



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



División de Estudios de Posgrado

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE
LEPTOSPIRA *BORGPETERSENII* SEROVAR *HARDJO*
TIPO BOVIS, EN GANADO LECHERO EN MÉXICO.**

Tesis para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN DESARROLLO TECNOLÓGICO
EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Presenta:

José Alberto García Escalera

Asesores

Doctor en Inmunología

Manuel Jaime Tena Martínez

Doctor en Modelos Matemáticos

Daniel Val Arreola

MORELIA, MICHOACÁN MÉXICO, ENERO DE 2014

RESUMEN.

Leptospira Borgpetersenii serovar *hardjo bovis* (LBHB), es un patógeno adaptado al bovino, se asocia con un estado de portador renal prolongado para esta especie. La transmisión entre individuos es eficiente, con una incidencia de infección alta. La infección de *L. hardjo bovis* está asociada con falla reproductiva. Hasta ahora el PCR es la herramienta de diagnóstico más rápida y precisa para identificar este microorganismo. Con el objeto de determinar la presencia de *L. hardjo bovis* en México se utilizaron un total de 323 muestras de orina procedentes del mismo número de vacas en producción, las vacas están distribuidas en 20 diferentes establos ubicados en la zona centro y norte de México, el diagnóstico se realizó con la prueba de PCR. Los resultados de la prueba muestran el 32.5% de las vacas positivas, cuando se evalúa por establo el 60% de los hatos fueron positivos a la presencia de LBHB lo que afectó el desempeño reproductivo de la población en estudio. Los resultados del presente trabajo permiten determinar la presencia de *Leptospira Borgpetersenii* serovar *hardjo bovis* en México.

Palabras Clave. *Hardjo bovis*, *Borgpetersenii*, *leptospira*.

ABSTRACT

Leptospira Borgpetersenii serovar *hardjo bovis* (LBHB), is adapted to the bovine pathogen, is associated with prolonged renal carrier state for this species. Transmission between individuals is efficient with a high incidence of infection. Infection of *L. hardjo bovis* is associated with reproductive failure. So far the PCR is the fastest tool for accurate diagnosis and identify this organism. In order to determine the presence of *L. hardjo bovis* in México a total of 323 urine samples from the same number of cows in production were used, cows are distributed in 20 different herds located in the central and north of México, the diagnosis was done with PCR testing. The test results show 32.5% of positive cows, when farms were evaluated 60% of the herds were positive to the presence of LBHB, affecting the reproductive performance of the study population. The results of this study can determine the presence of *Leptospira Borgpetersenii* serovar *hardjo bovis* in México.

Keywords. *Hardjo bovis*, *borgpetersenii*, *leptospira*.

Contenido

Introducción	1
Situación Actual de la Producción de Leche en México.....	3
Leptospirosis en Ganado Bovino Productor de Leche	5
Factores Asociados a la Infección	7
Patogenia.....	9
Epidemiología de la Leptospira	11
Inmunidad	13
Leptospira borgpetersenii serovar hardjo tipo bovis	14
Signos Clínicos	15
Diagnóstico	15
Aglutinación Microscópica.....	16
PCR	16
PCR punto final.....	19
PCR en tiempo real o PCR cuantitativo.....	19
Profilaxis.....	20
Planteamiento del Problema.....	22
Hipótesis	23
Objetivo	23
Material y Métodos	24
Descripción de las zonas de estudio	24
Condiciones climáticas	24
Descripción del trabajo	25
Resultados y Discusión	27

DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	45
Literatura Consultada.....	46

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Datos de los hatos que integraron el estudio y el resultado del diagnóstico a <i>Leptospira hardjo bovis</i>	29
Cuadro 2. Valores obtenidos de la regresión logística considerando las dos regiones.....	31
Cuadro 3. Resultados de la regresión Logística de la Región Centro	32
Cuadro 4. Resultados de la regresión Logística de la Región Norte	33
Cuadro 5 Riesgo relativo (RR) y tasa de probabilidad (OR) del diagnóstico positivo de LBHB y el tamaño del hato en las dos regiones estudiadas.....	34
Cuadro 6. Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a LBHB y días abiertos del hato.	35
Cuadro 7. Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a <i>Leptospira</i> y región de estudio	35
Cuadro 8 . Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a <i>Leptospira</i> y el antecedente de muerte embrionaria.....	36
Cuadro 9. Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a LBHB y el antecedente de días abiertos individual.....	37
Cuadro 10. Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a LBHB y el antecedente de servicios por concepción	37
Cuadro 11. Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a LBHB y la tasa de desecho en el hato.	38
Cuadro 12. Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a LBHB y el nivel de producción de leche diaria en el hato	39

Introducción

La ganadería lechera nacional corresponde a una de las áreas del subsector pecuario en donde las asociaciones y las organizaciones de productores han dado pasos importantes para incrementar la producción nacional de leche.

Con este fin y de acuerdo con la información de comercio exterior publicada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en el periodo de de enero 2000 a abril de 2009, México importó alrededor de 1.72 millones de cabezas de ganado bovino.

La importación de ganado lechero desde enero 2000 hasta abril 2009 ha acumulado un total de 247,581. Las principales importaciones se realizaron desde Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos.

Es importante considerar que la importación de ganado incrementa el riesgo de introducción de enfermedades a nuestro país.

Una de las enfermedades bacterianas que hoy día llama la atención en los hatos lecheros, es Leptospirosis, la serovariedad *hardjo* parece ser el serotipo más frecuentemente reconocido en ganado bovino.

Estudios realizados en 44 hatos lecheros en EEUU, demuestran una prevalencia de leptospira *borgpetersenii serovar hardjo tipo bovis* en promedio del 57%. Por estados, California es el de mayor prevalencia con 91%, Washington/Oregón 55%, Ohio 27% y Florida 55%. (Bolin *et al.*, 2000)

Ellis, W.A (1994) señala que leptospira *hardjo bovis* es el serovar más común y el que más daño causa a la producción bovina en países como UK, Australia, Nueva Zelanda y Norte América.

La forma aguda, sub aguda y crónica de la leptospirosis bovina, causa bajas considerables en la productividad y rentabilidad. La presencia de muerte embrionaria temprana, abortos, muerte fetal, nacimiento de becerros débiles, mastitis, baja en la producción láctea y retraso en el crecimiento son algunos signos presentes. El impacto económico es sin duda muy alto en los hatos lecheros. (Heath S.E *et al.*,1994; Ellis W.A *et al.*, 1986)

El diagnostico preciso continua siendo una limitante pues las pruebas rutinarias como la microaglutinación no son capaces de diferenciar los serovares más comunes e importantes en el ganado bovino como son *hardjo prajitno* y *hardjo bovis*, pues aún cuando son genéticamente distintos son serológicamente indistinguibles por lo que se requiere de herramientas de diagnostico especificas como el PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para determinar con precisión el tipo de leptospira en animales infectados.

