SA73	H	2 años	canicola	1:200

La siguiente tabla muestra el número de animales positivos en los diferentes centros de control canino.

CENTRO DE CONTROL	N ^o DE ANIMALES MUESTREADOS	(+)	(%)
CULHUACAN	33	8	24.2
CONTRERAS	50	18	36.0
SAN JUAN DE ARAGON	75	20	26.6
T O T A L	158	46	29.1

La siguiente tabla muestra el número de perros positivos serologicamente por sexo:

	N ^o TOTAL	(+)	(%)
MACHO	80	27	33.7
HEMBRA	78	19	24.3

La edad aproximada promedio de los animales fué de 2.09 años, detectada por observación de la dentadura.

A continuación se muestra la distribución de los casos positivos en los meses en que fueron realizados los muestreos:

MES/AÑO	N ^o DE ANIMALES MUESTREADOS	(+)	(%)
Jul/80	5	1	20.0
Ago/80	13	2	15.3
Oct/80	15	5	33.3
Jun/81	15	3	20.0
Jul/81	35	15	42.8
Sep/81	75	20	26.6

Histopatología

Se realizaron cortes histopatológicos de los 46 casos positivos serológicamente ya que únicamente los resultados de la prueba de microaglutinación detecta que el animal entró en contacto con leptospiras.

De los 46 cortes histopatológicos observados se detectaron lesiones en 38 (82.6%), 5 casos no mostraron cambios y 3 mostraron cambios posmortem por mala conservación.

Las siguiente tabla nos muestra las principales lesiones observadas en la zona cortical, túbulos renales, glomérulos zona corticomedular y medular en orden de frecuencia.

ZONA CORTICAL	Nº de casos	(%) de 38 casos.
Infiltración celular principalmente de células plasmáticas.	19	50.0
Infiltración celular principalmente de linfocitos.	17	44.7
Congestión.	19	50.0
Hemorragias.	15	39.4
Fibrosis.	13	34.2
Edema.	14	36.8
Pigmento	2	5.2
TUBULOS RENALES		
Degeneración parenquimatosa en células tubulares.	9	23.6
Obliteración de la luz tubular.	8	21.0
Materia hialina dentro de la luz tubular.	2	5.2
Infiltración celular peritubular.	7	18.4
GLOMERULOS		
Engrosamiento de la cápsula de Bowman.	15	39.4
Degeneración glomerular.	8	21.0
Infiltración celular periglomerular.	6	15.7
Hiper celularidad glomerular.	4	10.5
Congestión glomerular.	2	5.2
Edema en espacio de Bowman.	5	13.1
ZONA CORTICOMEDULAR		
Infiltración celular.	1	2.6
Hemorragias.	1	2.6
ZONA MEDULAR		
Fibroplasia intersticial.	7	18.4
Edema.	4	10.5
Inflamación.	3	7.8
Focos hemorrágicos.	3	7.8
Proliferación de tejido intersticial.	1	2.6

De los 38 cortes histopatológicos observados 23 (60.52%) mostraron nefritis intersticial de tipo focal y difuso correspondiendo a 13 y 10 casos respectivamente.

La siguiente tabla nos muestra el número de casos que presentaron nefritis intersticial en los diferentes centros de control canino:

CENTRO DE CONTROL	Nº DE CORTES	NEFRITIS	(%)
CULHUACAN	8	6	75.0
CONTRERAS	18	7	38.8
SAN JUAN/ARAGON	20	10	50.0
TOTAL	46	23	50.0

El grado de nefritis se determinó de acuerdo al número de lesiones involucradas en el proceso inflamatorio, la siguiente tabla nos muestra las diferentes lesiones encontradas en 23 riñones con diagnóstico de nefritis intersticial y el grado de nefritis correspondiente.

