

01621  
72

I



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

ANALISIS DE LA INFORMACION SOBRE  
ESTUDIOS SEROLOGICOS PARA *Leptospira*  
*interrogans* SEROVAR *hardjo*, POR MEDIO DE LA  
PRUEBA DE MICROAGLUTINACION, EN  
EL CENTRO NACIONAL DE SERVICIOS DE  
DIAGNOSTICO EN SALUD ANIMAL,  
MEXICO, DE 1983 A 1992.

TESIS PRESENTADA ANTE LA  
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
POR

JOSE JAIME ROBLES GARCIA

ASESOR: LAURA PATRICIA NOE MARTINEZ

MEXICO, D.F.

2003





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.

DEDICATORIA

A mis padres por su amor incondicional en todo momento.

A Alma por su amor y por su paciencia.

A mis hermanos Benjamín, Lety, Alejandro y Raúl. Por su apoyo.

A mi hija Mariana. Porque eres lo más bello en mi vida.

A mi hijo Axel Eduardo. Porque tu llegada me dió la fuerza para comenzar de nuevo.

### III

#### AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer muy especialmente al Dr. José Barajas, por la gran ayuda que significaron sus consejos, observaciones y asesoría.

A la Dra. Patricia Noé por su asesoría y sobre todo por su apoyo.

A mis compañeros y amigos del CENASA, en especial a Alicia, a Marcela, a Maty, a Noemí y a la China.

## IV

### CONTENIDO

	Página
RESUMEN . . . . .	1
INTRODUCCIÓN . . . . .	2
OBJETIVO . . . . .	7
MATERIAL Y METODOS . . . . .	8
RESULTADOS . . . . .	10
DISCUSIÓN . . . . .	11
CONCLUSIÓN . . . . .	13
LITERATURA CITADA . . . . .	14
CUADROS . . . . .	18

## RESUMEN

ROBLES GARCIA, JOSE JAIME. Se analizan los datos obtenidos de 1983 a 1992, de la prueba de microaglutinación realizada a 21,922 sueros de la población bovina del Centro Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo, y se encuentra una disminución de la prevalencia serológica a *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* (LH) de 50.2 % al inicio del estudio a 4.6 % en el último año, probablemente como resultado del uso de bacterinas y al mejoramiento en el manejo de los animales. Se confirma la efectividad de la prueba de microaglutinación en el diagnóstico de leptospirosis, a pesar de que no es capaz de diferenciar títulos vacunales de títulos por infección. Se establece una seroprevalencia promedio de 29.4 % en los 10 años del estudio con un rango de 4.6 a 57 %.

## INTRODUCCION

La leptospirosis es una enfermedad infecto-contagiosa que se presenta en una gran variedad de especies animales, incluyendo al hombre<sup>17,19,29,32</sup>. Está considerada como una de las zoonosis más difundidas en el mundo.<sup>1,4,10,13,20,31</sup>

La primera descripción de esta enfermedad fue realizada a finales del siglo pasado por Weil, quien observó un padecimiento caracterizado por ictericia. No fue sino hasta 1915 cuando el agente etiológico pudo ser aislado por Inada e Ido en Japón. Después, en 1919, Noguchi logró los primeros aislamientos en el continente americano en pacientes con diagnóstico de fiebre amarilla creyendo erróneamente haber encontrado al agente etiológico de esta enfermedad.<sup>20,28,29</sup>

Es causada por una bacteria clasificada dentro de la Familia Leptospiraceae, por métodos serológicos se reconocen dos especies, *Leptospira interrogans*, que representa a las cepas patógenas y *Leptospira biflexa* que incluye a las saprófitas o de vida libre<sup>20,25,34</sup>. Con estudios basados en la homología de ADN se ha clasificado en 4 especies saprófitas, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. parva* y *L. wolbachii*, y siete especies patógenas, *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. inadae* y *L. kirschneri*.<sup>23</sup>

La lista de leptospirosis patógenas tiene alrededor de 217 variedades serológicas, las cuales constituyen el taxón básico, a su vez estos serovares están clasificados en 23 serogrupos.