El objetivo del presente trabajo es determinar la presencia de leptospira *borgpetersenii* serovariedad *hardjo tipo bovis* en establos lecheros tecnificados en México, mediante el uso de la prueba de PCR Tiempo Real.

Situación Actual de la Producción de Leche en México.

En los últimos años, la producción de leche de bovino ha sufrido los estragos de la crisis económica mundial. Así como los altibajos en los precios de leche internacional, sobre todo de leche descremada en polvo. Estos precios han inferido de forma directa en los precios de leche nacional.

Los incrementos permanentes alcanzados en los últimos 10 años en la producción de leche, son consecuencia de mejoras en la tecnificación de la producción lechera en las regiones identificadas como altamente productoras, así como en la aplicación de técnicas en el manejo de ganado con mejores características productivas de razas especializadas en producción lechera y en el equipamiento de la explotaciones, propiciando una mayor inversión en el sector.

Otros factores que han propiciado el crecimiento de la producción ha sido la consolidación y expansión de las principales empresas lecheras nacionales y de organizaciones de productores integrados, que han incrementado su participación en el mercado de productos terminados, lo que ha representado un mantenimiento de los ingresos para sus asociados y, al ser partícipes del valor agregado generado en el proceso de transformación, principalmente de productos como yogurt, leches fermentadas, leches saborizadas, cremas entre otros. Desafortunadamente solo una pequeña parte de los productores lecheros en México tienen acceso a esta parte de la industria lechera participando como socios o proveedores de las plantas de procesamiento, logrando precios de venta de su producto (leche) a un precio competitivo.

La producción del sector productivo primario mexicano, se caracteriza por su heterogeneidad tanto productiva como económica que de cierta forma refleja la amplia distribución productiva en las regiones, encontrándose en una misma zona sistemas que cuentan con un desarrollo tecnológico avanzado, caracterizado por un desarrollo genético, biotecnológico, manejos computarizados de sistemas de producción y un amplio desarrollo de mercados, en coexistencia con numerosas unidades de producción familiar, que se caracterizan por un desarrollo tecnológico desigual y con poco desarrollo de mercado.

La diversidad de condiciones y formas de producir leche en este país, refleja una marcada posición contradictoria, ya que por un lado, se ha observado una demanda creciente por leche fluida de producción nacional, pero este incremento no se ha visto reflejado en los precios pagados al productor.

Volumen de Producción.

En los últimos 10 años la tasa media de crecimiento anual (TMCA) en la producción de leche en México ha presentado un incremento anual de 1.74%.

Las condiciones de integración y de tecnificación han sido relevantes en cuanto al desempeño de esta actividad ganadera, y mientras una parte del sector ha mostrado crecimientos como resultado de su consolidación y aprovechamiento de un mejor mercado para la leche y los productos lácteos; otros sectores productivos no lo han podido hacer, debido a la pérdida de competitividad como efecto del incremento en los precios de los insumos y por el propio rezago tecnológico y productivo.

Otro factor que influyo en los últimos 10 años en el desempeño de la ganadería lechera nacional, fue la reducción en la incorporación de reemplazos, muchos de ellos de importación, por el cierre de la frontera al ganado canadiense en 2003 y desde los EEUU en 2004, por lo cual se tuvieron que buscar alternativas en otros países para poder importar vaquillas de reemplazo, sin embargo en los últimos años este problema se ha visto resuelto por la apertura a las importaciones de vaquillas de los EEUU.

En la ganadería lechera, al igual que en otros sectores de la producción primaria y de la economía mexicana, se observa un fenómeno de concentración de la producción hacia productores o grupos de productores integrados verticalmente, que les permite participar del valor agregado generado en el acopio, transformación y comercialización de la leche y sus derivados, desarrollándose explotaciones con grandes concentraciones de animales que sin lugar a dudas requerirán de mejoras en los programas de manejo, alimentación y salud para poder mantener su productividad. (Coordinación General de Ganadería, México., 2010)

Leptospirosis en Ganado Bovino Productor de Leche

La leptospirosis ocasiona importantes pérdidas a la ganadería, principalmente debido a las alteraciones reproductivas como son infertilidad, abortos, mortinatos, nacimiento de becerros débiles que frecuentemente mueren al poco tiempo de nacer, además de la disminución en la producción de leche.

La leptospirosis crónica es la más frecuente en bovinos y es la de mayor impacto económico, si se compara con los efectos drásticos de la leptospira aguda.

Realmente es muy difícil determinar con precisión el costo ocasionado por la leptospirosis, pues depende de muchos factores como son: el precio de la vaca y del becerro, los costos de alimentación, la utilidad esperada y que no fue obtenida por la caída en la producción de leche y la interrupción de la gestación, todos estos factores deben ser considerados, no solamente en función de un animal si no del total de animales afectados. Adicionalmente, la infertilidad produce costos asociados como son los intervalos entre partos, la siguiente concepción y el desecho de las vacas por infertilidad, así como los costos por tratamiento de los animales infectados.(Ellis W.A 2004)

Es importante mencionar que debido al aspecto zoonótico de la leptospirosis, se requiere de una vigilancia sanitaria principalmente en el personal que labora en hatos de animales susceptibles.

Clasificación de la Leptospira.

El género leptospira pertenece a la familia *Leptospiraceae*, orden *Spirocheatales*, el que incluye a las especies *interrogans*, *biflexa* e *illini*, la última es considerada de situación taxonómica no determinada. Tradicionalmente la especie *biflexa* abarca las serovariedades de vida libre o no asociada a huéspedes y se ubican como saprofitas, mientras que en la especie *interrogans* están comprendidas aquellas serovariedades que se encuentran asociadas a huésped y son consideradas patógenas.

Recientemente se han reorganizado las serovariedades con la ayuda de las técnicas de biología molecular tomando en cuenta las semejanzas en el ADN, y de esta nueva clasificación surge la tipificación genómica en la que aparecen las geno especies *alexanderi*, *biflexa*, *borgpetersenii*, *fainei*, *inadai*, *interrogans*, *krischneri*, *noguchii*, *santarosai*, *weilii*, *mayeri* y *wolbachii*. Pero aún se menciona la denominación de *Leptospira Interrogans*, para incluir a todas aquellas que se asocian a huésped.

Factores Asociados a la Infección.

En la infección por leptospiras existen una serie de factores asociados que se deben considerar, siendo éstos tanto factores dependientes del agente etiológico, como factores dependientes del hospedador y del medio en el que se encuentra este hospedador.