(G) LESION Nº	CULHUACAN								CONTRERAS								SAN JUAN DE ARAGON							
	22	47	49	58	75	78	16	18	19	39	41	42	50	10	15	16	18	21	29	33	35	50	56	
1.-							*	*	*	*	*	*	*	*	*							*		
2.-	*	*	*			*		*					*		*				*				*	
3.-				*		*		*				*		*		*			*			*	*	
4.-		*	*	*	*	*	*			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
5.-		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
6.-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
7.-		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
8.-				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
9.-				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
10.-	*				*													*				*		
11.-	*	*				*		*		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
12.-		*				*		*		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
13.-				*		*		*		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
14.-					*		*		*		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
15.-	*	*																						
16.-	*																							
17.-									*			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
18.-									*			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
19.-																			*			*	*	
20.-																					*	*	*	
GRADO DE NEFRITIS.	6	8	3	8	5	6	7	6	8	2	6	5	7	6	8	4	3	5	5	7	5	9	6	

(G): Zona cortical: 1.- congestión; 2.- hemorragias; 3.- edema; 4.- fibrosis; 5.- Infiltración de células plasmáticas; 6.- Infiltración de linfocitos. Túbulo renales: 7.- Degeneración parenquimatosa; 8.- Obliteración de la luz tubular; 9.- Infiltración celular peritubular. Glomerulos: 10.- Infiltración celular; 11.- Engrosamiento de la cápsula de Bowman; 12.- Degeneración glomerular; 13.- Edema en espacio de Bowman; 14.- Infiltración celular periglomerular. Zona medular: 15.- Material hialino en la luz de asas; 16.- Focos hemorrágicos; 17.- Fibroplasia; 18.- Edema; 19.- Proliferación de tejido intersticial; 20.- Infiltración celular.

Tinción argéntica.

Las leptospiras fueron detectadas directamente en el tejido renal mediante la tinción argéntica de Jahmel en 3 casos correspondiendo al 6.52% de los 46 cortes histopatológicos.

La siguiente tabla nos muestra el resultado de todos los exámenes realizados tomando en cuenta los 46 casos serológicamente positivos.

IDENTIFICACION	TITULO SEROLOGICO	GRADO DE NEFRITIS	AI SLAM IENTO	ORINA	TIN CI ON ARGENTICA
SC22	1: 200	6	-	-	-
SC47	1: 200	8	-	+	-
SC49	1: 800	3	+	-	-
SC58	1: 1600	8	-	-	+
SC68	1: 6400	-	+	-	-
SC75	1: 6400	5	-	+	+
SC79	1: 100	-	-	-	-
SC88	1: 12800	6	+	-	+
SCo9	1: 100	-	-	-	-
SCo10	1: 200	-	-	-	-
SCo14	1: 400	-	-	-	-
SCo16	1: 6400	7	-	+	-
SCo18	1: 400	6	-	-	-
SCo19	1: 25600	8	-	-	-
SCo22	1: 1600	-	-	-	-
SCo23	1: 100	-	-	-	-
SCo24	1: 800	-	-	-	-
SCo25	1: 6400	-	-	-	-
SCo26	1: 6400	-	-	-	-
SCo28	1: 1600	-	-	-	-
SCo35	1: 6400	-	-	-	-
SCo36	1: 400	-	-	-	-
SCo39	1: 400	2	-	-	-
SCo41	1: 3200	6	-	-	-
SCo42	1: 1600	5	-	-	-
SCo50	1: 6400	7	-	+	-
SA1	1: 25600	-	+	-	-
SA4	1: 200	-	-	-	-
SA6	1: 100	-	-	-	-
SA10	1: 6400	6	-	-	-
SA13	1: 100	-	-	-	-
SA15	1: 3200	8	+	-	-
SA16	1: 400	4	-	-	-
SA18	1: 100	3	-	-	-
SA21	1: 1600	5	-	-	-
SA22	1: 100	-	-	-	-
SA29	1: 800	5	+	-	-
SA33	1: 1600	7	-	-	-
SA35	1: 800	5	-	-	-
SA50	1: 100	9	-	-	-
SA56	1: 100	6	-	-	-
SA57	1: 12800	-	-	-	-
SA60	1: 400	-	-	-	-
SA64	1: 100	-	-	-	-
SA67	1: 25600	-	-	-	-
SA73	1: 200	-	-	-	-

A continuación se muestra el porcentaje de casos positivos a los diferentes tipos de análisis realizados tomando como base el total de casos trabajados (158).

