Revista Electrónica de Veterinaria REDVET - ISSN 1695-7504
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet

Vol. VI, Nº 4, Abril 2005 –
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040405.html

Primer reporte en Cuba de *Leptospira interrogans serovar Tarassovi* y caracterización clínica epizootiologica en focos de Leptospirosis porcina

First reporter Cuba of leptospira *interrogans serovar Tarassovi and* clinical and epidemiological characteristics of swine leptospirosis foci.

Dra. Dania Feraud Tercilla*; Dra. en C. V. María Antonia Abeledo García** *Universidad Agraria de la Habana. **Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. La Habana. Cuba

Contactar:
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/dfero

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de focalidad natural que teniendo en cuenta el tipo de explotación, manejo, medidas protectivas y vigilancia epidemiológica podemos controlarla. De ahí que el objetivo de nuestro trabajo halla sido el determinar las características clínico-epizootiologicas en focos activos de leptospirosis en cerdos e identificar los serovares presentes a través del aislamiento. Para lograrlo nos propusimos dos experimentos, uno relacionado con la caracterización epizoótica de dos focos de leptospirosis porcina, en los que se presentaron índices de aborto de 5 y 6 % respectivamente. El otro experimento abordó el aislamiento e identificación de cepas de leptospira encontrada en los focos, la caracterización general de las unidades, investigación serológica relacionada con la enfermedad y diagnostico diferencial fueron actividades contempladas en el experimento, así como las descripciones de aislamiento y circulación del serovar *Tarassovi* por primera vez en Cuba en animales autóctonos, esto ocurrió sin grandes alteraciones de los indicadores productivos y reproductivos.

Palabras claves: Leptospirosis-aborto-Tarassovi-porcino-aislamiento

SUMARY

Leptospirosis is a zoonotic disease occurring in natural foci, and could be controlled, taking into consideration: type of exploitation, protective measures and epidemiologic surveillance. The objective of this work is to determine the clinical and epidemiological characteristics of swine leptospirosis in disease active foci, and identify the serological varieties by means of isolation. Two experiments were developed, one related with the epidemiological characterization of swine leptospirosis foci, in which abortion occurred on 5 and 6% respectively; the second experiment was about the isolation and identification of *Leptospira* strains from the foci, general characterization of the piggeries: serological research related with the disease and its differential diagnosis, were activities within this experiment. Descriptions of isolation and circulation of the *Tarassovi serovar,* for the first time in Cuba, occurred without alterations of the productive and reproduction indexes.

Password: Leptospirosis-abortion-Tarassovi-swine-isolation

INTRODUCCION

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, que es causada por espiroquetas del género Leptospira, que morfológicamente y fisiológicamente son iguales, pero en sus reacciones serológicas y su comportamiento epidemiológico son diferentes (Stoilova y Papivanova, 1999)

Es una enfermedad de focalidad natural, lo que posibilita que un gran número de animales de vida libre sean portadores de ella. Los humanos son infectados ocasionalmente a través de contacto directo o indirecto con los animales o sus secreciones y aguas contaminadas a través de abrasiones en la piel o mucosas (Hernández y Espino, 1996; Pastoret, 2000b; De Aguirre, 2001).

La epizootiología de la leptospirosis porcina es muy complicada porque el cerdo puede ser infectado por cualquiera de los serovares patógenos que componen los diferentes serogrupos de la especie *interrogans*. Afortunadamente, estudios serológicos realizados por diferentes autores han demostrado que solamente un reducido grupo de serovares está presente en los brotes de leptospirosis porcina (Fuentes y col, 2001).

Investigaciones serológicas y bacteriológicas realizadas en otros países (Bolin y Cassells, 1990; Batra y col, 1992; Aldorevich, 2001; Fuentes y col; 2001), han reportado que las serovariantes más comunes en el cerdo son: *pomona, canicola*, *tarassovi, icterohaemorrhagiae, copenhague, hardjo; grippotyfosa, panama, bratislava, shermani, pyrogenes, australis y wolffi*. La permanencia de estos serovares en el cerdo es variable, siendo generalmente influenciada por factores tales como: tipo de explotación, medidas de higiene y desinfección, inmunización, adquisición de nuevos animales, convivencia con animales de otras especies como perros, gatos, bovinos, ovinos, presencia de fauna nociva (roedores), entre otros (López, 2001; Economices, 2000).

Entre los principales reservorios de los diferentes serovares tenemos los roedores (*icterohaemorrhagiae*), cerdos (*pomona*), bovinos (*hardjo*), perros (*canicola*), mapaches (*autumnalis*). En los Estados Unidos los cerdos parecen ser reservorios del serovar *bratislava* (OPS, 1992; Dhaliwal y col, 1999).

En la Leptospirosis al igual que en cualquier otra infección, el mecanismo de transmisión del agente tiene sus características. Los animales infectados eliminan por la orina al medio exterior gran cantidad de Leptospiras las cuales tienen la capacidad de infectar a los animales susceptibles (CDC, 2001).

La bacteria generalmente muere al estar expuesta al calor, la luz, detergente o desinfectante pero puede permanecer viable en aguas alcalinas o en suelo húmedo (Mims y col., 1993). Una vez penetrado en el organismo estas van a sangre y ahí se multiplican provocando la bacteriemia la cual en la mayoría de las especies se manifiesta con fiebre y otros síntomas generales. En el caso de los cerdos, la enfermedad transcurre casi siempre de forma asintomática; siendo el aborto el síntoma principal para todas las especies (Villegas de Olazábal, 2001).

El serovar *Tarassovi* se encuentra diseminado en todo el mundo y se ha descrito entre los más frecuentes en el cerdo asociado a grandes afectaciones tales como abortos, mortinatos, etc. (Levett, 2001). Sin embargo, en Cuba no se había aislado posiblemente debido a las dificultades que ofrece el diagnóstico bacteriológico.

La confirmación de un foco de Leptospira está dada por la demostración de una dinámica de anticuerpo o el aislamiento (Taylor ,1995), siendo la microaglutinación el método serológico mas empleado, el cual representa la técnica de referencia en todos los laboratorios especializados (Holzman y Conory ,1992; Mazzonelli y Dorta, 1995).

OBJETIVO GENERAL

Determinar las características clinico-epizootiológicas en focos activos de Leptospirosis en cerdos e identificar los serovares presentes a través del aislamiento

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características de la Leptospirosis.

La Leptospirosis es producida por una bacteria perteneciente al género Leptospira. El agua contaminada con la orina de animales infectados es una fuente excelente de infección para los mamíferos incluyendo al hombre. Los gérmenes pueden entrar al organismo a través de la piel o mucosas (Pérez y col, 1990)

Se le conoce también con el nombre de enfermedad de Weill, fiebre canícola, ictericia espiroquética, fiebre del cieno, fiebre de los arrozales, fiebre de los cañaverales, enfermedad de los porqueros (Pastoret, 2000a).

Es una enfermedad de amplia distribución mundial, más frecuente en las áreas rurales, sin embargo, a partir de 1997 varios brotes han ocurrido en la región metropolitana en los Estados Unidos (Valina y col, 1999)

El hombre se infecta por contacto directo o indirecto con animales infectados. Afecta a adultos jóvenes y la incidencia pico es en verano y comienzo del otoño. El contacto indirecto con animales infectados, a través del agua o el suelo contaminados con orina infectada, es más común en la infección humana que el contacto directo con los animales. La exposición ocupacional (granjeros, veterinarios, trabajadores de mataderos) y la exposición recreativa (campantes, nadadores) son frecuentes. En todo el mundo, las ratas constituyen la fuente más común de infección humana, seguidos por los perros, bovinos, roedores, mamíferos salvajes y gatos (Gangadhar y col, 2000)

2.2 Características del agente etiológico.

En el proceso de evolución, las Leptospiras, como muchos otros microorganismos, han pasado de la forma de vida libre a la parásita. Schüffuer en 1938, fue el primero en expresar la idea sobre posibles adaptaciones de algunos serovares de Leptospira, en animales de determinadas especies. Esta teoría ha sido argumentada por varios autores (Ratnam ,1995; Da Silva y col, 1995 y Shang y col, 1996).

El género Leptospira presenta una estructura fina en forma de espiral con un grosor de 0.1µm y una longitud entre 6 y 20 µm, se caracteriza por un enrollamiento de la espiral primaria y son helicoidales. Los giros tienen 0,2 a 0,3 µm de diámetro global y 0,5 µm y en medios de cultivo líquidos generalmente presenta ganchos en ambos extremos. Su cuerpo está formado por un cilindro protoplasmático helicoidal, dos filamentos axiales y una envoltura externa formada por tres o cinco capas que rodean todo el microorganismo. Entre la envoltura externa y la membrana citoplasmática se encuentran dos filamentos axiales independientes y cada uno se inserta por un extremo subterminal de forma opuesta al cilindro protoplasmático (Gutman, 1983).

Es un agente que requiere de humedad ambiental así como ph entre 6 y 8 y temperaturas bajas (no más de 30°C y no menos de 24 ° C) para sobrevivir. La desecación los destruye así como los cambios de pH y temperaturas (Birchard y Sherding, 1994).

El Sub Comité Internacional de Taxonomía de la OPS – OMS (1968) ha clasificado a Leptospira por sus diferencias antigénicas en dos grandes grupos, uno patógeno denominado *interrogans* y otro saprófito*, biflexa.* Estos a su vez poseen numerosos serovares. El serovar representa en sí la unidad taxonómica principal.

Los serogrupos (18), primeros en agruparse en 1966 contenían 124 serovares, pero cada día aumentan los serovares de acuerdo al número de aislamientos que se han clasificado (Myers, 1985).

Es necesario profundizar en las investigaciones para definir las relaciones afines entre serogrupos y reagruparlos ya que es importante en el estudio serológico (Myers, 1985).

El género Leptospira contiene varios grupos biológicos que se diferencian desde el punto de vista genético o fenotípico y ambos incluso. Por el momento es necesario seguir recopilando información en la medida que el grupo de expertos las informe y mantener una adecuada actualización (Ratnam, 1995).

Según Bergey's (1998) Leptospira está clasificada:

Reino Procaryotae.
División Gracilicutes.
Clase Scotobacteria
Orden Spirochaetales
Familia Leptospiraceae
Género *L. interrogans*
L. biflexa

Esta clasificación fue ratificada en el Curso Internacional de Diagnóstico de leptospirosis efectuado en la Habana (WHO/FAO, 2001).