Entre los factores dependientes del agente etiológico, el de mayor importancia es el relativo a la resistencia de las leptospiras fuera del hospedador. Las leptospiras son microorganismos bastante sensibles a las condiciones ambientales y los factores que determinan su supervivencia en el medio ambiente son: Temperatura templada (25°C), ambiente húmedo, pH neutro o ligeramente alcalino y presencia de materia orgánica. Por tanto, las áreas con lagunas, riachuelos y bebederos en general, que congregan a un gran número de animales, son las que más frecuentemente están implicadas en los focos de leptospirosis. Estos factores van a propiciar la existencia de una cierta estacionalidad en la presencia de la enfermedad, en relación principalmente con la época de lluvias. (Alonso-Andicoberry C *et al.*, 2001)

En lo que respecta al hospedador, los diferentes autores destacan como factores más importantes la edad, el estado inmunitario y la gestación. La edad de los animales parece estar en relación con el estado de portador renal. Algunos autores sugieren que la mayor incidencia de animales que excretan leptospiras en la orina aparece en terneros y que la mayoría de las vacas mayores de 3 años no son leptospiruricas. Respecto al estado inmunitario, se puede decir que, en general, el ganado expuesto previamente a la infección es refractario a la reinfección durante años, incluso cuando los niveles de anticuerpos circulantes apenas alcanzan un título de 1:10. Por último los datos disponibles nos muestran que el aborto por leptospiras se produce principalmente en los últimos estadios de gestación, entre los 6 y los 9 meses. Probablemente, la infección se produce varias semanas antes y el aborto tiene lugar 1 a 6 semanas después de la fase aguda en caso de serovares accidentales y de 4 a 12 semanas en el caso de *hardjo*, aunque los animales no suelen mostrar síntomas de infección aguda. En infecciones por el serovar *hardjo*, se han observado también abortos en otros estadios de la gestación, e incluso presencia de mortalidad embrionaria.

Respecto a los factores dependientes del medio, cabe destacar principalmente el manejo, que está en función de la aptitud, así como el tipo de la alimentación. Los casos de leptospirosis parecen ser más frecuentes y de peor pronóstico en las explotaciones de ganado lechero. Esto es debido, principalmente, a que el ganado bovino lechero se explota generalmente en sistemas intensivos que llevan a un mayor hacinamiento, lo cual favorece la transmisión. (Alonso-Andicoberry C *et al.*, 2001)

Patogenia.

Las leptospiras pueden penetrar por laceraciones en la piel, pueden atravesar las mucosas conjuntival, nasal, oral y genital. Esta capacidad de atravesar ciertas células ha sido demostrada *In vitro* con cierto tipo de células. Ya en el torrente circulatorio son distribuidas a todos los órganos, aunque tienen preferencia por los de tipo parenquimatoso. Inicialmente en el hígado es en donde se multiplican profusamente durante la primera semana de haber entrado en contacto con el huésped susceptible.

Durante este periodo se da una estimulación importante al sistema inmune. En los bovinos, las IgM se producen durante los primeros 10 días después de la infección y tienen la capacidad de opsonizar a las leptospiras favoreciendo la fagocitosis in situ, en órganos tales como el hígado, bazo, pulmones y ganglios linfáticos, lo que produce una eliminación importante de leptospiras, incluyendo las del torrente sanguíneo.

Esta fase se conoce como leptospiremica, es muy difícil de identificar clínicamente puesto que la fiebre y el decaimiento tienen poca duración. En animales jóvenes, se puede observar hemoglobinuria e ictericia y ocasionalmente la muerte.

El aborto, que es el dato clínico más importante y evidente, suele ocurrir a las dos semanas después del contagio de la vaca gestante; sin embargo, existe información que menciona que en algunos animales se ha presentado después de varias semanas de haber entrado en contacto con la bacteria.

Las leptospiras que llegaron al tejido renal se alojan en la zona que comprende la unión de la región cortical y la medular. Anteriormente se mencionaba que estas se ubicaban en la luz de los túbulos renales y de esta manera podían ser arrastradas con la orina hasta el exterior. Sin embargo, existen evidencias histológicas que confirman que pueden estar presentes tanto entre los espacios de los túbulos renales, como entre las células del epitelio tubular y en la luz de los túbulos. Aquí pueden permanecer por periodos largos, en el caso de los bovinos se han podido aislar después de 540 días de una inoculación experimental.

El diagnostico representa dificultades importantes que deben ser consideradas. En cualquier hato en el que haya vacas con actividad reproductiva existen fracasos que pueden ser provocados por una gran cantidad de causas que abarcan los aspectos anatómicos, fisiológicos, nutricionales e infecciosos entre otros. Dentro de las enfermedades importantes que se presentan con frecuencia en este país aparecen la brucelosis, rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea viral bovina, neospora y leptospirosis. Clínicamente la leptospirosis es difícil de diferenciar por la semejanza en la sinología y por no haber evidencias clínicas específicas, Se ha mencionado que ciertas serovariedades como *hardjo*, *pomona*, *grippotyphosa* y *portland-vere* ocasionan alteraciones en la conducta reproductiva de los bovinos que se caracteriza por infertilidad, que puede ser manifiesta por un incremento en los días abiertos y fracaso en la inseminación artificial y por abortos en cualquier tercio de la gestación.

Las manifestaciones clínicas en los bovinos por la infección de las serovariedades adaptadas son poco evidentes y por lo tanto de difícil diagnostico, ya que tiene un

curso crónico y con una frecuencia baja de abortos u otros datos; mientras que cuando la infección es ocasionada por una serovariedad incidental, puede aparecer bruscamente en forma de brote con un curso agudo y manifestaciones clínicas muy aparentes.

Epidemiología de la Leptospira.

Las características epidemiológicas de la leptospirosis son importantes para diseñar adecuadamente los mecanismos de prevención y control de la misma, la transmisión puede ser directa o indirecta.

El punto de partida en la epidemiología de la leptospirosis lo constituye el estado de portador renal asintomático de un bovino, ya que el principal medio de contagio es la eliminación de la bacteria por la orina. Así mismo, el contacto con sangre o fluidos corporales de un animal en fase aguda pueden ser la causa del contagio para un individuo susceptible. Las formas de transmisión directa incluyen la transmisión transplacentaria, la venérea y a través de la leche materna contaminada con la bacteria.

La contaminación directa a los humanos a partir de animales infectados es posible y corresponde a actividades de tipo ocupacional de los empleados de unidades de producción bovina, ovina y porcina principalmente, al respecto es conveniente comentar que el humano es un huésped incidental y que es el último eslabón en la cadena epidemiológica, además, la eliminación de leptospiras a través de la orina es muy corta, ya que puede durar de varios días a unas semanas solamente, lo que

implica que la transmisión de humano a humano e inclusive la contaminación del hábitat por personas, no es importante.