TOTAL DE CASOS	158	100%
PRUEBAS SEROLOGICAS (+)	46	29.11
NEFRITIS (+)	23	14.55
AISLAMIENTO	6	3.79
TINCION ARGENTICA (+)	3	1.89
ORINA (+)	4	2.53

De los 158 casos trabajados se detectó la presencia de Leptospira sp en 11 casos (6.96%) mediante aislamiento y observación directa a partir de orina y tejido renal.

Los 6 casos detectados por aislamiento presentaron títulos que van de 1:800 a 1:25600, 4 casos presentaron nefritis del grado 3 al 8, sin embargo dos casos no presentaron lesiones significativas, todos los casos fueron negativos a la observación directa de orina y un caso resultó positivo a la tinción argéntica.

Los 4 casos que resultaron positivos al frotis directo de orina presentaron títulos de 1:100 a 1:6400, todos presentaron nefritis del grado 5 a 8, y un caso resultó positivo a la tinción argéntica.

Los 3 casos positivos a la tinción argéntica de Jahmel presentaron títulos de 1:1600 a 1:12800 y nefritis del grado 5 al 8.

De los 5 exámenes realizados a cada caso, únicamente 2 animales (1.26%) coinciden con 4 exámenes positivos mostrándose en la siguiente tabla:

IDENTIFICACION	AISLAMIENTO	SEROLOGIA	HISTOPATOLOGIA	ORINA	JAHMEL
SC75	-	1:6400	5	+	+
SC88	+	1:12800	6	-	+

La siguiente tabla nos muestra la relación existente entre serología e histopatología (N° de animales positivos en cada caso).

GRADO/LESION	T I T U L O S E R O L O G I C O (1:x)									TOTAL (%)
	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	
0	7	3	3	1	2	0	4 ^{&}	1	2 ^{&}	23 (50)
2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1 (2.1)
3	1	0	0	1 ^{&}	0	0	0	0	0	2 (4.3)
4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1 (2.1)
5	0	0	0	2 ^{&}	2	0	1 ^{#+}	0	0	5 (10.8)
6	1	1	1	0	0	1	1	1 ^{&+}	0	6 (13.0)
7	0	0	0	0	1	0	2 ^{##}	0	0	3 (6.5)
8	0	1 [#]	0	0	1 ⁺	1 ^{&}	0	0	1	4 (8.6)
9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (2.1)
TOTAL	10	5	6	4	6	2	8	2	3	46/100

Aislamiento &

Orina #

Tinción argéntica +

Como se puede observar el 50% de los casos serologicamente positivos no presentaron nefritis.

DISCUSION

El diagnóstico de la leptospirosis canina basado únicamente en la demostración y aislamiento del microorganismo a partir de riñones y orina resultó ser poco sensible y práctico dada la dificultad del aislamiento del microorganismo (observación directa de orina en campo obscuro 2.53%; tinción argéntica 1.89%; aislamiento 3.79%) confirmando las observaciones de otros autores (68).

Por otra parte las pruebas serológicas mostraron una frecuencia de 29.1% de leptospirosis canina lo que resulta semejante a lo reportado por otros autores (Varela M. 37.3%; Félix R. 28.5%; Arroyo S. 11.0%).

La prueba que resultó ser más sensible fué la serología que comparada con el aislamiento y demostración resulta más sencilla y específica. Es importante hacer notar que todos los animales que resultaron positivos por aislamiento y demostración mostraron títulos serológicos positivos que van de 1:200 hasta 1:25600 lo que indica que la serología detecta a todos los animales con leptospirosis.