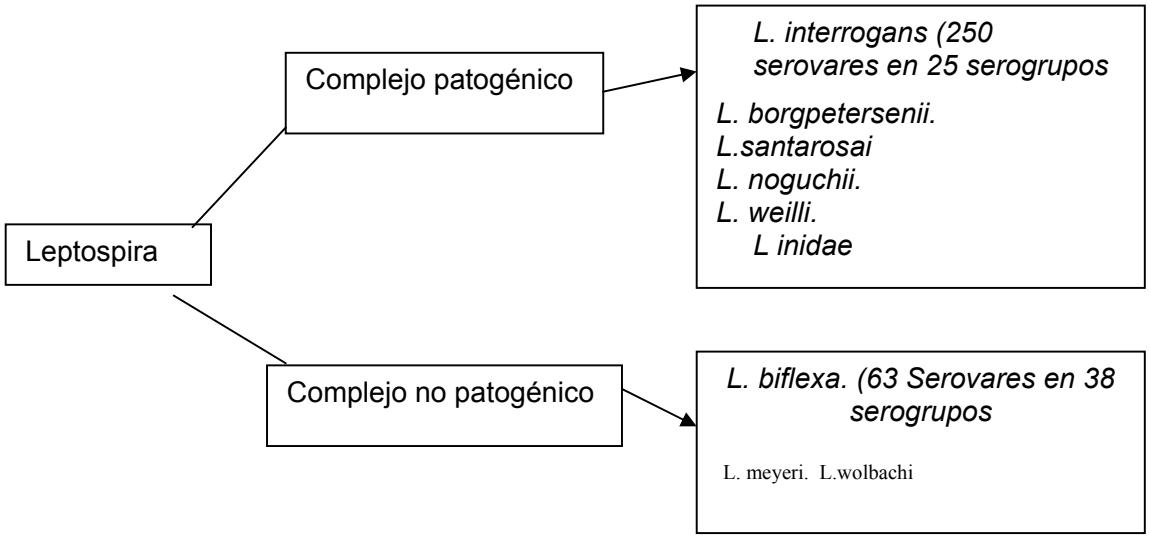
Según LeFebvre (1999), una reciente valoración sobre los reportes de Leptospira del Comité de Taxonomía la agruparon en dos grupos *L. interrogans* con 23 serogrupos y *Leptospira biflexa* con 37, agrupando más de 200 serovares.

De acuerdo a la respuesta inmune que se desarrollan contra cepas de Leptospira estas han sido clasificadas según la Organización Mundial de Microbiología en los siguientes serogrupos:

Australis (12 serovares), auntumnalis (14), ballum (3), bataviae (9), butembo, canicola (13), celledoni (2), cynopteri (2), djasiman (3), gripotyphosa (6), hebdomadis (17), icterohaemorrhagiae (18), javanica (12), panama (4), pomona (7), pyrogenes (14), ranarum (2), sejroe (20), shermani(2), sarmi y tarassovi (21).

El Comité Internacional de Bacteriología de la Unión Internacional de Microbiología y el Subcomité de Taxonomía de Leptospira (WHO/FAO, 2001) determinaron que estas bacterias se encuentran ubicadas en:

División: Procariontes
Clase: Schizomicetes.
Orden: Spirochaetales.
Familia: Leptospiraceae
Géneros: Leptonema
Turneria



Otros

Familia: Spirochaetaceae.
Género: Cristispira.
Spirochaeta
Brachyspira.
Brevinema.
Anguilina.
Serpulina.
Treponema.
Borrelia.

Clasificación genotípica.

La clasificación fenotípica de las Leptospiras se ha reemplazado por una genotípica, en la cual un número de genomoespecies incluyen todos los serovares de ambas *L. interrogans y L. biflexa.* Los estudios de hibridación del ADN también han confirmado la taxonomía del género monoespecífico *Leptonema* (Levett, 2001).

Esta clasificación molecular es problemática para los microbiólogos clínicos, porque es claramente incompatible con el sistema de serogrupos que ha servido bien a médicos y epidemiólogos durante muchos años. Hasta que métodos más simples de identificación basados en el ADN no se desarrollen y validen, será necesario para los laboratorios clínicos retener la clasificación serológica actual (Levett, 2001).

2.3 Epizootiologia de la leptospirosis

Leptospira interrogans puede afectar a numerosas especies produciendo la leptospirosis, pudiendo mencionar entre otras, ganado vacuno, caballos, ovejas, cabras, cerdos, perros entre los animales domésticos, aunque en la vida silvestre puede afectar y mantenerse como reservorios en venados, mofetas, mapaches, zarigüeyas, mangostas, reptiles, etc. (Puentes y col, 1990; Holzman y Conory, 1992).

Todos los serovares están distribuido por el mundo en focos naturales. Las Leptospiras parasitan a los pequeños mamíferos del grupo de roedores, insectívoros, rapaces, marsupiales, etc. Los focos naturales son los más antiguos debido a la gran variedad de serovares allí existentes y su asociación con determinados periodos o épocas se relacionan de una forma u otra con los animales domésticos. Los focos naturales más ampliamente distribuidos están en las zonas boscosas y asociadas con terrenos pantanosos, márgenes de los lagos y los valles (Ochoa y col, 2000).

Cuando se presenta en un rebaño, los índices de aborto pueden variar desde un 10% a un 30% observándose además nacimientos de crías débiles, poco viables o muertas y en esta etapa se elimina gran cantidad de leptospiras y los títulos de anticuerpos son altos, característicos de un proceso agudo (Acha y Szyfres, 2001).

Se considera como más común el serogrupo *icterohaemorrhagiae* para los cerdos; las ratas grises y del ganado vacuno, y *canicola* para los perros. *Tarassovi* y *monjakof*, también es frecuente en cerdos y rara vez en otros animales domésticos (Batra y col., 1992; Chappel y col ,1992).

De forma general los cerdos se infectan de los propios cerdos, apareciendo la infección cuando se introducen en el rebaño una nueva reposición (Robertson y col, 1991).

En el mecanismo de transmisión se destacan tres fases:

Salida del agente del organismo infectando al medio exterior. Esta fase es importante en la supervivencia del agente, la que depende de las condiciones ambientales que se encuentre ya que pH ácidos, alcalinos o la desecación la destruyen con facilidad, la segunda fase sería la permanencia del agente en el medio exterior y por último la tercera sería la penetración del agente en un organismo susceptible (Aaron, 1991).

Generalmente los reservorios eliminan el agente por largo tiempo; sin embargo, en los animales domésticos esta etapa es muy variada. Ndarathi y col (1991) observaron infecciones en humanos y terneros respectivamente a través de la leche. Hartman y col (1996) reportan la infección a través de artrópodos hematófagos, pero realmente estas vías no son las más comunes y no desempeñan gran papel en la circulación del agente. Ellis (1991) considera la vía sexual como la principal en la infección de leptospirosis; sin

embargo, estudios realizados por numerosos autores demostraron que el semen alberga leptospira cuando el animal infectado previa micción eyacula, ya que los testículos no tienen condiciones para la permanencia del germen (Thierman, 1990; Robertson y col, 1991).

En el organismo sano, las Leptospiras penetran por diferentes vías: la epidermis especialmente reblandecida por la humedad, también cuando esta ha sufrido lesiones y presenta excoriaciones o alteraciones de la misma; la mucosa de la vagina y la cavidad bucal, vías respiratorias y ocular (Anusz, 1992).

La vía alimentaria ocupa el primer lugar ya que la ingestión de agua o alimentos contaminados con leptospira constituyen la principal vía de contaminación (Everard y Carrington, 1992).

Se puede concluir, que como principal fuente de infección se encuentran los animales portadores aparentemente sanos, que eliminan leptospiras y contaminan el agua, los alimentos y el medio exterior, estas penetran a través de piel y mucosas constituyendo la principal vía de transmisión del agente. Pueden existir otros mecanismos de transmisión pero de significado secundario (Boza, 1990).

Constituye una fuente de infección importante la deposición en el medio ambiente de las secreciones y excreciones de los animales domésticos y salvajes. Entre los susceptibles podemos distinguir los hospederos accidentales, como el hombre y los reservorios estos hacen que esta enfermedad mantenga una focalidad natural.

Estos reservorios naturales se infectan con facilidad con un determinado serovar pero rara vez manifiestan síntomas, los roedores constituyen el reservorio más importante (González Gallo y col., 1990). Los ratones y las ratas son reservorios primarios produciendo en estos una infección renal crónica (Prescott, 1992).

Según Acha y Szyfres (1992) la infección en el hombre puede ocurrir al nadar, trabajar o jugar en aguas contaminadas. La infección con leptospira ocurre generalmente por contacto con aguas, suelos y alimentos contaminados con orina de portadores así como otras.

2.4 Patogenia

Ettinger y Feldman (1997) plantean que las espiroquetas pueden penetrar a través de la piel intacta siempre que esta haya estado humedecida previamente. Estas se difunden a través del punto de inoculación hasta el torrente sanguíneo donde se multiplican rápidamente. Se ha comprobado que de la penetración al torrente sanguíneo no sobrepasa los 20 minutos. En periodo promedio de 1 a 2 semanas pueden aparecer las manifestaciones clínicas.

Una vez que las leptospiras atraviesan las mucosas sanas o la piel lesionada, en el organismo se produce una diseminación sistémica y se localizan en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el ojo. Presenta un periodo de incubación de 5-20 días y puede acompañarse de afecciones del sistema nervioso y tracto digestivo (Muñoz, 2001).

Los gérmenes pueden ser encontrados en sangre de 4 a 10 días después de la infección, esta es la fase de leptospiremia que puede durar desde pocas horas a 7 días, esto provoca una respuesta inmune del organismo ante la presencia del agente, que se manifiesta por la producción de anticuerpos, los que aparecen al final de la primera semana de la infección lo que hace que los microorganismos se desplacen a tejidos para refugiarse de los altos niveles de anticuerpos. Principalmente se localizan en riñones, hígado, especialmente en los túbulos renales y a nivel de hepatocitos. La presencia en los túbulos renales de las formas leptospirales determina la fase de leptospiruria de duración variable en las diferentes especies (Fuentes y col ,2001).

2.5 Manifestaciones clínicas.

En los animales domésticos las manifestaciones clínicas son variables, por ejemplo, en el perro, la enfermedad se puede presentar de dos formas: ictericia y anictérica (Aldorevich, 2001).

Los animales domésticos más afectados son: bovinos, porcinos y equinos. En todas las hembras provoca el aborto, otras manifestaciones clínicas dependen del serovar infectante así como la especie animal afectada (Economides, 2001).

En cerca del 90% de los casos la infección se resuelven sin mayores consecuencias en el hombre, pero si las bacterias se multiplican en el hígado pueden producir hepatitis, ictericia y hemorragias; en los riñones; uremia y en el líquido cefalorraquídeo y humor acuoso, meningitis aséptica y hemorragias conjuntivales o esclerosis. El cuadro clínico depende en alguna manera del tipo de Leptospira involucrada (Aldorevich, 2001).

Generalmente la enfermedad dura desde unos pocos días hasta tres semanas o más, pero el restablecimiento en casos no tratados puede durar varios meses. Las infecciones pueden cursar asintomáticas. Los casos de muerte se debe principalmente a la insuficiencia hepato – renal, síndrome de insuficiencia respiratoria o arritmia por afecciones del miocardio (Meslin y col, 2000).

En bovinos, comúnmente la manifestación de infección de leptospira es el aborto el que se presenta en el último tercio de la gestación observándose el feto generalmente en estado de autolisis y con íctero y puede aparecer, además, disminución de la producción láctea, fiebre, íctero y hemoglobinuria. Se ha comprobado que alrededor 30% de las vacas gestantes abortan (Batra y col, 1990).