La transmisión indirecta se produce cuando un animal adquiere la leptospira a partir del ambiente que ha sido contaminado con la orina de un animal infectado. Las principales fuentes de infección en un ecosistema abierto son las aguas superficiales de los lagos, estanques, ríos. Algunos factores de riesgo muy importantes los constituyen la época de lluvias y en general las zonas de humedad.

Es importante señalar que esta bacteria puede sobrevivir varias semanas en zonas lodosas en una temperatura templada y un PH ligeramente alcalino.

Gran parte de la epidemiología de leptospira se entiende en función de las serovariedades adaptadas a un hospedador. Un huésped de mantenimiento es aquel que aloja a la leptospira estando infectado y que sufre la enfermedad en forma subclínica y al pasar a la forma crónica se transforma en un portador asintomático. Existen distintas serovariedades adaptadas a diferentes huéspedes y es la forma en que la leptospira se mantiene en la naturaleza a través del tiempo. Por lo tanto, en la leptospirosis ocasionada por una serovariedad adaptada al huésped de mantenimiento el cuadro clínico usualmente pasa desapercibido, consecuentemente resulta más difícil de realizar el diagnóstico clínico y se requiere del apoyo del laboratorio para confirmarlo. Serológicamente los huéspedes de mantenimiento, se caracterizan por manifestar títulos de anticuerpos menores.

En el caso de los bovinos se acepta que son leptospiras *interrogans* serovariedad *hardjo* tipo *prajitno* y la [leptospira](#) *Borgpetersenii* serovariedad *hardjo* tipo *bovis* las que están adaptadas.

Cuando una serovariedad diferente infecta a individuos de una especie que no es la de mantenimiento, generalmente ocasiona “brotes epidémicos” caracterizados por cuadros clínicos manifiestos y fáciles de identificar. Una vez que los animales se recuperan de la enfermedad, la serovariedad desaparece pues difícilmente se logra un estado de portador asintomático con cronicidad. En estos casos los títulos de anticuerpos detectados son más elevados.(Moles *et al.*, 2007)

Inmunidad.

Se cree que la respuesta inmune humoral es el principal mecanismo de defensa contra la leptospirosis. Los LPS (lipo polisacáridos) parecen ser el principal objetivo de los anticuerpos protectores puesto que la transferencia de la inmunidad pasiva se correlaciona con los niveles de anticuerpos aglutinantes anti-LPS. Sin embargo, no se sabe si la respuesta contra antígenos de leptospira, además de LPS también confiere protección. Trabajos recientes han contribuido a la comprensión de que la inmunidad contra leptospirosis no se limita a la respuesta humoral.

La inmunidad protectora contra *L. borgpetersenii* en bovinos es mediada por células, ensayos de inmunización en ganado bovino encontraron que la protección contra este serotipo esta correlacionada con las respuestas TH1 y no con títulos de anticuerpos aglutinantes. (Naiman BM *et al.*, 2002; Blumerman SL *et al.*, 2007)

Leptospira borgpetersenii serovar hardjo tipo bovis.

El bovino es el único reservorio de mantenimiento para leptospira *hardjo bovis* y la bacteria ha sido identificada en diferentes países, se asocia con un estado de portador renal prolongado con eliminación urinaria que dura en promedio 215 días (Barr, BC *et al.*, 1993) y que en algunos animales puede ser de por vida.(Bolin CA, 1992) Las leptospiras que llegan a los túbulos renales proximales, el tracto genital y la glándula mamaria parecen estar protegidos de anticuerpos circulantes.(Ellis WA, 1994) la bacteria persiste y se multiplica en estos sitios. El nivel de anticuerpos en el suero para *L. borgpetersenii* disminuye comúnmente a niveles no detectables en los animales persistentemente infectados por lo que hacer un diagnostico utilizando pruebas basadas en anticuerpos no son de utilidad.

El componente esencial del ciclo de vida del patógeno es su capacidad para producir persistencia renal. La leptospira causa una infección sistémica pero se elimina de todos los órganos excepto de los túbulos renales.(Athanzio DA, *et al* 2008; Nally JE, *et al.*, 2005) Los túbulos colonizados están densamente poblados con leptospiras que se agregan a los túbulos con una estructura de biopelícula, generando una excreción renal prolongada de la bacteria.

Los animales infectados son una constante fuente de contaminación y por lo general no muestran signos clínicos. La transmisión es eficiente, con una incidencia de infección relativamente alta. La transmisión de *L. hardjo bovis* puede ocurrir incluso en el útero, lo que resulta en becerros que nacen siendo portadores.

La principal fuente de contaminación y transmisión es la orina, las vacas infectadas que abortan también excretan leptospiras del tracto genital.

Signos Clínicos.

Los principales signos de infección por *L. hardjo bovis* están asociados con falla reproductiva como disminución de la fertilidad, muerte embrionaria temprana, afectando el intervalo entre servicios, tasa de preñez, días en leche e intervalo entre partos.

Diagnóstico.

Existen varias posibilidades de realizar el diagnóstico de laboratorio. La literatura menciona que con la observación de una muestra de orina al microscopio de campo obscuro pueden identificarse las leptospiras. Sin embargo, aunque se cuente con mucha experiencia es realmente difícil y no siempre es confiable. Otra opción es el aislamiento. Debe tenerse en cuenta que es un método laborioso y difícil pues la observación de los tubos inoculados con la muestra se realiza hasta por 6 meses para descartar el aislamiento en caso de no haber crecimiento de la bacteria. La Microaglutinación sigue siendo la técnica de laboratorio más utilizada para el diagnóstico. Recientemente se ha iniciado el uso de la PCR, siendo hasta ahora la herramienta de diagnóstico más rápida y precisa.

Aglutinación Microscópica.

La técnica utilizada tradicionalmente para el diagnóstico de leptospira es la aglutinación microscópica, consiste básicamente en enfrentar a los sueros problema con las serovariedades más frecuentes en la región. Normalmente se realizan diluciones séricas empezando con 1:50 y hasta llegar a la dilución más elevada en la que la aglutinación o desaparición del 50% de células se observe en el microscopio de campo oscuro, según lo describe tanto la OIE como la OPS. Realizar muestreos pareados con una diferencia de 2 a 3 semanas, es altamente recomendable y cuando se determina una diferencia de 4 diluciones entre el primero y el segundo o el cambio de un resultado negativo a uno positivo, presupone un diagnóstico de leptospirosis, (Moles, *et al.*, 2007) pero no siempre resulta adecuado para poblaciones en donde hay diferencias en el desafío por leptospira.

Las pruebas de laboratorio basadas en anticuerpos no permiten diferenciar entre los serotipos más comunes en el bovino, *L. hardjo prajitno* y *L. hardjo bovis* pues aun cuando son genéticamente diferentes, son serológicamente indistinguibles.

PCR.