Esta clasificación está basada en la serotipificación, la cual consiste en la comparación de los antígenos de superficie de aislamientos con los de cepas de referencia midiendo las reacciones de las leptospirosis con antisueros específicos de las cepas desconocidas, grupos de referencia y serovares, en la prueba de aglutinación microscópica.<sup>1,2,34,35</sup>

Las leptospirosis son organismos extremadamente delgados, ya que miden 0.1 X 6-20 µm, están estrechamente enrolladas y se caracterizan por

su motilidad, uno o ambos extremos tienen forma de gancho, debido a su diámetro tan pequeño, las leptospiras no pueden observarse en preparaciones húmedas sin teñir a menos que se use un microscopio de campo oscuro o de contraste de fases, además no se tiñen fácilmente con colorantes de anilina. Para observarse en cortes histológicos se utilizan técnicas de impregnación con sales de plata. Tienen la habilidad de pasar a través de filtros con poros de 0.22  $\mu\text{m}$ .<sup>17,20,26</sup>

Se cree que la habilidad de espiroquetas patógenas tales como *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi* y *Treponema pallidum* para penetrar muchos tipos de medio y membranas basales está directamente relacionada con la motilidad de estas bacterias en soluciones viscosas.<sup>14,16</sup>

Una vez que las leptospiras entran al organismo, ya sea a través de las mucosas o soluciones de continuidad, alcanzan el torrente sanguíneo y producen una bacteremia que puede durar desde algunas horas hasta 7 días. Durante este periodo las leptospiras invaden los órganos internos, en los cuales ocasionan diferentes lesiones dependiendo de la susceptibilidad del huésped y de la virulencia de los organismos<sup>17,20,33</sup>. Con la aparición de los anticuerpos las leptospiras son eliminadas de la sangre y los órganos, con excepción del humor acuoso del ojo, los túbulos contorneados del riñón, el líquido cefalorraquídeo y posiblemente de porciones del tracto genital. Parece ser que las leptospiras están protegidas de una actividad anticuerpo-complemento en estos sitios anatómicos<sup>20,33</sup>. La duración de esta localización y la eliminación urinaria dependerá de la adaptación huésped-serovar. Se sabe que la infección por leptospiras persiste por más de 142 días en el útero de vacas gestantes y por 97 días en úteros no gestantes. La localización en el útero gestante puede ser seguida por una infección fetal con los consiguientes desórdenes reproductivos como el aborto, los mortinatos o el nacimiento de becerros débiles.<sup>20,33</sup>

Para comprender la epidemiología de la leptospirosis es conveniente señalar la diferencia entre los términos "huésped" y reservorio". Un huésped es un animal infectado con un determinado agente. Cuando la relación huésped parásito ofrece una salida a este último el huésped se convierte en reservorio<sup>6</sup>. Este último presenta las siguientes características: 1) alta susceptibilidad a la infección (baja dosis infectante), 2) excreción renal por largos periodos y 3) signos clínicos y respuesta patológica leves.<sup>27</sup>

Los principales reservorios de la mayoría de las leptospiras son los mamíferos silvestres. Generalmente cada serovar es enzoótica en una o varias especies silvestres, las cuales se convierten en portadores por largos periodos, permitiendo la supervivencia y la transmisión. Como ejemplos se puede mencionar a la rata, que es reservorio de *L. icterohaemorrhagiae*, al ratón de *L. ballum*, al perro de *L. canicola*, al bovino de *L. hardjo* y al cerdo de *L. bratislava*. La perpetuación de la infección se logra cuando estos animales eliminan leptospiras en la orina, apareciendo nuevas infecciones en la población.<sup>18,21</sup>

Cuando una serovar de leptospira logra infectar a un animal sin que exista una buena adaptación huésped-parásito, aquel mostrará signos clínicos severos, incluso la muerte. Si el animal resiste a la infección, la colonización de los riñones por parte de la leptospira no se logrará y por lo tanto no podrá ser transmitida a otro animal. Es importante también resaltar como influye el medio ambiente en la epidemiología de la leptospirosis, ya que estos organismos no son capaces de reproducirse fuera del huésped, por lo que la temperatura, la humedad y el pH del suelo entre otros, son cruciales para su supervivencia.<sup>1,2,6</sup>

Entre las enfermedades infecciosas que afectan la reproducción en bovinos, la leptospirosis ocupa un lugar importante, ya que una vez que logra introducirse en una población susceptible, ocasiona grandes pérdidas económicas debido principalmente a los abortos, mortinatos,

nacimiento de becerros débiles, repeticiones del estro y disminución de la producción de leche.<sup>4,11,12,15,19,33</sup>