En el equino no es común la manifestación de leptospirosis pero cuando se presenta, cursa con uveítis en el 56% de los casos, aunque también puede presentar abortos (Wright, 2001; Shapiro y Prescott, 1990).

En los perros en ocasiones cursa de forma subclínica y cuando aparece la clínica generalmente se manifiesta con fiebre, anorexia, vómitos, hepatitis y signos de hemorragia (Muñoz, 1999).

La leptospirosis canina es frecuente aunque la incidencia es variada. La leptospirosis provocada por el serovar canicola es la más común en esta especie seguida por *Icterohaemorrhagiae, Pomona* y *Gripotyphosa* pudiendo provocar manifestaciones clínicas y subclínicas en esta especie. Se puede manifestar con elevadas temperaturas, vómitos, trastornos musculares y nefritis, pudiendo ocurrir la muerte del animal. Otro signo relacionado con la leptospirosis canina son los de tipo nerviosos asociados con procesos degenerativos de los riñones y se mantienen hasta un año eliminando el agente a través de la orina (Kondratenko y col, 1997).

En los ovinos y caprinos la leptospirosis tiene menos frecuencia que el bovino y el cerdo, las características de manifestación son similares al bovino y los serovares más frecuentes son *Pomona* y *Ballum* (Ellis, 1991).

2.5.1 Leptospirosis en cerdos.

Las investigaciones han demostrado que los cerdos de todos los grupos etarios son susceptibles a la leptospirosis y las manifestaciones clínicas, dependen de la edad y la categoría (OPS, 1992).

La duración del periodo de incubación de la leptospirosis de los cerdos no siempre se logra determinar porque generalmente los síntomas no se manifiestan y los altos niveles de anticuerpos se presentan y coinciden con la etapa de eliminación de leptospira. Diversos autores consideran que el periodo de incubación oscila entre 2 hasta 14 días. Puede aparecer una hipertermia ligera y variada en la piara, que en algunos casos cursa de forma inadvertida (Marshall, 1995).

La ictericia y la hemoglobinuria que caracterizan a la leptospirosis en la mayoría de las especies domésticas, en los cerdos no son síntomas característicos, aunque en los fetos puede observarse ictericia aunque no podemos asegurar que sea en todos los casos (Cardoso, 1996).

En el cerdo, la enfermedad puede causar graves pérdidas económicas porque afecta los índices reproductivos, ocasionan reabsorciones embrionarias, camadas con pocos lechones, abortos, mortinatos y lechones que nacen débiles o muertos (Fuentes y col, 2001). Su presentación depende de los serovares circulantes, tipo de explotación, medidas higiénicas, frecuencia de desinfecciones, inmunización, flujo zootécnico, convivencia con otras especies; así como la presencia de la fauna nociva (Moles y col., 1996).

El síntoma más común reportado por varios autores (Bolin y Cassells, 1990; Muñoz, 1999) es el aborto y se considera que cuando la infección ocurre entre los 55 y 78 días de gestación, la probabilidad de que ocurra el aborto es alta, otros periodos antes y después no siempre ocurre el aborto ni nacimiento de crías débiles. Malajov y Alejin (1990) atribuye particular relevancia a las afecciones provocadas por . *Pomona, Canicola y Tarassovi.*

Hudson (2001) considera que la enfermedad en la especie porcina cursa con un periodo largo subclínico solo detectado por la presentación de abortos y algunas cerdas abortan sin signos aparentes de la enfermedad.

El aborto ocurre en el último tercio de la gestación, la camada puede estar formada por cerditos poco viables, otros muertos y algunos momificados (Moles y col, 1996).

Según Shapiro y Prescott (2001) la enfermedad puede cursar mucho tiempo de forma subclínica, hasta que comienzan a presentarse los casos de aborto que generalmente ocurren entre dos y tres meses de gestación en la cerda y en todas las especies en el último tercio. Luego del aborto la hembra no presenta signos de enfermedad, algunos fetos pueden permanecer vivos por poco tiempo.

Los datos sobre cambios anatomopatológico también son diversos (Bolin y Cassells, 1990). Se describen en fetos y crías coloraciones ictéricas así como hemorragias en el tejido subcutáneo, hemorragias en el epicardio y mucosa gástrica, además de nefritis intersticial. Este último aspecto es común en la leptospirosis asintomática, observándose también con glomérulo-nefritis hemorrágica (Da Silva y col., 1995).

2. 6 Diagnóstico.

Para llegar a conclusiones correctas, el diagnóstico de la leptospirosis requiere de la combinación de una serie de parámetros entre los que se pueden definir el estudio clínico epizootiológico, estudio serológico, estudio bacteriológico y examen anatomo patológico incluyendo la histología (Gratzek y col, 1995; Dhaliwal, y col, 1999).

Para obtener muestras adecuadas se hace necesario conocer las fases de la enfermedad, reconocerlas e instrumentar el diagnóstico serológico teniendo en cuenta la dinámica de anticuerpos (Farr, 1995; Economides, 2000).

Para el diagnóstico de esta entidad en la fase leptospirémica, es recomendable en la primera etapa del estadio febril, realizar hemocultivos o realizar inoculación en animales de laboratorio. Las reacciones serológicas por lo general son negativas en esta etapa (Farrar, 1997).

Generalmente, al final de la primera etapa (leptospirémica) existen niveles de anticuerpos detectables por las diferentes técnicas serológicas empleadas en el diagnóstico de Leptospirosis (Feraud y col, 1991; Lomar y col, 2000)

En la fase leptospirúrica, que coincide con la máxima producción de anticuerpos, las leptospiras están refugiadas en órganos y de forma intermitente son expulsados al exterior a través de la orina, pudiendo en esta etapa aislarse de órganos y orina de forma directa en medios de cultivos o realizando inoculaciones de suspensión de estos órganos u orina en animales de laboratorio, pudiendo observarse en examen directo de las suspensiones de órganos y excreciones corporales. Esta observación se realiza en campo oscuro donde se pueden visualizar por sus movimientos característicos (Brem y col, 1999).

Hudson (2001) recomienda para el diagnóstico de la leptospirosis en animales, combinar la clínica con la confirmación del examen de laboratorio apoyando su teoría en que las infecciones en bovinos con *Pomona* se pueden detectar por la disminución de la producción láctea que esta provoca, además que presentan anemia y hemoglobinuria. Corrobora este autor, que lo más práctico es, que al observar estos signos se comprueben con la demostración de la dinámica de anticuerpos.

Robertson y col (1991) recomiendan el test de Elisa en el diagnóstico de la leptospirosis canina; mientras que Bernardine y col (1993) utilizaron productos de degradación del fibrinógeno (FDP) en investigaciones caninas con la finalidad de valorar trastornos de la coagulación y considera como valores normales 10 seg. /L.

2.6.1 Diagnóstico serológico.

Numerosos métodos han sido propuestos por diversos investigadores para el diagnóstico de la leptospirosis en los animales y el hombre (Hernández y col, 1990).

La prueba de aglutinación microscópica (MAT) se emplea para detectar anticuerpos leptospirales en el suero, identificar los aislamientos de Leptospiras y clasificar cepas, además de servir de base como técnica de referencia para evaluar otro método serológico. Esta técnica generalmente detecta anticuerpos pasada la primera semana de infección y alcanza los títulos máximos a la tercera o cuarta semana post infección (Polit y col, 1991).

Con posterioridad los títulos pueden persistir durante meses e incluso años. Los serovares que se utilizan como antígenos en la técnica microscópica deben conservarse en medio de cultivo líquido y mantener cultivos de reserva de cada serovar en medio semi sólido.

Las cepas de trabajo se deben mantener entre 28 y 30°C, con una densidad de 0.5 en la escala turbimétrica de Mcfarland, esto corresponde con concentraciones del agente de 120 a 150 unidades por campo; se debe leer en microscopio de campo oscuro con objetivo 10X o 20 X y oculares de 10X o 15 X sin cubreobjeto (Venugopal y Ratnam, 1992).

Los cultivos que se emplean como antígenos deben ser controlados periódicamente por la prueba de aglutinación microscópica frente a antisueros homólogos de referencias para verificar su sensibilidad. Las cepas con poca carga de microorganismos y con auto aglutinación no deben ser empleadas en el diagnóstico (Dorta de Mazzonelli, 1996).

Las cepas deben ser cultivadas en medios nuevos cada 14 días y comprobar diariamente su concentración, pudiendo influir en el diagnóstico, emplear cepas con baja concentración. Las interpretaciones pueden ser negativas (sin aglutinación), + cuando el 25% de las cepas están aglutinadas; ++ el 50% están aglutinadas, +++ el 75% se encuentran aglutinadas y solo unas pocas se observan libres; 100% de reacción corresponde con ++++ y no se observan Leptospiras libres o en movimiento (Falves y col., 2000).

En la MAT se utilizan generalmente cultivos vivos de Leptospiras de diferentes serogrupos, la cantidad de cepas a emplear en el diagnóstico varía en dependencia del objetivo de la investigación. Por lo general en las áreas donde se conoce la circulación del agente y que se mantiene la vigilancia epizootiológica relacionada con esta enfermedad, se reduce la batería de antígenos para facilitar el trabajo (Edwards y col, 1990; Duarte y col, 2002).

Es necesario tener en cuenta que con el uso limitado de antígenos no siempre se logra diagnosticar la infección de forma correcta, ya que pueden estar presentes otros serovares no incluidos (Vankataraman, 1992).

Ettinger y Feldman (1997) entre otros, plantean que la prueba de MAT es el método serológico más adecuado para el diagnóstico de leptospirosis en animales.

Diferentes pruebas para el diagnóstico han sido empleadas. En la detección de anticuerpos se han utilizado pruebas de aglutinación macroscópica, aglutinación microscópica, hemoaglutinación, inmunofluorescencia, ELISA y aglutinación en látex (Tepstra y col, 1998).

Independientemente del método que se emplee, siempre se debe tener en cuenta el ciclo de la enfermedad, ya que en una piara donde comiencen a aumentar los índices de aborto entre 10-30%, generalmente, al investigar la masa básica, si se corresponde con una infección de leptospira, los niveles de anticuerpos son muy altos (Malajo y Alejin, 1990; Cisneros y col, 1996).

2.6.2 Diagnóstico bacteriológico.

El diagnóstico bacteriológico consiste en el examen directo en campo oscuro y el cultivo en diferentes medios líquidos y semi sólidos, con suero de conejo o albúmina bovina en concentraciones entre 6 y 10% y Tween 80, pudiendo utilizarse para ello diversas muestras: orina, sangre, leche semen, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso,

contenido estomacal, vísceras, agua, suelo, etc. Las muestras deben ser tomadas con cuidado para no añadir contaminantes. Cada una de estas tienen sus regulaciones para ser tomadas y lograr el aislamiento del agente (Myers, 1985).

Los fetos deben enviarse completos y cerrados, de esta forma evitamos agregar contaminantes, se debe tener una información de circulación del agente, ya sea por estudio serológico, aumento del índice de aborto, examen microscópico positivo etc., lo que debe incrementar la probabilidad de lograr el aislamiento (O'Neil y col, 1991).