Otras pruebas basadas en el diagnóstico molecular han sido desarrolladas en los últimos años para el diagnóstico de la leptospirosis. Como el género leptospira consiste en un grupo diverso de espiroquetas patógenas y saprófitas, se ha usado la clasificación basada en estudios de hibridación del ADN que ha servido para clasificar las 17 especies conocidas (Bharti A, *et al.*, 2003; Haake D, *et al.*, 2004; De

la Peña-Moctezuma A, *et al.*, 2001). De las especies patógenas se reconocen alrededor de 200 serovares, esta diversidad ha sido atribuida a las diferencias en la estructura y composición de los lipopolisacáridos especialmente en la variación de los carbohidratos, lo que refleja la diversidad antigénica entre especies de leptospiras patogénas. (Haake D, *et al.*, 2004; Xue F, *et al.*, 2009; Kaizumi N, *et al.*, 2010)

Leptospira spp posee una estructura de doble membrana compuesta por la membrana citoplasmática, el periplasma y la membrana externa (Xue F, *et al.*, 2009). En la membrana externa se han identificado diferentes proteínas con diversos grados de expresión en la superficie como lo son Omp11 (leptospiral outer membrane porin), LipL (leptospiral outer membrane lipoprotein) como LipL21, LipL36, LipL34, LipL41, LipL32 y proteínas Lig (leptospiral immunoglobulin-like proteins) entre otras (Kaizumi N, *et al.*, 2010; Ko A, *et al.*, 2009). Además, existen diferentes proteínas que están ubicadas en el espacio periplásmico como la proteína flagelar B (fla B) que se encuentra también relacionada con especies patógenas (Kawabata H, *et al.*, 2001; Lin M, *et al.*, 1997)

En los últimos años se ha evaluado la detección del genoma bacteriano por métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se han descrito diferentes iniciadores para su descripción, usando una variedad de genes como blanco de amplificación, incluyendo flaB (Kawabata H, *et al.*, 2001), LipL34 (Levett P, *et al.*, 2005), OmpL1 (Dong H, *et al.*, 2008), SecY (Ahmed A, *et al.*, 2009), Lig (Cerqueira G, *et al.*, 2009), gyrB (Slack A, *et al.*, 2006), entre otros.

En general las pruebas moleculares (PCR) para el diagnóstico de leptospira presentan alto poder discriminatorio, ofrecen resultados reproducibles de fácil y exacta interpretación.(Grave K, *et al.*, 1993; Natali M, *et al.*, 2010)

La PCR, es una técnica de biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de este fragmento original.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta eficacia, virus o bacterias causantes de una enfermedad. La técnica se fundamenta en la propiedad natural de los ADN polimerasas para replicar cadenas de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas, alternadas para separar las cadenas de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las cadenas de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente.

Hoy todo el proceso de la PCR esta automatizado mediante el uso del termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción.

Existen diversas versiones de la técnica de PCR, se han desarrollado técnicas para la identificación de especies de leptospira patógenas utilizando la técnica de PCR convencional (punto final) o el PCR tiempo real.

PCR punto final.

También conocido como PCR convencional permite visualizar, mediante una electroforesis, la acumulación de amplicones generados al final de un número predeterminado de ciclos, es una técnica cualitativa que puede producir un mayor número de falsos positivos por contaminación de las muestras.

PCR en tiempo real o PCR cuantitativo.

La principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presente en la muestra original, o identificar con una muy alta precisión muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de fusión. (Coleman WB, *et al.*, 2006) La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia (“quencher”), de tal forma que solo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del “quencher” y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando

Profilaxis.

Como lo mencionamos anteriormente, se han identificado dos tipos serológicamente indistinguibles, pero genéticamente distintos del serovar *hardjo*. *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* (tipo *hardjo prajitno*) está aislado principalmente de ganado vacuno en el Reino Unido (Ellis WA, *et al.*, 1986), mientras que *L. borgpetersenii* serovar *hardjo* (tipo *hardjo-bovis*) es común en las poblaciones de ganado en todo el mundo (Ellis WA, *et al.*, 1986; Brian M, *et al.*, 2001).

Las vacunas más utilizadas contra leptospirosis contienen células enteras inactivadas de *L. interrogans* serovar *hardjo* (tipo *hardjo prajitno*), *canicola*, *pomona* e *hicterohaemorrhagiae* y *L. kirschneri* serovar *grippotyphosa*. Estas vacunas pentavalentes proporcionan una protección adecuada contra la enfermedad causada por cada uno de los serotipos en la vacuna, excepto serovar *hardjo*. Es decir, no pudieron evitar el aborto, muerte fetal y la transmisión vertical de la infección cuando las vacas vacunadas fueron desafiadas con *L. borgpetersenii* serovar *hardjo* durante la gestación, y las tasas de infección para el grupo control y vacunado no mostraron diferencias. Estudios realizados por Bolin *et al.*, 2001; y Ellis *et al.*, 2000, que evaluaron una vacuna monovalente formulada con una cepa aislada de *L. borgpetersenii* serovar *hardjo* encontraron que esta vacuna previene la infección y la colonización del tejido después del desafío con cepas de *L. borgpetersenii* procedentes de USA o Europa. Los estudios de laboratorio y de campo han demostrado que estas vacunas disminuyen la incidencia de la infección, la duración y la intensidad de la excreción urinaria de la bacteria (Bolin CA, *et al.*, 1989; Brian M, *et*

al., 2001). La capacidad de estas vacunas para proteger contra el serovar *hardjo tipo bovis*, pueden reflejar diferencias por la cepa utilizada o las condiciones de cultivo utilizadas para la preparación de las vacunas. Estas diferencias pueden afectar a la calidad o el tipo de respuesta inmune inducida por cada vacuna disponible en el mercado.

Debido a que la inmunidad protectora para la leptospirosis es serovar específica, anteriormente se creía que la protección era exclusivamente humoral (Faine S, *et al.*, 1999). Mientras que los anticuerpos contra LPS (lipopolisacaridos) de leptospiras dan una protección pasiva en algunos modelos animales (Brian M, *et al.*, 2001) ganado vacunado contra el serovar *hardjo* con vacunas pentavalentes son vulnerables a la infección a pesar de la presencia de altos títulos de anticuerpos anti-LPS (Brian M, *et al.*, 2001; Bolin CA, *et al.*, 1989). Estos estudios fueron los primeros indicadores de que el anticuerpo anti-LPS no fue suficiente para la protección del ganado contra el serovar *hardjo* y evocó un nuevo examen del paradigma de que la inmunidad protectora es principalmente humoral. Ellis *et al.*, 2000, demostraron que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de bovinos vacunados con una *L. interrogans* serovar *hardjo* proliferaron in vitro en respuesta a los antígenos *hardjo*. Por lo tanto, es necesario que una vacuna protectora estimule este tipo de respuesta inmune (Faine S, *et al.*, 1999).