La inmunización de animales domésticos para prevenir esta enfermedad se realizó por primera vez en el año de 1926 y consiste básicamente en la administración de cultivos de leptospira inactivados<sup>18</sup>. Con el fin de evaluar la eficacia de las bacterinas en la prevención de la leptospirosis se han realizado numerosos estudios, la mayoría de los cuales afirma que estos productos biológicos evitan la presentación clínica de la enfermedad y la eliminación de leptospiras a través de la orina<sup>3,16,18,21</sup>. Sin embargo, con el mejoramiento de las técnicas para la detección de antígenos de leptospira en orina y tejidos, estudios recientes han demostrado que los beneficios de estas bacterinas son solo parciales y los animales inmunizados pueden infectarse y eliminar leptospiras por la orina, aunque en una proporción menor. Es por esto que los resultados de un programa de bacterinización en un hato, suelen observarse después de varios años de uso continuo de bacterinas leptospirales.<sup>7,8,9</sup>

En la sección de leptospirosis del Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CNSDSA) se ha realizado la prueba de microaglutinación para el diagnóstico de esta enfermedad desde el año 1976. Se reciben muestras procedentes de gran parte del territorio nacional, ya sea a través de los laboratorios regionales de diagnóstico veterinario o directamente de las explotaciones pecuarias cercanas al CNSDSA. Un caso aparte es el del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca S.A. (CAITSA), el cual surgió como consecuencia de la descentralización de establos lecheros en el D.F.. Cuenta con aproximadamente 27000 vacas distribuidas en más de 120 establos y envió un promedio de 2300 sueros al año para diagnóstico serológico de la leptospirosis de 1983 as 1992. En este centro, se encontraron las primeras evidencias serológicas de esta enfermedad desde el año de 1977. Un año después se presentaron los primeros casos clínicos con diagnóstico

de leptospirosis en el centro de recría y abortos en algunos establos. En la década de los ochentas se intensificaron los muestreos serológicos, encontrándose reactores positivos a la serovar hardjo con la prueba de microaglutinación. Se decidió entonces en el año de 1982 efectuar la aplicación de una bacterina comercial pentavalente con las serovares hardjo, pomona, canicola, grippotyphosa e icterohaemorrhagiae en cuatro establos con problemas reproductivos.

En el año de 1983 y 1984 aumentó el número de establos bacterinizados, sin embargo el programa de control de la leptospirosis no es oficial sino hasta 1985, año en el que se aplica la bacterina a las vacas de todos los establos, rebacterinizando cada 6 meses. Además se inmunizaba a las becerras de más de 4 meses de edad, con un refuerzo a los 15 días y luego cada 6 meses. Tiempo después se decidió bacterinizar cada 3 meses, por considerar que la bacterina no tenía la potencia suficiente para proteger a los animales.

## OBJETIVO

Conocer la seroprevalencia de leptospirosis causada por *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* en el CAITSA mediante la determinación de los porcentajes de reactivos positivos obtenidos por la prueba de microaglutinación de sueros de bovinos hembras del CAITSA de enero de 1983 a diciembre de 1992.

## MATERIAL Y METODOS

Se analizaron los datos que obran en los archivos del CNSDSA correspondientes a los resultados sobre la prueba de microaglutinación para determinar la prevalencia de sueros reactivos positivos totales por año y por todo el periodo 1983-1992 al género *Leptospira* y a la serovar *hardjo* en animales adultos (con uno o más partos), animales del centro de cría (desarrollo I, desarrollo II y gestación) y animales de reemplazo.

La prueba de microaglutinación utilizada se basó en el método empleado por Cole, 1973.

Los sueros problema fueron diluidos 1:25 con solución tamponada de fosfatos, se utilizó una placa con 96 pozos de fondo plano, se pusieron 50 microlitros de la dilución 1:25 de cada suero problema en tantos pozos como serovares fueran a probarse. Posteriormente se pusieron 50 microlitros de un cultivo de las diferentes serovares de leptospiros en los pozos correspondientes a cada suero.

Como control negativo se pusieron en un pozo de la placa 50 microlitros de solución tamponada de fosfatos y 50 microlitros de cultivo de cada serovar de leptospira. Como control positivo se pusieron en otro pozo de la placa 50 microlitros de una dilución 1:25 de un suero con título conocido 1:100 y 50 microlitros de cultivo de cada serovar de leptospiros. Se mezcló cada placa sobre la mesa con movimientos circulares. Se dejaron las placas a temperatura ambiente (21 C) durante 1 hora, 20 minutos.

La lectura se realizó con un microscopio de campo oscuro, con aumento de 125 X, calificando las reacciones con 1, 2, 3, 4 ó negativo, es decir, 1 con un 25% de leptospiros aglutinadas, 2 con un 50%, 3 con un 75%, 4 con un 100% y negativo cuando ha había leptospiros aglutinadas.