Según Everard y Carrington (1992) para lograr el aislamiento a partir de muestras de sangre estas deben ser tomadas con anticoagulante y jeringuillas estériles en el periodo febril, preferiblemente en los primeros días y repetir en más de una ocasión. Se tomarán pequeñas muestras inoculándose de 1 a 2 gotas por tubos los que serían más de uno por muestras. El líquido cefalorraquídeo debe ser tomado en la primera semana de la enfermedad (Heath y Johnson, 1994).

La muestra de orina se tomará, pasado 10 días aproximadamente del proceso infeccioso teniendo en cuenta la especie y sexo. Bolin y Cassell, (1990) considera que en todos los casos se puede auxiliar de diuréticos para forzar la micción. De forma práctica en todas las especies se tomarán las muestras a partir de micciones espontaneas, despreciando la primera parte de la micción y recogiéndola en tubos estériles y efectuando lo más rápido posible la siembra. Si el cultivo por algún motivo demora las muestras de orina deben ser diluidas en solución salina tamponada para evitar la acidez (Bolin y Cassell, 1990).

Según Hudson (2001) la obtención de orina libre de agentes contaminantes es muy difícil pero se pueden utilizar diferentes procedimientos con vista a lograr los aislamientos deseados como son:

a) Emplear métodos de diluciones consecutivos hasta cinco diluciones 10^{-1} a 10^{-5}.
b) Utilizar medios de cultivo que contengan antimicrobianos como pirimidina fluorinada; 5-fluorouracil; sulfato de neomicina; furazolidona.
c) Colocar discos de sensibilidad de 5 mg en los tubos de cultivos.
d) La orina o sus diluciones pueden ser filtradas por membranas 0,45 o 0,22 µm de porosidad.

Las vísceras pueden proceder de animales pequeños o grandes. En el primer caso el animal puede ser trabajado directamente en bacteriología donde se evitaría la contaminación secundaria. Este material puede ser tratado con mezclas de neomicina y furazolidona durante una hora. Posteriormente se realizan diluciones consecutivas y se cultivan cada una de las diluciones en dos tubos de cultivos (Venugopal y Ratnam, 1990).

Otros líquidos corporales y órganos pueden recibir este tratamiento de cultivo en dependencia del grado de contaminación (Ruiz, 1999).

Las muestras de agua y suelos deben tomarse en frascos estériles, el agua debe tener el pH entre 6.0 y 8.0 y el suelo ser húmedo. Si el agua está transparente se procesa directamente y se cultiva (Myers, 1985).

El agua turbia y el suelo se filtran para eliminar el material grueso y se pueden emplear membranas de filtros milipores 0.45 µm, este procedimiento no excluye la leptospira saprófitas por lo que se hace necesario realizar pruebas biológicas en este tipo de muestra. (Feraud y col, 1991).

Se pueden emplear medios sólidos, principalmente con fines investigativos, y purificación de cepas, no siendo frecuente en el diagnóstico por su falta de eficacia y no llegan a ser métodos idóneos para este propósito. Las leptospiras crecen hacia el interior de la placa, descienden, crecen en la profundidad y hay que depositar en la placa el 70% de la capacidad con el agar invertido y sellada para que mantenga la humedad y no pierda sus características (Ratnam, 1995)

Para realizar la prueba biológica se hace necesario utilizar 5 ó 6 hámsters o cobayos de 21 días de destetados. Se les inocula entre 0.5 y 1 mL de la muestra por vía intraperitoneal. Los días 1, 3, 5 posteriores a la inoculación se extraen por punción cardiaca pequeñas cantidades de sangre y se realiza un hemocultivo en medio líquido y semisólidos. Se realizan observaciones diarias para detectar síntomas de la enfermedad durante 21 días. Posteriormente se sacrifican los que sobreviven a esta fecha, realizándose el cultivo en medios líquidos y semisólidos de uno de los riñones, empleando la técnica descrita en animales pequeños. (Candelo de Arriojas, 1996).

Para la detección de formas leptospirales se han empleado inmunoperoxidasa, inmunofluorescencia directa y técnicas de reacción en cadena de la polimerasa e hibridación. Así como técnicas de cortes histológicos, microscopia electrónica y utilización de anticuerpos monoclonales (Binder y Mermel, 1998).

2.6.3 Diagnóstico anatomopatológico.

En la especie bovina el hígado es el primer órgano afectado, observándose un cuadro de necrosis cortical con zonas de congestión pequeñas, núcleos con pignosis y carioresis. En los riñones es típico la presencia de nefritis intersticial, en la zona cortical se pueden observar intensas áreas de necrosis hemorrágicas, desde petequiales a equimóticas, procesos degenerativos en los glomérulos con infiltración de linfocitos, células plasmáticas y fibroblastos. En animales gestantes, las leptospiras activamente invaden útero y feto causando edema y necrosis de los cotiledones (Rocha, 1998).

En ovinos y caprinos como en las otras especies puede producirse ictero en mucosa y grasa del cuerpo, y puede ocurrir hemólisis de la sangre lo que provocaría un tinte rosado de la orina, en el riñón se pueden observar hemorragias petequiales, las que

son frecuentes pudiendo observarse en el hígado áreas focales de necrosis que se corresponde con el periodo de cronicidad. Las membranas fetales presentan signos de edema y hemorragias (Cardoso, 1996).

En los perros se observa una marcada deshidratación en el cuerpo pudiendo presentar hemorragias petequiales en pleura, peritoneo, mucosas y riñón. Siendo características la nefritis intersticial y gromelular. Hepatitis crónica también se puede observar (Hartman y col, 1996).

El auxilio de técnicas histológicas completan el diagnóstico de esta entidad pudiendo poner en evidencia la presencia de agentes leptospirales con la ayuda de técnicas de coloración como impregnación argéntica de Levaditis donde pueden observarse las formas leptospirales de color carmelita (Ratnam, 1995).

2. Capitulo II PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Experimento 1 Caracterización epizoótica de dos focos de leptospirosis porcina.

El estudio clínico-epizootiológico incluye además de la caracterización clínica un análisis integral de todos los factores que pueden influir en el proceso epizoótico y el comportamiento de los indicadores productivos y reproductivos (Thursfield, 1990).

Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis guardan relación con la especie y la edad, siendo aguda por lo general en los animales jóvenes de cualquier especie y con características especiales en los adultos, siendo el aborto la manifestación más frecuente (Estudillo,1995).

Como base para sospechar la presencia de una infección leptospirósica en una granja , sirven los síntomas clínicos, cambios anatomopatológico , indicaciones epidemiológicas y epizootiológicas , así como la presencia en algunos animales de anticuerpos en títulos bajos, estableciéndose el diagnóstico sobre la base de las investigaciones de laboratorio (Guidugli y col., 2000)

Objetivo.

Determinar el comportamiento de los principales indicadores productivos y reproductivos en dos focos de leptospirosis porcina.

3.1.2 Materiales y Métodos.

En dos unidades porcinas con antecedentes de presentación de abortos de causa desconocida, se realizaron las siguientes investigaciones:

- Características generales de las unidades
- Chequeo clínico diario de la masa por observación y termometría
- Diagnóstico serológico por el método de microaglutinación según NR 673.
- Diagnóstico serológico de Brucelosis por Rosa de Bengala a toda la masa según NR 586.
- Determinación de los índices reproductivos como Eficiencia técnica y económica, parto por hembra tamaño de la camada al nacer, y peso al destete.

La eficiencia técnica se calculó como la relación porcentual entre las cerdas gestantes y las cubiertas y la eficiencia económica como la relación porcentual entre los partos y las cubriciones realizadas.

- Determinación de los índices de morbilidad y mortalidad por categorías 6 meses antes y durante el período de duración de la enfermedad en el rebaño.
- Inspección de ambas unidades para detectar posibles reservorios y vinculación entre las mismas, así como entrada de animales en los seis meses anteriores a la primera presentación de signos de la enfermedad.

3.1.3 Resultados y Discusión.

Unidad 1

Es una unidad integral de ciclo cerrado donde existen cada mes como promedio 32 precebas, de las cuales 29 pasan a la categoría de ceba, y 5 se convierten en cochinatas. Algunas bajas se producen por concepto de sacrificios, ventas y muertes; la masa básica está compuesta por 42 reproductoras y 6 verracos (Tabla 1).

Tabla 1. **Movimiento de Rebaño promedio Unidad 1.**

	Antes	***Después***
Puerca	42	42
Verraco	6	6
Cochinata	5	5
Preceba	34	25
Ceba	29,3	24,6
Crías/mes	40	31
Muertes	5	6
Bajas	3	2

Las principales causas de muertes poseían diagnóstico de colibacilosis fundamentalmente con tratamientos hidratantes y de antibióticos en aquellos casos que se requerían. Sólo de aplicaban vacunas contra la Peste Porcina Clásica, según lo normado por el Instituto de Medicina Veterinaria.

En el chequeo clínico diario se observaron abortos sin otra manifestación clínica. Según Marshall (1995) generalmente en las piaras afectadas por Leptospirosis, aparece una ligera hipertermia en muchos casos imperceptible, como ocurrió en este caso que solo se observaron abortos sin otra manifestación, ya que la hipertermia no fue detectada.

En esta unidad se investigaron serológicamente para determinar anticuerpos contra Leptospira spp, 116 animales, de los cuales resultaron 81 reactores (69,82%). Los reactores presentaron títulos desde 1/100 hasta 1/102 400. La mayor prevalencia fue para el serovar *Tarassovi*. Las reacciones cruzadas fueron *Ballum* (19) *Pomona* (1) e *Icterohaemorrhagiae* (1) (gráfico 1).

Con relación a los índices reproductivos de esta unidad, la Eficiencia Técnica se comportó entre 85 y 93% y la Eficiencia Económica entre 56-60 %. El tamaño promedio de la camada estuvo entre 7 y 8,5 y su peso al destete entre 7,4 y 8,4 kg. (Tabla 2), seis meses después no se observaron alteraciones significativas en estos indicadores. Se observó en esta unidad un alto porcentaje de aborto sin clínica aparente (30%).

La morbilidad en crías oscilaba entre 3 y 6 con 1% de mortalidad en esta categoría. Entre 3 y 5 en precebas con un promedio de 2,6; y una mortalidad de 0,5. Igual ocurrió en la categoría de ceba (Tabla 3).

Como se puede observar no se encontraron alteraciones significativas en los indicadores evaluados y que puedan ser atribuidos a la enfermedad, excepto la presencia de un índice elevado de abortos (30%); resultados similares han sido señalados por otros autores que destacan que la Leptospirosis porcina puede cursar de forma asintomática, siendo el aborto el único signo que puede indicarnos la sospecha de la entidad (Hudson, 2001).

En la inspección a la unidad se encontró una alta proporción de roedores los que con facilidad podían ser observados desde cualquier punto, se emplearon trampas para su captura, pero fueron infructuosas, observaciones similares fueron reportadas por Moles y col (1996) en un foco de leptospira en la especie porcina donde reportaron casos de aborto en el orden del 12% algo inferior a los reportados por nosotros.