Actualmente en México existen vacunas monovalentes para la protección contra *L. borgpetersenii*, serovar *hardjo* con un nivel de protección capaz de evitar la replicación del patógeno y la excreción renal de la bacteria en los animales

vacunados. El reto es incrementar el uso de este tipo de vacunas una vez determinada la presencia de *L. borgpetersenii* en el ganado bovino en el país.

Planteamiento del Problema.

El constante incremento en el costo de los insumos necesarios para la producción y el estancamiento en los precios de venta de la leche reduce el margen de utilidad para las empresas de ganado lechero, lo que hace necesario incrementar el volumen de producción para mantener la rentabilidad, esto ha llevado a un crecimiento acelerado de las explotaciones lecheras que concentran grandes cantidades de animales para asegurar de esta manera el incremento en la cantidad de leche producida y vendida cada día, de igual forma el control de la salud en estas explotaciones representa todo un desafío debido a la gran cantidad de animales que interactúan con los patógenos que producen enfermedad, entre los que se encuentra leptospira que causa uno de los mayores impactos en la salud del hato y la productividad. La necesidad de elaborar programas de profilaxis específicos nos obliga a establecer un diagnostico preciso de los patógenos de desafío como en el caso de *L. borgpetersenii serovar hardjo tipo bovis* que se reconoce como el serovar más común como causa de leptospirosis en otros países y que hasta ahora no se ha identificado su presencia en México, por lo que se hace necesario establecer su diagnostico.

Hipótesis.

La tendencia de la industria lechera ha llevado a incrementar el tamaño promedio de los hatos de ganado productor de leche en los sistemas tecnificados y con ello al aumento en las tasas de morbilidad de las enfermedades infectocontagiosas debido a la gran concentración de animales. La determinación de la presencia de patógenos como *L. borgpetersenii serovar hardjo tipo bovis* en los hatos productores de leche en las diferentes regiones del país permitirá establecer programas específicos de prevención y control que seguramente tendrán un efecto directo en el mejoramiento de los índices reproductivos y la productividad de las explotaciones lecheras.

Objetivo.

Determinar la presencia de *L. borgpetersenii serovar hardjo tipo bovis*, en hatos de ganado lechero bajo sistemas de producción intensiva en el centro y norte de México.

Material y Métodos

Descripción de las zonas de estudio.

El trabajo se llevo a cabo en dos regiones del país que concentra las explotaciones de ganado lechero bajo condiciones intensivas de producción que son: Zona Centro y Norte de México.

Condiciones climáticas.

En México el clima está determinado por varios factores, entre los que se encuentra la altitud sobre el nivel del mar, la latitud geográfica, las diversas condiciones atmosféricas y la distribución existente de Tierra y agua. Por lo anterior el país cuenta con una gran diversidad de climas, los cuales de manera general pueden clasificarse, según su temperatura, en cálido y templado; y de acuerdo con la humedad existente en el medio, en: húmedo, subhúmedo y seco.

El centro del país presenta un clima templado con temperaturas promedio entre los 18 y 22° C y precipitaciones de 600 a 1000 mm en promedio al año.

El norte del país tiene condiciones extremosas de clima con temperaturas que fluctúan entre 0 y 40° C, en verano pueden alcanzar hasta 44°C, tiene regiones semidesérticas con escasas lluvias apenas entre 100 y 300 mm como media anual.

(Wikipedia. Org. Clima 2013)

Descripción del trabajo.

Para el desarrollo del trabajo se utilizaron un total de 323 muestras de orina procedente de vacas adultas en producción, con antecedentes de baja fertilidad (4 o más servicios de IA) o aborto temprano (<70 días), las vacas pertenecen a 20 diferentes establos ubicados en la zona centro y norte de México, las muestras fueron tomadas de forma individual durante los meses de Enero a Marzo de 2013, para lo cual se utilizaron frascos estériles con capacidad de 100 ml, catéteres desechables, guantes de plástico, agujas y jeringas desechables. Se colectaron en promedio 50 ml de orina por vaca utilizando un diurético 30 minutos antes de tomar la muestra con el objeto de aumentar la filtración renal e incrementar la posibilidad de excreción bacteriana en caso de ser un animal infectado, el diurético utilizado fue Furosemida a dosis única de 500 mg/animal.

Las muestras fueron remitidas al Laboratorio de Calamanda en la ciudad de Querétaro perteneciente al comité estatal de fomento y protección pecuaria del estado, en donde se realizó un análisis de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) tiempo real, para identificar el DNA bacteriano de LBHB (*L. borgpetersenii serovar hardjo tipo bovis*). La prueba de PCR se basa en el uso de un par de oligonucleótidos y de sondas tipo FRET que están diseñados y probados *in silico* e *in vitro* para hibridar en una región específica dentro del locus *rfb* de la LBHB, el cual contiene los genes que codifican a las enzimas que participan en la biosíntesis de los lipopolisacáridos de la membrana de la bacteria.

Una vez en el laboratorio las muestras fueron centrifugadas durante 45 minutos a 5000 rpm a 4° C para recuperar las bacterias presentes en la orina. El botón de las bacterias fue lavado 2 veces con PBS 0.1 M estéril y el ADN genómico de las bacterias fue extraído y purificado mediante un método de digestión con Proteinasa K y sales de guanidina, de precipitación con etanol y de cromatografía a través de una mini columna con una matriz de sílica de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Purelink Genomic DNA, Life technologies, Invitrogen). La integridad del ADN genómico se evaluó en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Life Technologies, Invitrogen). La mezcla de reacción en PCR tiempo real de 10 µL finales. La reacción de PCR en tiempo real se realizó en un termociclador Light Cycler 2.0 y los datos se analizaron en el Light Cycler Software 4.1 (Applied Science, Roche).

El análisis *in silico* de los oligonucleótidos y de las sondas tipo FRET diseñados para detectar a la LBHB mediante la PCR de tiempo real muestra que son específicos para este genotipo de la leptospira. Además, el análisis *in vitro* de estos elementos muestra la amplificación de un producto de PCR a partir del DNA purificado de un cultivo de *hardjo bovis*. Por otro lado, la secuencia del amplicón es consistente con la secuencia de la región del locus *rflB* de LBHB que se utilizó para diseñar los oligonucleótidos y las sondas lo que garantiza la confiabilidad de la prueba. (Barr, BC, *et al.*, 1993; Alonso-Andicoberry C, *et al.*, 2001; Allen JD, *et al.*, 1982)

Los resultados fueron sometidos a un análisis de riesgo relativo y tasa de probabilidad para evaluar el efecto de LBHB sobre la productividad de los animales infectados.

Resultados y Discusión.