Se realizó la dilución final a todos aquellos sueros que aglutinaron al 50% o más de leptospiros.

Se pusieron 100 microlitros del suero problema, diluido 1:25, en el primer pozo de una microplaca. Se pusieron 50 microlitros de solución

tamponada de fosfatos en el pozo 2 al 8. Con una micropipeta ajustada a 50 microlitros se hicieron diluciones dobles, transfiriendo 50 microlitros del pozo 2 al 3, de este al 4 y así sucesivamente hasta el pozo 8, descartando de este último 50 microlitros. Se agregaron 50 microlitros de cultivo de la serovar en cuestión a cada pozo. Se mezclaron las placas sobre la mesa de trabajo con movimientos circulares. Se cubrieron las placas y se dejaron a temperatura ambiente 1 hora, 20 minutos. Las diluciones correspondientes tenían un rango de 1:50 hasta 1:6400. La dilución final fue aquella en la que se observó un 50% de leptospiras aglutinadas.

## RESULTADOS

El Cuadro 1 muestra que se presentó el mayor número de focos en el año 1988. Se observó un promedio de 527 focos por año, con un rango de 163 para 1983 a 954 para 1988.

En relación al número de sueros recibidos, se observó un promedio de 2192, con un rango de 430 para 1983 a 4833 para 1988 (Cuadro 2).

El promedio de sueros positivos a LH fue de 630, con un rango de 68 para 1992 a 1733 para 1984 (Cuadro 1).

El porcentaje más alto de sueros positivos al género *Leptospira* se observó en el año de 1985 y el más bajo se observó en 1992 (Cuadro 1).

El porcentaje de sueros positivos a LH en las diferentes diluciones se muestra en el Cuadro 2.

Los Cuadros 3, 4 y 5, muestran el número de focos, el número y porcentaje de sueros positivos al género *Leptospira*, el número de sueros negativos al género *Leptospira* y el número de sueros positivos a LH en las diferentes etapas del centro de cría.

De igual forma el Cuadro 6 muestra los mismos datos en relación a los animales de reemplazo que llegan al CAITSA.

## DISCUSIÓN

Por la amplia distribución de la leptospirosis en el mundo, es difícil pensar en su erradicación. Sin embargo, es posible el control de esta enfermedad en las poblaciones de animales domésticos disminuyendo la prevalencia de la infección. Existen estudios que demuestran que esto se logra con el uso de bacterinas durante varios años, ya que estos productos biológicos, a pesar de no prevenir completamente la infección y la posterior leptospiruria, sí disminuyen su ocurrencia.

El término de foco se utiliza para referirse a una o más muestras séricas provenientes de un mismo grupo de animales como establo, centro de cría o reemplazos.

La gran variación en el número de focos y de sueros recibidos para diagnóstico de leptospirosis (Cuadro 1) puede explicarse por el criterio utilizado para el envío de muestras, el cual está relacionado con la eficiencia reproductiva en cada uno de los establos. En ocasiones, a petición del propietario se realizan muestreos serológicos de un porcentaje de la población, generalmente un 10-20%. Además es una práctica rutinaria enviar al laboratorio 2 ó 3 muestras de suero con un intervalo de 15 días de vacas que abortan. Por lo que en un año es posible haber recibido 2 ó más muestras de un mismo animal.

En el presente estudio, partiendo de una prevalencia serológica a LH de 50.2 % y después de un aumento hasta 55.4 y 57 % en los años 1984 y 1985, respectivamente, ocurrió una disminución paulatina hasta llegar a un 4.6 % en el último año. Asimismo, los títulos de anticuerpos de los sueros positivos también disminuyeron, siendo 1:800 el más alto y presentándose sólo en un animal al final del estudio (Cuadro 2).

La prueba de microaglutinación, utilizada en este estudio no es capaz de diferenciar títulos vacunales de títulos por infección, y solamente el muestreo de sueros pareados nos puede dar un indicio de lo que sucede en los animales. y al no haberse establecido un programa de bacterinización en el año de 1983, podemos afirmar que los títulos

detectados son resultado de una infección natural. El aumento de la prevalencia que se observa en el año 1984 y 1985 (Cuadro 1) puede explicarse por el inicio del programa de bacterinización.