En cuanto a las lesiones encontradas, se detectó que el 50.0% de los animales con títulos serológicos positivos de 1:100 a 1:25600 resultaron negativos a nefritis, inclusive 2 casos de animales con aislamiento sin lesiones nos indican que la histopatología no podría ser utilizada como única prueba para el diagnóstico de leptospirosis canina por lo que dependerá básicamente del estadio de la enfermedad, ya que probablemente el microorganismo se encontraba en mayor cantidad en sangre (7 a 21 días) y comenzaba su paso hacia tejido renal, ya que los títulos serológicos de ambos animales fueron altos (1:6400 y 1:25600) lo que sugiere una infección reciente.

En 11 casos de leptospirosis demostrable ésta coincidió con títulos serológicos positivos y diferentes grados de nefritis, cabe hacer notar que el animal con nefritis intersticial de mayor grado resultó con el título serológico positivo mas bajo (1:100) lo que podría indicar una infección crónica. El aislamiento en todos los casos correspondió a L. canicola siendo el principal serotipo encontrado en perros por otros autores

95, 73, 74, 87); sin embargo el método resulta tardado, las contaminaciones en los medios de cultivo resultan frecuentes y el mantenimiento de las cepas requieren de mucha atención. El caso SC75 resultó positivo a la demostración del microorganismo en orina y riñón, así como en títulos serológicos, sin embargo no se logró el aislamiento indicando que éste método aunque es el más exacto para el diagnóstico puede representar algunos problemas de técnica en el laboratorio.

La demostración a partir de orina resulta una técnica útil y rápida con el inconveniente de la gran cantidad de artefactos encontrados por lo que fué necesario centrifugarla, las leptospiras detectadas en orina coincidieron todas con el hallazgo de lesiones y con títulos serológicos altos, aunque por otro lado no se logró ningún aislamiento en estos casos.

El centro de control con mayor frecuencia de leptospirosis detectada por el método serológico fué el de la delegación M. Contreras. En las tres áreas muestreadas el serotipo predominante fué L. canicola siguiendo en frecuencia L. tarassovi y L. icterohaemorrhagiae coincidiendo con reportes previos en otros países (55, 89).

Hubo un promedio de edad en animales reactivos positivos a las pruebas serológicas de 2.09 años con un rango de 4 meses y 5 años de edad, con relación al aislamiento hubo un promedio de edad de 9.6 meses con un rango entre 4 y 12 meses lo que corrobora que ésta enfermedad se presenta principalmente en animales jóvenes, la frecuencia de animales serologicamente positivos fué superior (4.9%) en machos debido probablemente a los hábitos sexuales de éstos (33, 68, 69).

CONCLUSIONES

- 1.- La prevalencia de leptospirosis canina en 158 animales callejeros del D.F. fué de 29.1%.

- 2.- El método más sensible para diagnosticar la leptospirosis canina es el método serológico mediante la prueba de microaglutinación.