Los resultados de la prueba de PCR muestran 105 animales positivos a LBHB de un total de 323 pruebas realizadas lo que representa el 32.5% de vacas positivas, cuando se evalúa por establo 12 de los 20 establos en el estudio tienen presencia de LBHB, lo que representa el 60.0% de los hatos positivos, de igual forma se determina la presencia de la bacteria en prácticamente todas las zonas de ganadería lechera especializada en México, abarcando los estados de México, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Jalisco, Coahuila y Chihuahua (cuadro No. 1).

Aun cuando las explotaciones tecnificadas de ganado lechero se distribuyen en el centro y norte de México tienen características muy similares, son explotaciones bajo estabulación total, alimentación con raciones totalmente mezcladas, la mayoría de los hatos tienen un programa de 2 ordeñas por día con producciones de leche similares en las diferentes regiones (28-35 l/vaca/día), el manejo reproductivo se basa en el uso de programas de sincronización de la ovulación para utilizar la inseminación a tiempo fijo teniendo una época de estacionalidad para los establos del norte en donde durante el verano la tasa de servicio se reduce de manera significativa por el efecto del estrés calórico, la raza predominante en los establos es la Holstein, todos los hatos tienen sistema de crianza de becerros pero la mayoría realiza importaciones de ganado (vaquillas preñadas) principalmente de USA para

cubrir sus necesidades debido a las elevadas tasas de desecho. Las instalaciones tienen algunas diferencias con relación a la zona en donde se encuentra el establo, predominando en el centro del país el uso de echaderos individuales y en el norte los corrales abiertos optimizando el espacio.

Cuadro 1. Datos de los hatos que integraron el estudio y el resultado del diagnóstico a *Leptospira hardjo bovis*

Establo	Localización	Número de vacas	Producción láctea diaria (kg)	Días abiertos hato	Servicios por concepción hato	Tasa de desecho	No. Vacas muestreadas	No. Vacas diagnosticadas positivas	Porcentaje
1	Chihuahua	700	32	131	3.0	0.34	12	9	75.0%
2	Chihuahua	950	32	135	2.9	0.35	15	12	80.0%
3	Chihuahua	800	34	134	2.8	0.32	12	5	41.7%
4	Coahuila	8000	34	136	2.9	0.36	18	18	100.0%
5	Coahuila	3200	34	137	3.0	0.36	18	6	33.3%
6	Coahuila	1900	32	131	2.8	0.34	12	0	0.0%
7	Edo. Mex.	1200	32	128	2.4	0.35	24	9	37.5%
8	Edo. Mex.	1450	31	135	2.6	0.32	32	12	37.5%
9	Hidalgo	1600	31	124	2.7	0.34	36	9	25.0%
10	Hidalgo	900	30	136	2.8	0.28	18	0	0.0%
11	Jalisco	1900	34	132	2.6	0.34	30	0	0.0%
12	Jalisco	350	28	134	2.8	0.28	10	0	0.0%
13	Jalisco	270	28	137	2.8	0.27	8	8	100.0%
14	Jalisco	450	29	132	2.6	0.29	12	8	66.7%
15	Jalisco	245	26	138	3.0	0.25	6	6	100.0%
16	Jalisco	180	27	126	2.6	0.27	6	0	0.0%
17	Jalisco	125	24	128	2.5	0.24	2	0	0.0%
18	Puebla	850	29	128	2.6	0.3	25	0	0.0%
19	Querétaro	650	34	136	3.0	0.35	12	3	25.0%
20	Querétaro	1900	35	124	2.6	0.34	15	0	0.0%
		1381 ^a (1739.97)	30.8 ^a (3.09)	132.1 ^a (4.44)	2.8 ^a (0.18)	0.31 ^a (0.04)	323 ^b	105 ^b	32.5% ^c

^a Promedio y entre paréntesis desviaciones estándar, ^b Sumatoria de los datos, ^c Frecuencia total de los animales muestreados

En el Cuadro 1 se muestran datos de fertilidad, producción de leche y los resultados del diagnóstico realizado en los 20 hatos que integraron el estudio; la población total de estos hatos suman 27,620 animales en donde los animales muestreados que cumplieron los requisitos de selección (antecedentes de baja fertilidad: 4 o más servicios; aborto temprano: <70 días) representan el 1.2% de dicha población; el 75% de los hatos tienen entre 125 y 1,675 vacas, se observan que los hatos más grandes están presentes en el norte del país (promedio 2592 vacas) y los más pequeños en el centro (promedio 862 vacas), particularmente en Jalisco; sin embargo el mayor número de animales muestreados corresponden a la región Centro del país con 236 animales y en el caso de la región Norte se muestrearon 87 animales. Los valores a los que se les calculó el promedio observan poca variación a excepción del número de vacas en el hato debido a que los datos no observan una distribución normal.

En el caso de los indicadores reproductivos todos los hatos sobrepasan los 120 días abiertos, de tal forma que sí se considera el promedio de días abiertos más el periodo de gestación de estos establos se estima un periodo entre partos de 13.6 meses. Los 20 establos promediaron 2.8 servicios por concepción y una tasa de desecho de 0.31; de los 323 animales que se muestrearon se observaron resultados positivos en el 32%, lo que representa el 0.38% de la población total.

Cuadro 2. Valores obtenidos de la regresión logística considerando las dos regiones

VARIABLES	B	E.T.	Wald	Significancia	Exp(B)
Vacas en el hato	.000	.000	4.405	.036	1.000
Días abiertos en el hato	.105	.033	10.255	.001	1.111
Servicios por concepción en el hato	-.292	1.165	.063	.802	.747
Desecho en el hato	.332	.110	9.156	.002	1.394
Producción diaria hato	-.707	.164	18.700	.000	.493
No. servicios por concepción	-.077	.155	.248	.618	.926
Muerte embrionaria	-1.371	.361	14.442	.000	.254
Región	-1.768	.413	18.312	.000	.171

En el Cuadro 2 se puede observar que las variables que se asociaron de manera significativa ($P < 0.05$) al diagnóstico de Leptospirosis son días abiertos en el hato, el desecho en el hato, la producción diaria en el hato, el antecedente de muerte embrionaria y la región. De estos los que más pesaron de acuerdo al valor Wald en orden de importancia son: Producción diaria en el hato (18.70), Región (18.31), Muerte embrionaria (14.44), Días abiertos en el hato (10.26) y Porcentaje de desecho en el hato (9.156).

En el Cuadro 3, se observan los resultados obtenidos por la regresión logística de la Región Centro, en el cual se observa que las variables que tienen un mayor

efecto en el diagnóstico ($P < 0.05$) son: Días abiertos en el hato; Desecho en el hato; Producción diaria en el hato; y Muerte embrionaria. Las tres variables que tuvieron un mayor peso fueron la Muerte embrionaria, La producción diaria en el hato y el Desecho en el hato.