Como puede observarse, el envío de sueros de los animales de la etapa Desarrollo I, fue muy irregular. El único año en el que los datos pueden ser significativos es el de 1985. Se recibieron 864 sueros, siendo positivos a LH el 9.3%. Cabe señalar que estos animales de esta edad (46 días a 6 meses) todavía no se les administra la bacterina. El posible origen de los anticuerpos detectados es el calostro ingerido por estos animales (Cuadro 3).

En cuanto a la etapa de Desarrollo II podemos observar que en algunos años se recibió una cantidad muy pequeña de sueros (años 1983, 1984, 1987, 1989, y 1990) y en otros no se recibió suero alguno (años 1986, 1988, 1991 y 1992), lo que impide evaluar la prevalencia real en estos años, al no ser significativa la cantidad de sueros. El año de 1985 es el único en que la cantidad de sueros recibidos permite tener una idea más clara de la prevalencia serológica a LH, siendo esta de 9.3% (Cuadro 4).

En la etapa de gestación nuevamente observamos que hay irregularidad en el número de muestras recibidas en los diferentes años que abarca el estudio, sin embargo, los datos de la mayoría de los años nos indican claramente que hubo un descenso en la prevalencia (Cuadro 5).

Finalmente podemos ver que en el grupo de animales de Reemplazo, con excepción del año 1983, la recepción de muestras es más constante, contrastando esto con la prevalencia, la cual mostró mucha variación en los 10 años del estudio.

## CONCLUSIÓN

La *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* es un agente infeccioso presente en la población bovina del CAITSA, como lo evidencian los títulos de anticuerpos detectados con la prueba de microaglutinación.

Después de observar una prevalencia serológica a LH cercana al 50% en los primeros años del estudio, ocurrió un descenso de la misma hasta llegar a un 4.6% en el último año del estudio.

## LITERATURA CITADA

- 1.- Abdussalam, M.: Situación mundial del problema de la leptospirosis. VII Reunión Interamericana sobre el Control de la Fiebre Aftosa y Otras Zoonosis. Publ.Cient. No. 316, O.P.S./O.M.S., 142-153, (1976).
- 2.- Acha, P. and Szyfres, B.: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Pub. Cient. O.P.S., O.M.S., (1977).
- 3.- Allen, J.D., Meney, C.L. and Wilks, C.R.: Evaluation of a hardjo-pomona vaccine to prevent leptospirosis in cattle exposed to a natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Australian Veterinary Journal.*, 58:93-96 (1992).
- 4.- Amatredjo, A. and Campbell. R.S.F.: Bovine leptospirosis. The *Veterinary Bulletin.*, 43:875-891 (1975).
- 5.- Bergogne-Berezin, E.: Leptospiras. Les examens de laboratoire. *Aerobies. Daguot et col. 1°. E. Paris.*, 443-453 (1972).
- 6.- Blenden, D.C.: Aspectos epidemiológicos de la leptospirosis. VII Reunión Interamericana sobre el Control de la Fiebre Aftosa y Otras Zoonosis, Publicación Científica No. 316, O.P.S./O.M.S., 160-168, (1976).
- 7.- Bolin, C.A., Thiermann, A.B., Handsaker, A.L. and Foley, J.W.: Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis infection of pregnant cattle. *Am.J.Vet.Res.*, 50: 161-165 (1989).
- 8.- Bolin, C.A., Zuerner, R.L. and Trueba, G.: Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing. *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis on type hardjo-bovis infection of cattle. *Am.J.Vet.Res.*, 50: 2004-2008 (1989).
- 9.- Bolin, C.A., Zuerner, R.L. and Trueba, G.: Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis in bovine urine. *Am.J.Vet. Res.*, 50:1001-1003 (1989).
- 10.-Broek, A.H.M. Van Den, Thrusfield, M.V., Dobbie, G.R. and Ellis, W.A.: A serological and bacteriological survey of leptospiral

infection in dogs in Edinburgh and Glasgow. *Journal of Small Practice.*, 32: 118-124 (1991).

11.-Durfee, P.T. and Allen, J.D.: Serological titres of dairy cows over a 63-week period followin natural infection with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Australian Veterinary Journal*, 56: 574-579 (1980).

12.-Ellis, W.A., O'Brien, J.J., Pearson, J.K.L. and Collins, D.S.: Bovine leptospirosis: Infection by the Hebdomadis serogroup and mastitis. *Veterinary Record.*, 99:368-370.

13.- Ellis, W.A.: Leptospirosis. *Journal of Small Animal Practice.*, 27: 683-692 (1986).

14.-Faine. S.: Guidelines for the control of Leptospirosis: World Health Organization Geneva, (1982).