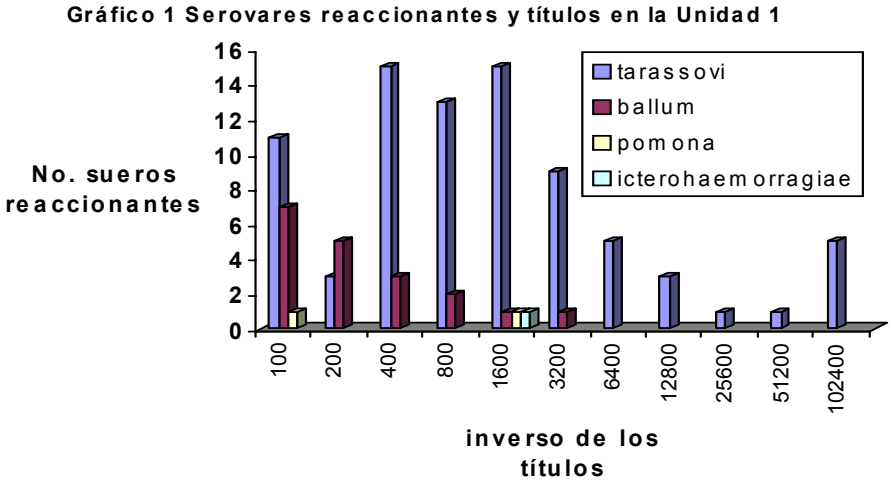


Gráfico 1 Serovares reaccionantes y títulos en la Unidad 1
No. sueros reaccionantes
16
14
12
10
8
6
4
2
0
tarassovi
ballum
pomona
icterohaemorragiae
100
200
400
800
1600
3200
6400
12800
25600
51200
102400
inverso de los títulos

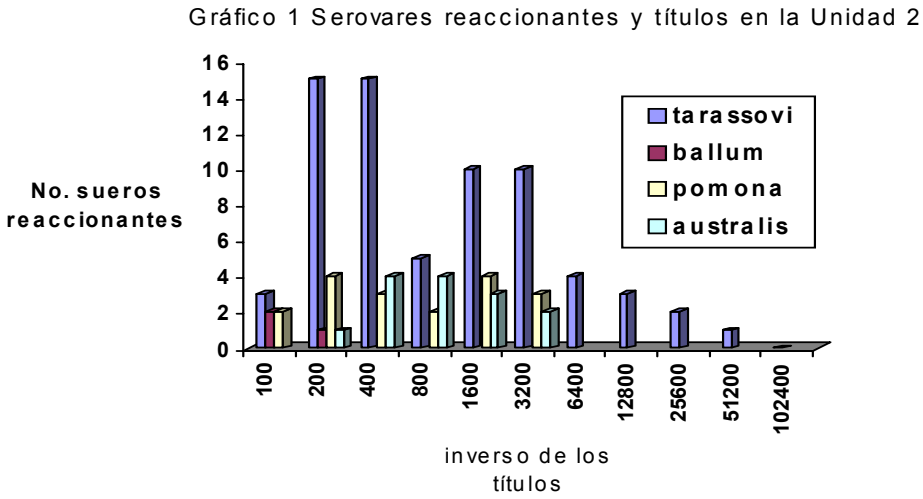


Gráfico 1 Serovares reaccionantes y títulos en la Unidad 2
No. sueros reaccionantes
16
14
12
10
8
6
4
2
0
tarassovi
ballum
pomona
australis
100
200
400
800
1600
3200
6400
12800
25600
51200
102400
inverso de los títulos

Tabla 2.. **Indices Reproductivos promedio unidad 1.**

	Antes	**Después**
EficienciaTécnica	85 – 93 %	80 – 89 %
Eficiencia Económica	56 – 60 %	50 – 58 %
Peso al destete (kg)	7,4 y 8,4	7 - 8
Abortos	0%	30%

Tabla 3. **Indices de Morbiletalidad/categorías en la unidas 1.**

	ANTES		DESPUES	
	Morbilidad (%)	Mortalidad (%)	Morbilidad (%)	Mortalidad (%)
Crías	3	1	6	3
Preceba	2,6	0,5	3	0,5
Ceba	2,6	0,5	2,5	0,5

Unidad 2

Esta unidad al igual que la anterior es de ciclo cerrado y en el movimiento del rebaño, existen 121 hembras (36 gestantes) y 7 verracos y como promedio mensual se incorporaban 8 cochinatas, 40 precebas, 31 cebas y se obtuvieron 52 crías. Las bajas por diferentes causas y muertes incluidas oscilaban en 11 (tabla 4).

Tabla 4. **Movimiento de Rebaño promedio Unidad 2.**

	Antes	*Después*
Pca	121	121
Vco	7	7
cta	8	6
Preceba	40	38
Ceba	31	29
Crías/Mes	52	47
Muertes	6	6
Bajas	5	6

En la unidad 2 se investigaron 128 animales obteniéndose 87 reactores para un 68% (tabla 5) con predominio del serovar *tarassovi* seguida de *pomona* (18) *australis* (14) y *ballum* (3), (gráfico 2).

El diagnóstico de Brucelosis resultó negativo.

Gratzek y col (1995); Cisneros y col. (1996); Da Silva (1996); Farrar (1997) en sus trabajos han demostrado la presencia de aborto en la cerda en el último tercio de la gestación sospechándose de un cuadro de Leptospirosis por la dinámica de anticuerpos lo que fue demostrado también en nuestras investigaciones.

Se midieron los índices reproductivos de Eficiencia Técnica que oscilaban entre 80 y 92% y la Eficiencia Económica 60 y 70%, durante el proceso descendieron ligeramente ambos índices a 70-80% y 50-60% respectivamente. El tamaño promedio de la camada fue de 7 y 8 y el peso al destete 7,5 y 8 descendiendo ligeramente en 7-7,5 y 7,4-7,7 respectivamente (Tabla 5). Se observó en esta unidad al igual que en la anterior, un alto porcentaje de aborto sin clínica aparente (33%).

Los índices de morbilidad y mortalidad por categorías 6 meses antes en crías, precebas y ceba se comportaban en 3 y 1,1% ascendiendo a 5 en crías durante el proceso manteniéndose igual las otras categorías (tabla 6).

Tabla 5. Indices reproductivos promedios Unidades 2.

	Antes	*Después*
Eficiencia .Técnica	80 y 92%	70 – 80
Eficiencia Económica	60 y 70%	50 - 60
Tamaño promedio camada	7 y 8	7 –7,5
Peso al destete (kg)	7,5 y 8	7,4 – 7,7
Abortos	0	33%

Tabla 6. Indices de Morbiletalidad/ categorías.

	Antes		*Después*	
	Morb /	Mortal	Morb /	Mortali
Crías	3	3	5	3
Preceba	1	1	1	1
Cebas	1	1	1	1

En la inspección a la unidad se detectaron igualmente un elevado número de roedores.

No existía vinculación directa o indirecta entre las dos unidades, ni se introdujeron animales 6 meses antes de la presentación de los casos.

- **Se encontraron altos índices de animales reactores en ambas unidades, sin diferencias significativas entre ellas.**

- La mayor prevalencia fue para el serovar *tarassovi* con reacciones cruzadas para *Ballum* (19) *Pomona* (1) e *Icterohaemorrhagiae.*

- **El incremento en el índice de aborto fue la única manifestación clínica observada.**

- Se encontró una elevada población de roedores en ambas unidades, pudiendo ser esta la fuente de infección para los cerdos.

3.2 Experimento 2 Aislamiento e identificación de cepas de Leptospira de focos de Leptospirosis porcina.

Investigaciones serológicas y de aislamientos realizados en otros países, han reportado que las serovariedades más comunes en el cerdo son: *Pomona, Canicola, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Hardjo, Gripotyphosa, Panama, Bratislava, Shermani, Pyrogenes, Australis, y Wolffi (*Banda y col., 1990, Chappel y col, 1992, Cisneros y col, 1996, Ettinger, 1997).

La permanencia de estos serovares en el cerdo es variable, siendo generalmente influenciada por factores tales como: tipo de explotación, medidas de higiene y desinfección, inmunización, adquisición de nuevos animales, convivencia con otras especie (perros, gatos, bovinos, ovinos), presencia de fauna nociva (roedores), entre otros (López, 2001).

Un aspecto que reviste gran importancia en la circulación de leptospira es la permanencia del agente en la población de roedores de la fauna silvestre, lo que provoca que siempre se tenga el peligro de ocasionar un proceso infeccioso en los animales en explotación. De ahí que el tener el control de los serovares circulantes sea de suma importancia. Otro aspecto a tener en cuenta es la utilización de estos serovares en la confección de vacunas (Meslin y col, 2000).

Objetivo.

Determinar e identificar cepas de Leptospira aisladas de focos de Leptospirosis porcina.

3.2.1 Material y métodos.

En dos unidades porcinas con sospecha de leptospirosis por diagnóstico serológico positivo por MAT, se tomaron muestras de orina a las reproductoras que presentaron aborto y sangre por punción de la vena ocular al total de la masa básica.

Se investigaron además fetos recién abortados a los cuales se les tomaron muestras de hígado, riñón, médula ósea, humor acuoso y contenido estomacal.

Todas las muestras se inocularon en medio Fletcher's y Korthof y se incubaron a 28ºC durante 30 días. Cada 4 días los medios de cultivo se observaron por microscopio de campo oscuro con objetivo de gran aumento en este caso de 20x ɑ 45x para comprobar si había crecimiento (NR 683, 1988).

Las cepas aisladas se sometieron a prueba biológica con la finalidad de comprobar el poder de virulencia, para ello se utilizaron 2 hámsters dorado sirio de 45-50 g por cada cepa y se les inocularon 0.5 mL por la vía intraperitoneal en concentraciones de $8x10^7$ cel/mL. (Myers, 1985, Cornide 1987).

3.2.2 Resultados y discusión

Se comprobó además el poder de invasividad y la supervivencia de las cepas inoculadas teniendo en cuenta el resultado de la prueba biológica, siendo mayor la invasividad en los casos que fue más rápida la muerte del animal.(Cornide, 1987).

Para determinar la antigenicidad se utilizaron 2 conejos de 3-4 Kg. de peso los cuales se inocularon con 0.5 mL por cepas por vía endovenosa en concentración de $75x10^4$ cel/mL realizando la extracción de sangre a los 21 días post inoculación En cada extracción se comprobaron los niveles de anticuerpos por MAT, frente a cepas de referencias (Cornide, 1987).

Las cepas aisladas adaptadas a medios líquidos se emplearon como antígeno frente a sueros hiperinmunes de referencias, con la finalidad de corroborar el poder antigénico de la cepa aislada. Los sueros utilizados procedían de Royal Tropical Institute (N.R 673).

En todos los casos se emplearon sueros o cepas referentes homólogas a las empleadas en el diagnóstico de la especie porcina: *Icterohaemorrhagiae, Canicola, Ballum, Pomona, Australis y Tarassovi.* Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

Se seleccionaron 20 animales (incluidos los casos de abortos) de la unidad 2 a los cuales se les realizó un estudio de dinámica de anticuerpos, para lo cual se tomaron muestras de sueros a intervalos de 14 –21 días, los cuales se investigaron por MAT según NR 673 (1988).