- 3.- Las pruebas de aislamiento , demostración e histopatología se consideran como complementarias.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adler B.; Faine S. and Gordon L.M.: The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) as a serological test for detecting antibodies against Leptospira interrogans serovar hardjo in sheep. Aust. Vet. J. 57:414-417 (1981)
- 2.- Adler B.; Murphy A.M.; Locarnini S.A. and Faine S.: Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid Phase Enzyme -Linked Immunosorbent Assay. J. Clin. Microb. 11:452-457 (1980)
- 3.- Adler B. and Faine S.: Serological cross-reactions of leptospiral lipopolysaccharide (F4) antigen. Zbl. Bakt. Hyg I. Abt. Orig. 244:291-301 (1979)
- 4.- Arean V.M.; Sarasin G. and Green J.H.: The pathogenesis of leptospirosis : Toxin production by Leptospira icterohaemorrhagiae. Lab. Invest. 11:273-288 (1962)
- 5.- Arroyo S.V.: Identificación de leptospiras en perros de la Ciudad de México, método serológico y método biológico. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1966
- 6.- Banfi E.; Cinco M. and Dri P.: Catalase activity among leptospiras. Experientia 37:147-148 (1981)
- 7.- Banks P.M. and Pigott C.M.: An investigation of leptospirosis of dogs in Bulawayo. Rhod. Vet. J. 10:17-19 (1979)
- 8.- Baseman J.B. and Cox C.D.: Intermediate energy metabolism of leptospira. J. Bact. 97:992-1000 (1969)
- 9.- Bishop S.; Strandberg J.; Adams L.; Brownstein L. and Patterson A.: Chronic Active hepatitis in dogs associated with leptospiras. Am. J. Vet. Res. 40:839-844 (1979)
- 10.- Bromley D.B. and Charon N.W.: Axial filament involvement in the motility of Leptospira interrogans. J. Bact. 137:1406-1412 (1979)
- 11.- Bryans J.T.: Studies on Equine leptospirosis. Cornell Vet. 45: 16-50 (1955)
- 12.- Buchanan R.E. and Gibbons N.E.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eight Edition. Williams and Wilkins Co. Baltimore 1974.

- 13.- Canale-Parola E.: Physiology and Evolution of Spirochetes. Bact. Rev. 41:181-204 (1977)
- 14.- Carter G.R.: Diagnostic procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. Third edition. Charles C. Thomas Publishers Illinois 1979
- 15.- Cheville N.F.; Huhn R. and Cutlip S.: Ultrastructure of renal lesions in pigs caused by Leptospira pomona. Vet. Pathol. 17: 338-351 (1980)
- 16.- Corin R.E.; Boggs E. and Cox C.D.: Enzymatic degradation of H_2O_2 by Leptospira. Infect Immun. 22:672-675 (1978)
- 17.- Davis et al: Microbiology. Third edition. Harper and Row Publishers Hagerstown 1980
- 18.- De Brito T.; Bbhm G. and Yasuda P.: Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the Guinea - pig. J. Path. 128: 177-182 (1979)
- 19.- Dikken H. and Kmety E.: Serological typing Methods of leptospire. Methods in Microbiology. Vol. II Academic Press, London 1978
- 20.- Dukes H.H. y Swenson M.J.: Fisiología de los Animales Domésticos. Cuarta Edición, tomo I, Editorial Aguirre 1977.
- 21.- Ellis W.A. and Michna S.W.: Bovine Leptospirosis: Demonstration of leptospire of the hebdomadis serogroup in aborted fetuses and a premature calf. Vet. Rec. 99:430-432 (1976)
- 22.- Ettinger S.J.: Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and the cat. Vol I W.B. Saunders and Co. 1975
- 23.- Everard C.O.; Cazabon E.P.; Dreesen D.W. and Sulzer C.R.: Leptospirosis in dogs and cats on the island of Trinidad West Indies. Int. J. Zoon. 6:33-40 (1979)
- 24.- Faine S.: Reticuloendothelial phagocytosis virulent leptospire. Am. J. Vet. Res. 25:830-835 (1964)
- 25.- Fathalla N.C. and Coughlan J.D.: Detection of Leptospiral antibodies in animal sera by means fractionated antigenic extracts. J. Med. Microb. 13:513-526 (1980)
- 26.- Felix R.R.: Contribución al conocimiento de la incidencia de la leptospirosis (Leptospira canicola e icterohaemorrhagiae) en perros del D.F., Tesis de Licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1963