15.- Giles, N., Hathaway, S.C. and Stevess, A.E.: Isolation of *Leptospira interrogans* serovar hardjo from a viable premature calf. *Veterinary Record*, 113: 174-176 (1983).

16.-Hancock, G.A., Wilks, C.R., Kotiw, M. and Allen, J.D.: The long term efficacy of a hardjo-pomona vaccine in preventing leptospirosis in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Australian Veterinary Journal*, 61:54-56 (1984).

17.-Hanson, L.E.: Bovine Leptospirosis. *Journal of Dairy Science.*, 59: 1166-1169 (1975).

18.- Hanson, L.E.: Leptospirosis in domestic animals: The domestic animals: The public health perspective. *JAVMA*. 181: 1505-1509 (1982).

19.- Higgins, R. and Cayouette, P.: Serological Diagnosis of Leptospirosis in the Province of Quebec. *Can. Vet. J.*, 19:13-16 (1978).

20.- Johnson, R.C.: Leptospirosis. *Clinical Microbiology Newsletter.*, 4: 113-116 (1982).

21.- Killinger, A.H., Taylor, P.L., Huhn, R.G., Hanson, L.E. and Mansfield, M.E.: Immunity to leptospirosis: Renal challenges in

vaccinated cattle given challenge inoculum. *Am. J. Vet. Res.*, 37: 93-96 (1976).

22.- Kmetz, E. and Dikken, H.: Revised list of *Leptospira* serovars. *Universitypress Groningen*, (1988).

23.- Levett, P.N.: Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 296-326 (2001).

24.- Little, T.W.A., Hathaway, S.C., Broughton, E.S. and Seawright, D.: Control of *Leptospira hardjo* infection in beef cattle by whole-herd vaccination. *Veterinary Record*. 131:90-92 (1982).

25.- Mailloux, M.: Leptospirosis-Zoonoses. *Int. J. Zoon.*, 2: 45-54 (1975).

26.- Michna, S.V.: Leptospirosis. *Veterinary Record.*, 86: 484-496 (1970).

27.-Pritchard, D.G.: Some examples of the use of epidemiological techniques in the study of leptospirosis. In *The present state of leptospirosis diagnosis and control* Martinus Nijhoff Publ., Dorthrecht, The Netherlands. (1986).

28.- Smith, R.E., Reynolds, I.M., Clark, G.W. and Milbury, J. A.: Bovine leptospirosis in Massachusetts. *Res. Bull. Agric. Exp. Stn., Univ. Mass.* No. 600, (1972).

29.- Stalheim, O.H.V.: Quimioterapia e inmunización para el control de la leptospirosis en los animales domésticos. VII Reunión Interamericana sobre el Control de la Fiebre Aftosa y Otras Zoonosis, *Publicación Científica No. 316., O.P.S./O.N.S.*, (1976).

30.- Szifres, B.: Leptospirosis as an animal and public health problem in Latin America and the Caribbean area. VIII Interamerican Meeting of F.D.N. and Zoonosis Control. *PAHO/WHO Scientific Publication No. 316, 115-130*, (1976).

- 31.- Thiermann, A.B. and Frank, R.R.: Human leptospirosis in Detroit and the role of rats as chronic carriers. *Int. J. Zoon.*, 7:62-72 (1980).
- 32.- Thiermann, A.B.: Experimental leptospiral infection in pregnant cattle with organisms of the *Hebdomadis* serogroup. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 780-784 (1982).
- 33.- Thiermann, A.B.: Leptospirosis: Current developments and trends. *J.A.V.M.A.*, 184:722-725 (1984).
- 34.- Thiermann, A.B., Handsaker, A.L., Moseley, S.L. and Kingscote, B.: New method for classification of leptospiral isolates belonging to serogroup *pomona* by restriction endonuclease analysis: serovar *kennewicke*. *Journal of Clinical Microbiology*, 21: 585-587 (1985).
- 35.- Thiermann, A.B., Handseker, A.L., Foley, J.W., White, F. H. and Kingscote, B.F.: Reclassification of northamerican leptospiral isolates belonging to serogroups *mini* and *sejroe* by restriction endonuclease analysis. *Am. J. Vet.Res.*, 47: 61-66 (1986).
- 36.- Trueba, G.A., Bolin, C.A. and Zuerner, R.L.: Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. *Journal of Bacteriology*, 174: 4761-4768 (1992).

CUADRO 1.