En el examen directo de orina de las puercas que presentaron abortos se encontraron tres muestras positivas de un total de 9 en la unidad 1 y 2 de 6 en unidad 2., lo que coincide con González Gallo (1990) y Bolin y Cassell, (1990), en la posibilidad de obtener un diagnóstico efectivo en la observación directa de la orina luego, de presentarse el aborto siendo una forma rápida y efectiva de definir un proceso epizoótico.

En el examen directo de las vísceras de los fetos, se observaron formas leptospirales en hígado, riñón y humor acuoso en un feto de la unidad 1. En la unidad 2 no se observaron formas compatibles con leptospira en dicho examen. Las posibilidades de observación de las leptospiras en las muestras es recomendada por Myers (1985) Ratnam, (1995) Homen y col (2001), siendo demostrado en nuestras investigaciones como otro posibilidad de diagnóstico.

De los cultivos realizados a los órganos se pudo obtener aislamiento en hígado fetal de la unidad 1 tanto en Fletcher como en Korthof (Tabla 7). En la unidad 2 no se logró el aislamiento.

Tabla 7. Resultados bacteriológicos.

	UNIDAD 1		***UNIDAD 2***	
	Investigados	Positivos	Investigados	Positivos
Examen directo de orina	9	3	**6**	**2**
Cultivos en Korthof Fletcher's	2 fetos H.A C.E H R M.O		3 fetos H.A C.E H R M.O	
RESULTADOS	2 Aislamientos		Ø	

Leyenda:

H.A = Humor acuoso.

C.E = Contenido estomacal.

H = Hígado.

R = Riñón.

M.O = Médula ósea.

Los medios de cultivos Korthof y Fletcher son empleados en la red de diagnóstico como los medios de referencias, el primero se recomienda su empleo en el mantenimiento de cepas de trabajos y preparación de antígeno, el segundo es recomendado en el almacenaje de las cepas., debido a su característica de semisólido, siendo ambos de gran utilidad en los laboratorios donde son utilizados (NR /673).

Herrera y col (1999) atribuyen al riñón el mayor porcentaje de aislamiento, no coincidiendo con nuestros resultados, ya que los aislamientos (2) fueron obtenidos en hígado como órgano de mayor estabilidad en los aislamientos y

éste órgano mantuvo la supervivencia de leptospiras observada en los cultivos en ambos medios. En otros órganos y fluidos corporales no se obtuvo aislamiento.

Las pruebas de comportamiento, supervivencia, virulencia, invasividad, antegenicidad, de las cepas aisladas resultaron positiva al tipo *interrogans* serogrupo *Tarassovi* lo que fue certificado por el centro de referencia de leptospira del CENEDI. Con referencia # 846.

En la prueba de supervivencia se observó que la cepa se encontraba en franca actividad de supervivcencia a la hora, 2 horas y 4 horas, coincidiendo con Cornide (1987), Ratnam (1995) y Herrera y col (1999) en que las cepas del complejo patogénico son capaces de mostrar supervivencia a partir de los 20 minutos de penetración en el organismo vivo, no siendo así en las no patógenas.

En los resultados de virulencia coincidimos con Myers (1985), Cornide (1987) y Ratnam (1995), en que empleando 0,5 mL de la cepa se puede presentar un comportamiento de media produciéndose la muerte entre 5 y 12 días. En nuestro caso la muerte se produjo a los 5 días.

Cifras de 1:12800 fueron logradas a los 21 días en la prueba de antigenicidad, considerándose esta cifra como buena según Cornide (1987).

La especie porcina puede ser infectada por un reducido grupo de serovares del grupo de las interrogans según plantea Fuentes y col (2001); lo que está en dependencia de determinados factores como la patogenicidad de la cepa circulante y predominio de esta así como susceptibilidad del individuo. El *serovar Tarassovi* está clasificado como de gran invasividad en el cerdo por López (2001) con lo que tuvimos la oportunidad de demostrar su presencia en nuestras investigaciones, al obtener la muerte de los Hámster dorados post inoculación a los cinco días (Cornide, 1987).

López (2001) en investigaciones bacteriológicas y serológicas de Leptospira, reportó que las serovariantes más comunes en el cerdo son *Pomona, Canicola, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae* entre otras lo que fue demostrado en nuestras investigaciones.

Por otra parte en la unidad 2 donde no se logró el aislamiento, la dinámica de anticuerpos realizada a 20 animales, confirmó la circulación del agente, ya que en todos los sueros investigados se observó un incremento de los títulos de anticuerpos en 4 diluciones o por encima (gráfico 3), según lo plantea la O.P.S
(1992) el aumento de niveles de anticuerpo de mas de 4 diluciones en la técnica de M.A.T, nos demuestra la presencia del agente en los animales afectados., resaltando en nuestros resultados la circulación de la cepa circulante.

Esto demuestra la circulación de esta cepa entre los cerdos, ya que ha sido establecido que el diagnóstico de un foco de Leptospirosis, puede realizarse tanto por aislamiento como por la demostración de la dinámica de anticuerpo (NR 673, 1988).

3.2.3 Conclusiones

1. Se aísla por primera en Cuba, *L. Interrogans serovar Tarassovi* en cerdos autóctonos.
2. Se demostró que cualquier tipo de cepa puede ser aisladas con los medios Korthof y Fletcher orientados en el diagnóstico.
3. El hígado fetal fue el órgano donde se pudo realizar el aislamiento de Leptospira.

3.3 DISCUSIÓN GENERAL

La Leptospirosis como hemos señalado anteriormente es una enfermedad que puede presentar diversas formas clínicas muy variadas incluso en una misma especie, lo que implica la necesidad de reforzar el diagnostico integral que se ha venido desarrollando; donde la combinación precisa del estudio clinico-epizootiologico y bacteriológico, se hace imprescindible para llegar a un resultado final (Banda y col, 1990;Meslin y col, 2000, Levett, 2001).

La confirmación de un foco de leptospirosis está dado por la demostración de un incremento de títulos de anticuerpos medidos a través de los métodos establecidos, o por el aislamiento de la cepa circulante (Marshall, 1995). Además, el diagnóstico bacteriológico, se hace imprescindible sobre todo cuando el diagnóstico serológico no define fehacientemente la presencia del tipo de leptospira circulante (Homen y col, 2001).
También es muy necesario para mantener la vigilancia epizootiológica relacionado con las cepas circulantes en el país, constituyendo este aspecto uno de los puntos que incluye el programa de vigilancia epizootiológica (Herrera y col, 1997).

De acuerdo a nuestros resultados, se logró el aislamiento de *L. interrogans serovar Tarassovi;* en una de las unidades investigadas que como se pudo observar en el experimento 1, tenía antecedentes de presentación de abortos sin otro tipo de manifestación clínica. Este hallazgo constituye el primer aislamiento de este serovar en cerdos en Cuba.

Se comprobó además que los métodos de aislamiento establecidos en el programa nacional son eficientes en el logro de aislamiento de cepas a pesar de lo exigente que esta sea (Puente y col., 2002).
Un aspecto importante relacionado con el aislamiento es la posibilidad de incluir esta cepa en las futuras fórmulas de los programas de vacunación y garantizar de esta forma la protección real de nuestra masa porcina.
Consideramos que las vacunas de Leptospirosis deben formularse por

especies coincidiendo en este aspecto con Aaron (1999) y Gainza (2002) que refieren la formulación incluso por provincias si el territorio es muy grande.

La presentación de la leptospirosis depende de los serovares circulantes, tipo de explotación, medidas higiénicas, convivencia con otras especies, etc. (Malajo y Alejin, 1990; Campagnolo y col 2000; Fuentes y col, 2001).

En este sentido Ferreira y col (1997) en un estudio comparativo del comportamiento reproductivo entre cerdas seroreactoras y negativas encontraron que las primeras tenían un mayor riesgo a dar lugar al nacimiento de cerditos muertos o débiles, pero no encontraron asociación con ningún otro indicador reproductivo evaluado. Por otra parte, Hudson (2001) plantea que la Leptospirosis en la especie porcina cursa por lo general con un periodo largo subclínico solo detectado por la presentación de abortos y la mayoría de las cerdas abortan sin signos aparentes de la enfermedad.

Según Acha y SzyFres (2001) en un proceso de leptospirosis porcina los índices de aborto pueden elevarse entre 10 y 30% coincidimos con este planteamiento ya que en las unidades investigadas se presentaron índices de abortos de 30% y 33% respectivamente. En las unidades porcinas el aborto no es un índice cuantificable de forma habitual, ya que el aumento de las camadas y lograr 2,3 partos por año, es el objetivo principal en nuestras unidades, por lo que la presencia de abortos conlleva necesariamente a un estudio del caso como tal.

A pesar de que la unidad 2 que presentó un porcentaje de abortos similar al de la unidad 1, no se pudo lograr el aislamiento, sin embargo se demostró a través de la dinámica de anticuerpos en sueros pareados, un incremento en más de 4 diluciones para el serovar *Tarassovi*, en los 20 animales evaluados, en los cuales se incluyeron aquellos que presentaron abortos, lo que nos hace coincidir con Ellis (1991), Marshall, (1995) y Acha y Szyfres (2001).

Tal y como ha sido planteado por varios autores, la especie porcina puede ser afectada por varios serovares siendo las más comunes: *Pomona, Canicola*, *Tarassovi, Icterohaemorrhagiae, Copenhague, Hardjo; Grippotyfosa, Panama, Bratislava, Shermani, Pyrogenes, Australis Y Wolffi*. Batra y col (1990); Bollin y Casells, (1990); Cisnero y col, (1996); Rocha, (1998); Duarte y col (2002). En nuestro caso a pesar de que se encontraron reacciones a *ballum*, pomona e *icterohaemorragiae* se demostró un predominio del serovar *tarassovi*, tanto en la unidad donde se logró el aislamiento como donde se encontró un incremento en los títulos de anticuerpos.

Dada la importancia de esta enfermedad y su carácter de zoonosis (Economides, 2000), y teniendo en cuenta que la misma puede cursar de forma asintomática en la mayoría de los animales, como se demuestra en este trabajo, se hace necesario efectuar un chequeo sistemático de la masa porcina, con el objetivo de detectar a tiempo y tomar las medidas necesarias, para evitar tanto su diseminación en el rebaño, como la afectación de las personas.

Aunque las fuentes de infección y las vías de transmisión son muy variadas (Anusz, 1992; Batra, 1992; Acha y Szyfres, 2001); ha sido señalado que de forma general los cerdos se infectan de los propios cerdos y que la infección aparece en el rebaño con la introducción de animales afectados (Thierman ,1990; Robertson y col, 1991).

Por otra parte, el papel de los animales de vida libre en la transmisión de la enfermedad ha sido bien documentado por Batra y col. (1992) Da Silva (1995); Hernández y col (1996); relacionándolo con la leptospirosis donde estos constituyen un eslabón fundamental en la transmisión.