- 27.- Finco D.R. and Low D.G.: Endotoxic properties of Leptospira canicola. Am. J. Vet. Res. 28:1863-1872 (1967)
- 28.- Flores C.R. Un estudio de 50 necropsias en perros callejeros, Tesis de Licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 1977
- 29.- Frohlich W.: Demonstration of leptospirae antibodies in the sera of immunized rabbits by the indirect immunofluorescence test. Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. 247:124-131 (1980)
- 30.- Fuchs G.H. and Hartmann H.: Occurrence of Leptospiral infections among service and working breeds of dogs in the Dresden District. Arch. Exp. Vet. 28:869-877 (1980)
- 31.- Fuentes R.M.: Cálculo de la población canina en la Ciudad de México. Determinación de sus condiciones de atención y destino. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 1979
- 32.- Galton M.N.; Menges R.W.; Shotts E.B.; Heath C.L. y Nahmias A.J. Métodos de Laboratorio para leptospirosis. Centro Panamericano de Zoonosis Organización Mundial de la Salud. Nota técnica No. 9, 1968.
- 33.- Gillespie J.H. and Timoney J.F.: Hagan and Bruner's infection Disease of Domestic Animals. 7th Edition, Cornell University Press 1981
- 34.- González L.G.: Exploración serológica de anticuerpos contra Leptospira canicola en perros por el método de aglutinación en tubo capilar, Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 1965.
- 35.- Gourley I.M. and Low D.G.: In vivo aggregation of canine blood platelets and liquefactions of blood clots by leptospire. Am. J. Vet. Res. 23:1252-1256 (1962)
- 36.- Guida V.O.: Estudos sobre a leptospirose canina. Arq. Inst. Biol. Sao Paulo 19:149-152 (1949)
- 37.- Haapala D.K.; Rogul M.; Evans L.B. and Alexander A.D.: Deoxyribonucleic acid base composition and homology studies of Leptospira. J. Bact. 98:421-428 (1969)
- 38.- Hagiwara M.K. and Rosa C.A.: Canine leptospirosis in the state of Sa plus or minus o Paulo. Arq. Inst. Biol. Sao Paulo. 42: 111-118 (1975)

- 39.- Hanson L.E.: Immunology of Bacterial diseases with special reference to leptospirosis. J. A. V. M. A. 170:991-994 (1977)
- 40.- Hanson L.E.: Manual para la selección y el manejo de muestras para el diagnóstico de la leptospirosis. Centro para la investigación de Zoonosis. Universidad de Illinois.
- 41.- Hathaway S.C. and Marshall R.B.: Haemolysis as a means as distinguishing between Leptospira interrogans serovars balcanica and hardjo. J. Med. Microb. 13:477-481 (1980)
- 42.- Henneberry R.C. and Cox C.P.: Antigenic analysis of water forms of Leptospira. J. Bact. 96:1419-1420 (1968)
- 43.- Heptinstall R.H.: Pathology of the Kidney. Second Edition Vol. II Little Brown and Co. 1974.
- 44.- Higgins R. and Descoteaux D.: Pathogenesis of experimental Leptospira interrogans serotype icterohaemorrhagiae infection in Guinea pig: Possible role of endotoxin of intestinal bacteria in the development of lesions. Can. J. Comp. Med. 44:234-236 (1980)
- 45.- Holt S.C.: Anatomy and Chemistry of Spirochetes. Microb. Rev. 42:114-160 (1978)
- 46.- Huhn R.; Kokjohn J. and Cardella M.: Immunity to leptospirosis: antiserums in dogs and hamsters. Am. J. Vet. Res. 36:71-74 (1975)
- 47.- Inzana T.J. and Dawe D.L.: Experimental induced Leptospira interrogans serovar autumnalis infection in young swine. Am. J. Vet. Res. 40:1355-1358 (1979)
- 48.- Jaksch W.; Stettner W.; Willinger H. and Awad-Masalmeh E.: Clinical and serological examinations for canine leptospirosis in the Vienna area. Prak. Tierarzt. 57:282-286 (1976)
- 49.- Johnson R.C. and Harris V.G.: Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I.- Growth at low temperatures. J. Bact. 94:27-31 (1967)
- 50.- Jubb R.V. and Kennedy P.C.: Pathology of Domestic Animals Vol. II Second Edition, Academic Press Inc. 1970