NUMERO DE FOCOS, NUMERO DE SUEROS RECIBIDOS,  
 NUMERO Y PORCENTAJE DE SUEROS POSITIVOS A  
*Leptospira hardjo* (LH) DURANTE LOS AÑOS 1983 A 1992.

AÑO	Nº DE FOCOS	Nº SUEROS RECIBIDOS	Nº SUEROS (+) a LH	% SUEROS (+) a LH
1983	163	430	216	50.2
1984	374	3125	1733	55.4
1985	196	702	400	57.0
1986	486	2637	1098	41.0
1987	838	2090	587	28.0
1988	954	4833	1662	34.3
1989	641	2022	179	8.8
1990	856	2823	258	9.1
1991	693	1780	101	5.6
1992	469	1480	68	4.6

CUADRO 2.

NUMERO DE SUEROS POSITIVOS A *Leptospira interrogans* SEROVAR *hardjo*  
EN LAS DIFERENTES DILUCIONES DE LA PRUEBA DE MICROAGLUTINACION

AÑO	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
1983	57	39	42	40	16	9	12	1
1984	278	157	235	321	317	237	118	70
1985	168	108	34	31	35	14	9	0
1986	429	331	233	52	32	16	3	2
1987	196	157	122	58	39	12	1	0
1988	612	453	372	140	62	19	4	0
1989	107	42	23	5	2	0	0	0
1990	133	63	37	9	6	4	5	0
1991	57	31	11	2	1	0	0	0
1992	38	17	12	1	0	0	0	0

### CUADRO 3.

NUMERO DE FOCOS, NUMERO DE SUEROS RECIBIDOS,  
 NUMERO Y PORCENTAJE DE SUEROS POSITIVOS A LH EN  
 LA ETAPA DE DESARROLLO-1 (46 DIAS A 6 MESES).

AÑO	N° DE FOCOS	N° DE SUEROS	N° SUEROS (+) a LH	% SUEROS (+) a LH
1983	1	3	3	100
1984	6	7	3	42
1985	12	864	81	9.3
1986	0	0	0	0
1987	2	34	0	0
1988	0	0	0	0
1989	2	17	0	0
1990	1	7	0	0
1991	0	0	0	0
1992	0	0	0	0

CUADRO 4.

NUMERO DE FOCOS, NUMERO DE SUEROS RECIBIDOS,  
 NUMERO Y PORCENTAJE DE SUEROS POSITIVOS A LH  
 EN LA ETAPA DE DESARROLLO-2 (6 MESES HASTA DIAGNOS-  
 TICO DE GESTACION).

AÑO	N° DE FOCOS	N° DE SUEROS	N° SUEROS (+) a LH	% SUEROS (+) a LH
1983	1	42	7	16.6
1984	3	9	3	33.3
1985	7	11	3	27.2
1986	0	0	0	0
1987	4	72	1	1.3
1988	6	52	1	1.9
1989	17	75	3	4
1990	29	315	1	0.3
1991	0	0	0	0
1992	0	0	0	0

CUADRO 5.

NUMERO DE FOCOS, NUMERO DE SUEROS RECIBIDOS,  
 NUMERO Y PORCENTAJE DE SUEROS POSITIVOS LH EN  
 LA ETAPA DE GESTACION (DIAGNOSTICO DE GESTACION HASTA  
 2 MESES ANTES DEL PARTO)

AÑO	Nº DE FOCOS	Nº DE SUEROS	Nº SUEROS (+) a LH	% SUEROS (+) a LH
1983	1	1	1	100
1984	7	406	161	39.6
1985	6	95	71	74.7
1986	51	183	10	5.4
1987	5	9	0	0
1988	37	120	2	1.6
1989	48	328	6	1.8
1990	57	477	1	0.2
1991	38	334	0	0
1992	3	18	0	0

CUADRO 6.

NUMERO DE FOCOS, NUMERO DE SUEROS RECIBIDOS,  
 NUMERO Y PORCENTAJE DE SUEROS POSITIVOS A LH  
 EN VACAS DE REEMPLAZO

AÑO	Nº DE FOCOS	Nº DE SUEROS	Nº SUEROS (+) a LH	% SUEROS (+) a LH
1983	1	1	1	100
1984	7	406	161	39.6
1985	6	95	71	74.7
1986	51	183	10	5.4
1987	5	9	0	0
1988	37	120	2	1.6
1989	48	328	6	1.8
1990	57	477	1	0.2
1991	38	334	0	0
1992	3	18	0	0