Las dos unidades investigadas en este trabajo son de ciclo cerrado y no se constató la entrada de ningún animal en los 6 meses previos a la presentación de los casos, pero si se pudo detectan una gran cantidad de roedores, los que probablemente fueron los responsables de la entrada de la enfermedad en los rebaños; pues como se conoce, estos animales pueden albergar las leptospiras y eliminarla a través de la orina durante mucho tiempo (González Gallo, y col, 1990; Prescott, 1992; Fuentes y col, 2001).

El estar tan vinculado a los animales silvestres y constituir una enfermedad de focalidad natural, la vigilancia epizootiológica hace de esta enfermedad un arma fuerte de trabajo por lo que coincidimos con Hernández y Espino (1996) Pastoret (2000b) y Aldorevich (2001) que las secreciones de los animales salvajes hacen que en el medio especialmente el húmedo se comporte como fuente directa o indirecta ,de acuerdo al caso de leptospirosis, en nuestras investigaciones observamos en ambas unidades una alta población de roedores que con frecuencia hacían estancia en la unidad lo que adicionando a la no disponibilidad de vacunas antileptospirales complementan la presentación de la enfermedad.

Esto nos plantea la necesidad de mantener un buen control de roedores en las unidades porcinas debido al papel que estos pueden desempeñar en el mantenimiento y diseminación de la leptospirosis con peligro tanto para los animales como para el hombre.

3.4 CONCLUSIONES GENERALES

1. Se demuestra por primera vez en Cuba la circulación de Leptospira interrogans serovar Tarassovi tanto por detección de anticuerpos como por aislamiento

Los focos de Leptospirosis pueden ocurrir sin grandes alteraciones de los indicadores productivos y reproductivos.

3.5 RECOMENDACIONES

1. En todos los casos de abortos en cerdas se debe descartar la presencia de Leptospirosis por métodos serológicos y bacteriológicos
2. Mantener un chequeo serológico sistemático de la masa básica de las unidades porcinas.
3. Investigar el papel de *L. interrogans* serovar *Tarassovi* en el país tanto en el porcino como en otras especies.

Valorar el uso de una vacuna específica para los cerdos donde se incluyan los principales serovares circulantes.

3.6 Referencias bibliográficas

1. Aaron, D.C (1991): Manual of Clinical Microbiology pp554-559 Washington D.C American Society for Microbiology.
2. Acha, P y Szyfres, B (1992): Zoonosis de Importancia médica OPS
3. Acha, P. N.; Szyfres, B. (2001): Zoonosis y enfermedades transmisibles en el hombre y los animales. Tercera Edición. Volumen 1. Bacteriosis y Micosis. OPS.
4. Aldorevich de Aguirre Liliana (2001) Diagnóstico de Leptospirosis: muestreo e interpretacion de resultados serologicos.Revista del CEISA vol 1 n` 1 y 2 pp 5-7 Colombia.
5. Anusz, Z (1992): Epidemiological situation of Zoonosis in Poland Acta-Academiae-Agriculturae ac technicae-olstenensis Veterianria No.20 11-34
6. Banda, V.M., Loza Elizabeth, Mejía, P.(1990): Evaluación de adyuvantes para una bacterina experimental de Leptospira en bovinos. XII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias.
7. Batra, H. V.; Chanderanani, N. K.; Mandokhot, U.B. (1992): Prevalence of Leptospirosis en farm animals in Haryona. Haryona Agriculture University Hesar, Haryona 125004. India.
8. Bergey s (1998) Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition
9. pp-29-34.
10. Bernardine. S; Bizzeti. M; Buonaccorsi. A; (1993): Fibrinogen degradation products (FDP) in canine deseases. Objettivi Documenti Veterinare 14:6,31-36.
11. Binder, W.,Mermel, L.A.(1998): Leptospirosis in an urban setting. Case report and review of emergency infections disease. J.emerg.Med.16 (6)8511-6.
12. Birchard, S.J; Sherding, R.G (1994): Saunders manual of Small animal practice. W.B Saunders Philadelphia.

13. Boza.R. (1990): Leptospirosis anictérica. Análisis de una epidemia en Costa Rica-. Acta Médica Costarricense. V-1 33, 74-80.
14. Bolin, C. and Cassell, J. A. (1990) Isolation of leptospira interrogans serovar Bratislava from stillborn and weak pigs in Iowa. J.am Vet Med Assoc V-5 196: 1001-1604.
15. Brem, S; Gerhards.H; Wollawke. B; Meyer.P; Kopp.H. (1999): 35 leptospira isolated from the vitreous body of 32 horses with recurrent uveitis. Berl Munch. Tierarztl Wochenschr 112 (10-11) : 390-3.
16. Campagnolo, E.R; Warwick, M.C; Marx, H.L; Covart, R.T; Donnall, H.D; Bragg, S.L; Esteban,J. E; Alt, D.F; Tappero, J.W; Bolin,C.A;Ashtord, D.A.(2000) Analisis of the 1998 outbreak of leptospirosis in Missorin humans exposed to infected swine. J.Am. Vet. Med. Assoc Z16 (5): 676-82.
17. Candelo de Arriojas. Nelly (1996): Estudio Serológico de la Leptospirosis porcinA en el Estado de Araguaya. .Fondo Nac de invest agrop. Centro Nac de investigaciones Agropecuarias Fct 01-05-02-1.
18. Cardosos A. (1996): Leptospirosis en enfermedades infecciosas Cap.12: 209-215.
19. Center for diseases control and prevention (2001): Leptospirosis, general information [en linea]URL: Disponible en: http://www.cdc.gov.[20/07/01]
20. Cisneros, M.A; Ramires, R; Torres, J; Gavaldon, D; Rojas, N; Morilla, A.(1996): First report of Leptospira interrogans serovar Pórtland- vere islolation in Mexico from a swine leptospirosis outbreak. Proceeding of the 14 IPVS, Bologna, Italy 7-10 july.
21. Cornide Gonzalez Isabel Rosa. (1987) Leptospirosis en la proviincia de Guantanamo.Tesis de Candidatura a Doctor en Ciencias Biologicas. Academia de ciencia de Cuba. Instituto de Ecologia y Sistematica.
22. Chappel, R. J.; Ellis; W. A; Adler, B: (1992): Serological evidence for the presence of *Leptospira interrogans serovar bratislava* in Australia. Austral Vet. J. Vol 69, No5:119-20.
23. Da Silva, J.J; Netto, B.A; Lileambaum, W; Alvin, M.E; de Oliveira, A.V (1995): The hemorragic Syndrome of leptospirosis an experimental study in Guinea pigs. Res. Soc. Bras. Med. Trop. Jul-Sep 28(3) 169-77
24. De Aguirre Liliana (2001): Leptospirosis ocupacional en humanos. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. INV. Veterinaria. Maracay.
25. Dhaliwal, G.S; Murray, R.D; Dobson, H; Montgo Mery, J; Ellis, W.A; Baker, J.R.(1999) Presence of antigen and antibodies in Serum and genital discharges of heifers after experimental intrauterine inoculation with Leptospira interrogans serovar hardjo. Dpto of Veterinary clinical science and animal Husbandry. University of Liverpool. Res.Vet.Sci 60(2): 157-62.
26. Dorta de Mazzonelli, G.T (1996): Informe anual sobre Leptospirosis. Gelab. Senasa.
27. Duarte, Clara Luz; Herrera, Felipa; Delgado, Layda; González, Miriam; Goicochea, Nuria.(2002) Situacion de la leptospirosis en Cuba. X/// Congerso Panamericano. de Ciencias Veterinaria. La Habana, Cuba.Nov 18-22 pp 172
28. Economides P. (2000): Lucha contra las zoonosis en Chipre. Rev. Sci. Tech. off Int. Epiz. 19(03),725-734.
29. Edwards, CN; Nicholson, G.D; Hassell, T.A; Everard, C.O; Callender, J. (1990): Leptospirosis Barbados. A Clinical Study. West Indian Med. J. 39:27:34.
30. Ellis, W.A (1991): Diseases of Sheep. Edited by Martin, W.B; Ailken, JDJ Oxford. Blackwell Scientific publications: 60 (7) 78-80

31. Estudillo, C. J. (1995): Diagnóstico de las enfermedades microbianas de los bovinos en el trópico. Primera Edicion. México.pp 20-28
32. Ettinger, S.J; Feldman, C. (1997): Tratado de Med Vet enfermedades del perro y el gato. Edicion intermedica pp: 450-457.
33. Everard, C.O.R; Carrington, D.G (1992): Leptospirosis on the Africa continent proceeding of an ecc/std 3 research minting Harare. Zimbabwe. J. Trop. Med. H.G. 93 (2) , pp140-145
34. Falves, S.; Le febvre, R.; Probet, W. (2000): Aminoacid sequences of protein from Leptospira serovar Pomona. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz. Vol 5(4) 503-504. Jul/August.
35. Farr, R.W (1995) Leptospirosis. Clin. Infect .Dis V-3.21: 1-8.
36. Farrar, W.E (1997): Especies de Leptospira. Enfermedades infecciosas premios y práctica. 4ta Edición pp. 239.
37. Feraud, Dania y Perez, Nereida.(1990): Diagnóstico clínico y de laboratorio en un brote de Leptospirosis. XII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, La Habana, Cuba jul 31-4 agost.
38. Feraud Dania, Jimenez-Morffi, F, Rodriguez, J.L, Garcia, Norma. (1991(Resultados serologicos, bacteriologicos y anatamopatologico en un foco de Leptospirosis porcina. ALVEC `91 4to congreso de la asociacion de veterinarios especialistas en credos y 1er congreso de la sociedad Cubana de Veterinaria porcina, La Habana, Cuba 10-14 junio sp-8 pp58
39. Ferreira Neto, J. S.; Vasconcellos, S A; Ito FH; Moretti AS; Camargo CA; Sakamoto SM; Marangon, S; Turilli, C, Martini, M. (1997): Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae seropositivity and the reproductive performance of sows. Prev. Vet. Med 31 (1-2), 87-93.
40. Fuentes Marta; Heredia Carmen; Barbosa Delida; Fernández, J.G; Saballo, E;Carrera, E;Bordone, A; Rangel, Corina; (2001): Leptospira porcina. Detección de anticuerpos para los diferentes serovares involucrados en Venezuela.Lab. Biagram. UCLA Lisandro Alvarado, Venezuela. Disponible en http://www.ppca.com.ve/ [5/30/02]
41. Gainza Noemí (2002). Vacuna contra la Leptospirosis I conferencia internacional sobre leptospirosis y su control XIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias La Habana Cuba .Nov 18-22 pp 82.
42. Gangadhar, N.L; Rajasekehar, M; Smythe, L.D; Norris, M.A; Symonds, M.L; Dohnt, M.F. (2000): Reservoir hosts of leptospira Inidai in India. Rev. Sci. Tech off. Int. Epiz 19 (03) 793-799.
43. González Gallo J.A; Jiménez, R; Martínez (1990): Leptospirosis in pigs in Villa Clara province, Cuba Revista cubana de Ciencias Veterinarias , 20: 4 251-256; 15 ref
44. Gratzek, A.T; Kaswan, R.L; Martin, C.L; Champagne, E.S; White, S.L (1995): Aphathalmic cyclosporine in equine keratitis and keratouveitis II casos. Equine Veterinary Journal 27 (5): 325-333.
45. Guidugli, F; Castro, A.A; Atalla, A.N. (2000): Systematic reviews on Leptospirosis. Rev. Inst Med. Trop. Sao Paulo .Jan- Feb; 42(1) 47 (9).pp10-14
46. Gutman, Laura T. (1983) Leptospirosis Zinser. Tomo 2 Cap 53 pp 825-834.
47. Hartman, E.G; Brummelman, B and Dirkeen, A. (1996): Leptospirae of serotype lora of serrogup Australis isolated for the first time from swine in the Netherlands Tidjschr Diergeneeskd V13, 100:421-425.