- 51.- Keenan K.P.; Alexander A.D. and Montgomery L.: Pathogenesis of experimental Leptospira interrogans serovar bataviae infection in the dog: microbiological, clinical, hematologic and biochemical studies. Am. J. Vet. Res. 39:444-451 (1978)
- 52.- Kirk R.W.: Current Veterinary Therapy VI. Small Animal Practice. third Ed. W. B. Saunders Co. 1977
- 53.- Knight L.L.; Miller N.G. and White R.J.: Citotoxic factor in the blood and plasma of animals during leptospirosis. Infect. Immun. 8:401-405 (1973)
- 54.- Lewis J.: The routine application of a microtechnique for the demonstration of leptospiral antibodies. J. Med. Microbiol. 11: 355-358 (1978)
- 55.- Liu C.K. and Wang C.H.: Serological, pathological and bacteriological studies on naturally occurring cases of canine leptospirosis. Inst. Vet. Sci. 17:166-176 (1977)
- 56.- Marshall R.B.; Wilton B.E. and Robinson A.J.: Identification of Leptospira serovars by restriction-endonuclease analysis. J. Med. Microbiol. 14:163-166 (1981)
- 57.- Marshall R.B.: The route of entry of leptospires into the Kidney tubule. J. Med. Microbiol. 9:149-152 (1976)
- 58.- Marshall R.B.: Ultrastructural changes in renal tubules of sheep following experimental infection with Leptospira interrogans serotype pomona. J. Med. Microbiol. 7:505-508 (1974)
- 59.- Martone W.J. and Kaufmann L.: Leptospirosis in the United States 1974-1978; from the Center for Disease Control. J. Infect. Dis. 140:1020-1022 (1979)
- 60.- Miller N.G. and Wilson R.B.: Electron microscopy study of the relationship of Leptospira pomona to the renal tubules of the hamster during acute and chronic leptospirosis. Am. J. Vet. Res. 28:225-235 (1967)
- 61.- Monlux W.S.: Leptospirosis III: The clinical pathology of canine leptospirosis. Cornell Vet. 37:109-121 (1948).
- 62.- Monlux W.S.: Leptospirosis IV: The pathology of canine leptospirosis. Cornell Vet. 37:199-208 (1948)

- 63.- Morrison W.I. and Wright N.G.: Immunopathological aspects of canine renal disease. J. Small Anim. Pract. 17:139-148 (1976)
- 64.- Morrison W.I. and Wright N.G.: Canine leptospirosis immunopathological study of interstitial nephritis due to Leptospira canicola. J. Pathol. 120:83-89 (1976)
- 65.- Muller-Peddinhaus R. and Trautwein G.: Spontaneous glomerulonephritis in dogs. I.- Clasification and immunopathology. Vet. Pathol. 14:1-13 (1977)
- 66.- Myers D.M.: Serological studies and isolations of serotype - hardjo and Leptospira biflexa strain from horses of Argentina. J. Clin. Microbiol. 3:83-89 (1976)
- 67.- Nauman R.K.; Holt S.C. and Cox C.D.: Purification, ultrastructure and composition of axial filaments from Leptospira. J. Bact. 98:264-280 (1969)
- 68.- Newman J.P.: Studies of canine leptospirosis I.- Evaluations of laboratory diagnostic procedures. II.- Serologic determination of the incidence of latent infection in the Lansing Michigan Area. Am. J. Vet. Res. 11:405-411 (1950)
- 69.- Noda R. and Ryu E.: Investigation on leptospiral agglutinin of diagnostic and stray dogs in Osaka. Prefecture using rapid microscopic agglutination test. Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B. 25:17-20 (1973)
- 70.- Osborne C.A.; Low D.G. and Finco D.R.: Canine and Feline Urology. Third edition. W.B. Saunders Co. 1972
- 71.- Ritchie A.E. and Ellinghausen H.C.: Electron microscopy of leptospire I.- Anatomical features of Leptospira pomona. J. Bact. 89:223-232 (1965)
- 72.- Ryu E.; Hasegawa A.; Saegusa S. and Ichiki H.: An investigation of canine leptospiral antibodies in Tokyo and Yokohama. Comparison of canine positive rates between rapid microscopic agglutination test and Schuffner-Mochtar test. Int. J. Zoon. 3:82-90 (1974)
- 73.- Ryu E.: An international survey of leptospiral agglutinin of dogs by RMAT. Int. J. Zoon. 3:33-60 (1976)
- 74.- Ryu E.: Chronological reference of zoonoses: Leptospire and leptospirosis. Int. Lab. Zoon. (1960)