10. Zhou GH, Han ZK. Effects of dietary supplementation of  $\beta$ 2-adrenergic agonist clenbuterol on carcass characteristics and some metabolites in ducks. *British Poultry Science* 1994; 35: 355-361.
11. Mersmann HJ, Hu CY, Pond WG, Rule DC, Novakofski JE, Smith SB. Growth and adipose tissue metabolism in young pigs fed cimaterol with adequate or low dietary protein. *J. Anim. Sci.* 1987; 64: 1384-1394.
12. Peterla TA, Scanes CG. Effect of  $\beta$ -adrenergic agonists on lipolysis and lipogenesis by porcine adipose tissue in vitro. *J. Anim. Sci.* 1990;68: 1024-1029.
13. Mitchell AD, Solomon MB, Steele NC. Influence of level of dietary protein or energy on effects of ractopamine in finishing swine. *J. Anim. Sci.* 1991; 69: 4487-4495.
14. Bergen WG, Johnson SE, Skjaerlund DM, Babiker AS, Ames NK, Merkel RA, et al. Muscle protein metabolism in finishing pigs fed ractopamine. *J. Anim. Sci.* 1989; 67: 2255-2262.
15. Brambilla G, Cenci T, Franconi F, Galarini R, Macri A, Rondoni F, et al. Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicology Letters* 2000; 114: 47-53.
16. Mazzanti G, Daniele C, Boatto G, Manca G, Brambilla G, Loizzo A. New  $\beta$ -adrenergic agonist used illicitly as growth promoters in animal breeding: chemical and pharmacodynamic studies. *Toxicology* 2003; 00: 1-9.
17. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Acuerdo por el que se declara de interés zoonosanitario y de inocuidad agroalimentaria el uso indebido de clenbuterol. México (DF): SAGARPA, 25 de marzo de 2002.
18. Secretaría de Salud. Informe a la comisión de abasto y distribución de alimentos de la II Asamblea Legislativa. Secretaría de Salud del Distrito Federal. México (DF): 55, 22 de marzo de 2002.

19. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Publica la SAGARPA norma oficial mexicana para controlar el uso de beta agonistas, como el clenbuterol, en la alimentación animal. México (DF): SAGARPA, 1 de marzo de 2002.
20. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Prorroga de la norma oficial mexicana de emergencia NOM-EM-015-ZOO-2002: especificaciones técnicas para el control del uso de beta agonistas en los animales. México (DF): SAGARPA, Agosto 28 de 2002.
21. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma oficial mexicana de emergencia NOM-EM-015-ZOO-2002: Especificaciones técnicas para el control del uso de beta agonistas en los animales. México (DF): SAGARPA, 2002.
22. Kuiper HA, Noordam MY, Van Dooren-Flipsen MMH, Schilt R, Roos AH. Illegal use of  $\beta$ -adrenergic agonists: european community. *J. Anim. Sci.* 1998; 76: 195-207.
23. Podesta A, Luppi A, Benatti I, Villani C, Montagnoli G, Martelli F. A source of false-negative results in clenbuterol analysis in tissues of veal calves. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 1998; 40: 27-32.
24. Merino GR, Rojas A, Molina J. A forensic ELISA test is suitable for screening and quantifying clenbuterol in tissue and serum samples from chickens. Abstracts from International Poultry Scientific Forum; 2003 Enero 20-21; Atlanta (Georgia) USA: 39.
25. Posyniak A, Zmudzi J, Niedzielska J. Screening procedures for clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 2002; 224087: 1-7. En prensa.
26. Sauer MJ, Pickett RJH, Limer S, Dixon SN. Distribution and elimination of clenbuterol in tissues and fluids of calves following prolonged oral administration at a growth-promoting dose. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1995; 18:81-86.
27. Smith DJ. The pharmacokinetics, metabolism and tissue residues of  $\beta$ -adrenergic agonists in livestock. *J. Anim. Sci.* 1998; 76: 173—194.

28. Meyer HIID, Rinke LM. The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *J. Anim. Sci.* 1991; 69: 4538-4544.
29. Neogen Corporation. Technical bulletin 5. Clenbuterol extraction procedures. Neogen Corporation 2002; 00:4.
30. Neogen Corporation. Clenbuterol Quantitative ELISA kit product 109710. Neogen Corporation, 2002:1-7.
31. Cristino A, Ramos F, Silveira MI. Control of the illegal use of clenbuterol in bovine production. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* 2003; 00:1-6.
32. Asociación Americana de Soya. Informes de mercado. Asociación Americana de Soya. México (DF): 19 de mayo de 2002:1.