48. Hernández, L; Pérez, Yolanda; Torruelles, A; Fernández, A; Amena, Aracelis (1990): Leptospirosis en animales de vida libre. En bovinos y venados. X// Congreso Panamericano de Ciencias Vet, La Habana, Cuba.
49. Hernández, D., Espino, R. (1996): Epidemia de Leptospirosis en Nicaragua. Resultados del diagnóstico y estudio clínico epidemiológico. Taller preparatorio del Congreso de Desastre. Junio 13. La Habana Cuba.
50. Herrera, F, Delgado, L., Duarte, C., González M.(1997): Serogrupos de Leptospira circulantes en diferentes municipios de las provincias Habana y Ciudad Habana. 2do Taller Internacional de Leptospira.
51. Heath, S.E and Jonhson, R.J (1994) Clinical Update. J.A.M.A 205 (11):
52. 206-212
53. Holzman, s; Conory, M.J (1992): Diseases parasites and survical of coyotes in south central Georgia, Journal of wildlife Diseases 28(4):
54. 572-580.
55. Homen, V.S.; Heinemann, M.V.; Moraes, Z. M.; Vasconcellos, S. A.; Ferrerira, F. ; Ferrerira, N.J. (2001): Epidemiologic studies of bovine and human leptospirosis en cattle. Brasilians amazonic. Rev. Soc. Bras. Med.Trop.34 (2): 173-80.
56. Hudson, D. B. DMV. (2001): Leptospirosis of domestic animals. Neb Guide g78-417a Disponible en: http//:www.jarn.vnl.edu/pubs/.[04/10/01]
57. Kondratenko, V.F.; Bunim, J.K.; Rodionova. N.S.; Danlikin, A.P.; Yagovkin, E. A. (1997): Natural focus of icterohaemorrhagiae leptospirosis in the lower Don floodplain and ways for its sanitation. Zh. Mikrobiol-Epidemiol-Inmunol V-3 N^0 5 38-41..
58. LeFebvre; R. (1999): Leptospirae. Veterinary Microbiology pp185-188. New York. Blackwell Science Publishers.
59. Levett, P.N. (2001): Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews. 14 (2): 296-326.
60. Lomar, A. V., Diament, D., Torres, J.R.(2000): Leptospirosis in Latinoamerican. Disdin North Am. Mar145 (1).23-29 VII-VIII.
61. López, Eneyda (2001): Diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Departamento de bacteriología. Sección de Inmunología bacteriana. Instituto Nacional de Higiene. Disponible en: http://www.todocarabobo.com/jornadaLRAE/index.htm [30/5/02]
62. Malajov, A.Y; Alejin, R.M. (1990) Leptospirosis del cerdo. Edic. Científico- Técnica.
63. Marshall, R.B (1995): A history of *Leptospira tarassovi* in New Zealand. Disponible en: http: //www infobrok.co.N2/tarass.htm.[04/10/02]
64. Mazzonelli; J; Dorta G. (1995): Evaluación de los resultados serológicos de ELISA y TR en Leptospirosis humana. Ann. Microbiolol. (Inst. Pasteur) 125 a: 125-126.
65. Meslin, F.X., Stohr,K, Heymann, D.(2000): Consecuencias de las zoonosis emergentes en el campo de la salud publica. Rev. Sci. Tech. off. Int. Epiz 19(1) 310-317.
66. Mims, C.A; Playfair, J.H.L; Roitt, J.M; Wakelin, D. And Williams, R (1993): Medical Microbiology. St Louis, Mosoby Yearbook Publishers.
67. Moles, L.P.; Urrutia, R. M.; Diosdado F.; Corona, e; Luna M. A.(1996): Serologic survey of swine Leptospirosis in the central area of México. Proceeding of the 14 IPVS Congress. Italy.
68. Muñoz, M. E. (1999). Leptospirosis: Revisión bibliográfica y análisis de la enfermedad en Costa Rica. Tesis de Licenciatura. Escuela de Med. Vet. Universidad Nacional Costa Rica. .Disponible en : http://cariari.ucr.ac.cr/gacetapc/Leptospirosis.html

69. Muñoz, Marta. (2001): Leptospirosis. Disponible en: htpp://www.dh.state.vaus/spanish/leptospirosis.html.universidad [24/09/01]
70. Myers, D. M. (1985): Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la Leptospirosis. Centro Panamericano de Zoonosis.
71. Ndarathi, C.M; D'Souza, C; Waghela, S (1991): The prevalence of Leptospisosis in Maasai Lives Lock in Kenya. Veterinary Research Labotarory, P.O. Kabete Kenya.
72. Norma Ramal 673 (1988): Diagnóstico de Leptospira. Ministerio de la Agricultura. Cuba.
73. Norma Ramal 586 (1982): Diagnóstico de Brucella. Diagnostico de Laboratorio.
74. O'Neil, K.M; Rickman, L.S; Nazarus, A.A (1991): Pulmonary manifestations in Leptospirosis. Reviews of Inf. Dis; 6(13) 13:705-9
75. Ochoa, J.E, Sanchez, A, Ruiz, J. (2000). Epidemiology of Leptospirosis in a Livestock production area of the Andes. Rev. Panamericana Salud Pública. 7(5)325-31.
76. O.P.S/ O.M.S (1968) Manual sobre metodos de diagnostico para Leptospirosis.Cut. Panam.Zonosis.Nota tecnica 9, 1-59
77. OPS/OMS MP (1992): El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. OPS Publicación Científica. No 538.
78. OPS/OMS (2002) Taxonomia and identification-thoretical background international course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis (13.5) Kit biomedical research. Ansterdam. Netherlands.
79. Pastoret. P. (2000 a): Actualización en el campo de la zoonosis. Rev ssci. Tech. Off. Int. Epiz 19(1), 13.
80. Pastoret, P. (2000 b): Actualización en el campo de la zoonosis Rev Sci. Tech Off. Int Epiz 19(1) 320.
81. Pérez Yolanda; Hernández, L;Turruelles, A;Mena Aracelis; Fernández, A;(1990): Leptospirosis en algunos animales de vida libre, cerdos y jutias. XII Congreso Panamericano de Ciencias Vet, La Habana, Cuba.
82. Polit, A; Middleton, H; Seers, J; and Basilone, C (1991): The influence of material antibody and age of calves on effective vaccination against *L. interrogans serovar hardjo*. Aust. Vet J 10(68).68: 269-303
83. Prescott, J.F (1992) Leptospirosis. Apuntes de curso Dpto of Veterinary Microbiology and Inmunology. University of Guelph. Canadá. pp1-20
84. Puentes Teresa;Seoane, G; Nuñez, E.;Fregel Nilda. (1990): Situación de la Leptospirosis en Cuba en las especies económicamente productoras. XII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. La Habana, Cuba.
85. Ratnam, S (1995): A Manual on Leptospirosis. A Hazardous disease of pet and dear.Tamil Nadu Veterinary and Animal Scienes University Madras 600007.
86. Robertson, I. D.; Hampson, D. J.; Mhonma, J.R.L.(1991): Study of Leptospirosis. Australian Vet Journal.68 (9): 291-293.
87. Rocha, T. (1998). A review of Leptospirosis in farm animals in Portugal. Rev. Sci. tech. off. Int. epiz. 17 (3): 699-712.
88. Ruiz. P.D. (1999) Enfermedad zoonótica en Venezuela. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Barquisimetro. Ven. P 44-61.
89. Shang- Es; Summers – TA; Haake-Da (1996): Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding Lipl 41, a surpace – exposed Lipotein of patogenic Leptospira Species. Infect.-Inmun. 64(6), 2322-30.
90. Shapiro, J.L; Prescott, J.F (2001): Equino abortions in eastern Ontario one to Leptospirosis. Canadian Veterinary Journal 40(10):350-351.

91. Stoilova,Y, Popivanova, N.(1999): Epidemiological studies of Leptospirosis in the Plovdiv region of Bulgaria. Folia- Med- Plodiv 41(4).73-79.
92. Taylor, D.J (1995) Pig diseases. Seventh edition pp 98-102. Wolfe publishing LTD.
93. Tepstra. J.;Hartskeerl, R.; Smith, L. y Korver, H. (1998): International course in Laboratory Techniques for the diagnostics of Leptospirosis. Inciensa, Tres Ríos. Costa Rica.
94. Thierman, R. B. (1990): Experimental leptospiral infection in pregnant cattle with organism of the Hebdomanis serogroup. J. Vet Res 43 (12):780-784.
95. Thursfield, M. (1990): Epidemiología Veterinaria. Editorial Acribia, España,43(12) pp: 177 - 232.
96. Valina, E. G., Alsati, L.E., Lercina, L. F.(1999): The etiological structure of Leptospirosis in agriculture animal in Columbia. Peoples, Friendship University. Moscow. Rusia.
97. Vankataraman, K.S (1992): Serodiagnosis of canine Leptospirosis by Elisa Indian Journal of Veterinary Medicine 20(12):137-38.
98. Venugopal. K and Ratman (1992): Inmunological response of guinea pigs to Trivalente Leptospiral vaccines. Indian. J. Anim Sci 62(10): 195-99.
99. Villegas de Olazaval, H. (2001) Leptospirosis. [Disponible en] Net- Salud, Costa Rica. http://wwwnet salud. sa.cr/ops/spanish/leptosp.htm. CIE-9 100 y CIE-10.A27.9.
100. WHO/FAO.DC. (2001). in Manual of Clinical Microbiology. Pp534-539. Washington DC. American Society of Microbiology.
101. Wright. B (2001): Leptospirosis and equine recurrent uveitis in horses. Mint Agriculture, Food and Affairs. Ontario. Canada. Disponble en: http://www.gov.on.ca/OMAFRA/English/livestock/horses/facts/00-065.html [04/10/01]

Trabajo recibido el 05.01.05 nº de referencia 040502_REDVET. Enviado por su autor principal, *dfero*, miembro de la Comunidad Virtual Veterinaria.org ®. Publicado en REDVET® el 01/04/05.

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org – http:/www.veterinaria.org y REDVET® http://www.veterinaria.org/revistas/redvet y se cumplan los requisitos indicados en Copyright

(Copyright) 1996-2005. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®, ISSN 1695-7504 - Veterinaria.org® - Comunidad Virtual Veterinaria.org® - Veterinaria Organización S.L.®