- 75.- Schonberg A.: Antibodies against Leptospira biflexa serotypes patoc and Sao Paulo in pigs: Possible occurrence and importance for the intracutaneous test for leptospirosis. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 244:45-49 (1979)
- 76.- Schonberg A.; Galdas E.M.; Sampaio M.B.; Costa E. and Plank S.J.: Leptospirin- An intradermic test for the diagnosis of leptospirosis. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 247:114-123 (1980)
- 77.- Schenberg E.: Growth of pathogenic Leptospira in chemically defined media. J. Bact. 93:1958-1606 (1967)
- 78.- Smith T.F. et al.: Pseudospirochetes, a cause of erroneous diagnosis of leptospirosis. Am. J. Clin. Path. 72:459-463 (1979)
- 79.- Smith H.A.; Jones T.C. and Hunt R.D.: Veterinary Pathology. Fourth Edition, Lea & Febiger 1972.
- 80.- Stalheim H.V.: Leptospirosis diagnosis by immunofluorescence: Improved procedure for antigen preparation. Am. J. Vet. Res. 32:2107-2109 (1979)
- 81.- Stoenner H.G.: A capillary tube test for leptospirosis. Am. J. Hyg. 57:316-327 (1953)
- 82.- Stoenner H.G.: Application of serology to the diagnosis of leptospirosis. Proceeding book of the American Veterinary Medical Association, ninety Second Annual Meeting, pp 172-176 (1955)
- 83.- Stoichev I.: Pathology of the urinary system in dogs from an endemic nephropathy (man) region of Bulgaria. Zbl. Vet. Med. 27:47-54 (1980)
- 84.- Sullivan N.D.: Leptospirosis in animals and man. A.V.A. Conference paper. Aust. Vet. J. 50:216-223 (1974)
- 85.- Thiermann A.B.: Canine leptospirosis in Detroit. Am. J. Vet. Res. 41:1659-1661 (1980)
- 86.- Timoney J.T.; Sheahan B. and Timoney P.J.: Leptospira and infectious canine hepatitis (ICH) virus antibodies and nephritis in Dublin dogs. Vet. Rec. 94:316-319 (1974)
- 87.- Varela M.: Investigación de aglutininas para Leptospira icterohaemorrhagiae, canicola y pomona en sueros humanos y de animales en varios estados de México. Rev. Inst. Enfer. Trop. SSA 2:203-204 (1959)

- 88.- Watson A.D.; Davis P.E. and Johnson J.A.: Suspected leptospirosis outbreak in kennelled greyhounds. Aust. Vet. Prac. 6:84-88 (1976)
- 89.- Watson A.D.; Wannan J.S.; Porges W.L. and Testoni E.J.: Leptospiral agglutinins in dogs in Sidney. Aust. Vet. J. 52:425-426 (1976)
- 90.- Yanagihara Y. and Mifuchi I.: Microfibers present in surface structure of Leptospira. J. Bact. 95:2403-2406 (1968)
- 91.- Zeigler J.A. and W.P. Van Eseltine: Isolation and chemical characterization of the outer envelope of Leptospira pomona. Can. J. Microb. 21:1102-1112 (1975)