Cuadro 3. Resultados de la regresión Logística de la Región Centro

Variables	B	E.T.	Wald	Significancia	Exp(B)
Vacas en el hato	.000	.001	.418	.518	1.000
Días abiertos en el hato	.126	.041	9.474	.002	1.135
Servicios por concepción en el hato	-1.272	1.259	1.020	.313	.280
Desecho en el hato	.610	.189	10.371	.001	1.841
Producción diaria hato	-1.030	.298	11.957	.001	.357
No. servicios por concepción	-.102	.180	.320	.572	.903
Muerte embrionaria	-1.528	.421	13.176	.000	.217

En la región Norte (Cuadro 4) no se observan valores significativos ($P < 0.05$) en asociación de las variables medidas con respecto al diagnóstico positivo a LBHB. Sin embargo, considerando el valor Wald, las variables que mayor peso tienen sobre el resultado del diagnóstico son los días abiertos, la muerte embrionaria y los servicios por concepción individual del animal.

Cuadro 4. Resultados de la regresión Logística de la Región Norte

Variable	B	E.T.	Wald	Significancia	Exp(B)
Vacas en el hato	.016	3.502	.000	.996	1.016
Días abiertos en el hato	6.921	1636.239	.000	.997	1013.835
Servicios por concepción en el hato	474.922	102478.309	.000	.996	1.803E206
Desecho en el hato	-38.616	7378.226	.000	.996	.000
Producción láctea en el hato	-30.542	5678.101	.000	.996	.000
No. de servicios por concepción de la vaca	-.037	.538	.005	.945	.964
Muerte embrionaria	-.895	1.144	.612	.434	.409
Días abiertos de la vaca	.017	.016	1.050	.306	1.017

En el Cuadro 5 se muestran los resultados del análisis de riesgo relativo (RR) y la tasa de probabilidad (OR), con lo que respecta al tamaño del hato; en ambos casos el tamaño del hato no tuvo un efecto sobre la probabilidad de que el diagnóstico a LBHB fuera positivo.

Cuadro 5 Riesgo relativo (RR) y tasa de probabilidad (OR) del diagnóstico positivo de LBHB y el tamaño del hato en las dos regiones estudiadas

Riesgo relativo (RR)			0.75
Tamaño de hato	Positivas	Negativas	Total
< 1000	54	84	138
>1000	54	131	185
Total	108	215	
Tasa de probabilidad (OR)			0.64
	Positivas	Negativas	
< 1000	0.39	0.61	
>1000	0.29	0.71	

El valor de riesgo relativo (RR) en respecto a los días abiertos del hato y el diagnóstico positivo a LBHB indica que los hatos que presentan más de 130 días de periodo abierto tienen 2.51 más posibilidades de presentar un diagnóstico positivo con respecto con aquellos hatos que presentan menos de 130 días abiertos, lo que corresponde con la tasa de probabilidad (OR) la cual observa un valor de 3.60 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a LBHB y días abiertos del hato.

Riesgo Relativo (RR)			2.51
Días abiertos del hato	Positivo	Negativo	Total
<130	18	90	108
>130	90	125	215
Total	108	215	323
Tasa de probabilidad (OR)			3.60
<130	0.42	0.58	
>130	0.33	0.67	

Con respecto a la región de estudio no se observan diferencias con respecto a la probabilidad de un incremento en los diagnóstico positivo, no obstante la diferencia del número de animales entre la región Centro y la región Norte.

Cuadro 7. Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a *Leptospira* y región de estudio

Riesgo Relativo (RR)			0.383
	Positiva	Negativa	Total
Centro	55	181	236
Norte	53.000	34	87.000
Total	108	215	
Tasa de probabilidad (OR)			0.195
Centro	0.233	0.767	
Norte	0.609	0.391	

En el Cuadro 8 muestra un valor de riesgo relativo (RR) de 2.056, lo que indica que un animal con antecedente de muerte embrionaria, tiene un riesgo de más de dos veces de presentar un diagnóstico positivo a LBHB, lo cual concuerda con el valor de la tasa de probabilidad (OR).

Cuadro 8 . Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a *Leptospira* y el antecedente de muerte embrionaria

<i>Riesgo relativo (RR)</i>			2.056
	Positivo	Negativo	Total
Sin Muerte embrionaria	74	190	264
Con Muerte embrionaria	34	25	59
Total	108	215	
<i>Tasa de probabilidad (OR)</i>			3.492
Sin Muerte embrionaria	0.280	0.720	
Con Muerte embrionaria	0.576	0.424	

En lo referente a los días abiertos individuales de las vacas se observa que los animales que tienen más de 220 días de periodo abierto el riesgo de presentar un diagnóstico positivo es 15 veces más que los animales con periodos menores a 220 días, lo que representa un 3.51 veces más probabilidades de resultar positivo (Cuadro 9).

Cuadro 9. Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a LBHB y el antecedente de días abiertos individual

Riesgo Relativo (RR)			15.505
	Positivo	Negativo	
< 220 DA	5	135	140
>220 DA	103	83	186
	108	218	
Tasa de Probabilidad (OR)			3.51
< 220 DA	3.57%	96.43%	
>220 DA	55.38%	44.62%	

Cuadro 10. Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a LBHB y el antecedente de servicios por concepción

Riesgo Relativo (RR)			0.406
	Positivos	Negativos	
< 4 servicios	13	4	17
> 5 servicios	95	211	306
	108	215	
Tasa de Probabilidad (OR)			0.139
< 4 servicios	76.47%	23.53%	
> 5 servicios	31.05%	68.95%	

Con lo que respecta al número de servicios, no se observa una diferencia importante en el riesgo relativo, ni con la tasa de probabilidad (Cuadro 10).

Con relación a la tasa de desecho en el hato se observó que aquellos hatos con una tasa de desecho mayor al 30%, la posibilidad de diagnóstico positivo a LBHB

es 1.4 veces mayor que en aquellos hatos con menos del 30% de tasa de desecho (Cuadro 11). Así mismo en el Cuadro 12, un nivel de producción de leche diaria mayor a 31 litros tiene un riesgo relativo de 1.4 veces más a obtener un diagnóstico positivo a LBHB.

Cuadro 11. Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a LBHB y la tasa de desecho en el ható.

Riesgo Relativo (RR)			1.441
	Positivos	Negativos	
< 30 %	22	65	87
> 30 %	86	150	236
	108	215	
		OR	1.694
	Positivos	Negativos	
< 30 %	25.29%	74.71%	
> 30 %	36.44%	63.56%	

Cuadro 12. Riesgo relativo y tasa de probabilidad del diagnóstico positivo a LBHB y el nivel de producción de leche diaria en el hato

		RR	1.395
	Positivos	Negativos	
< 31 Lt hato	43	112	155
> 31 Lt hato	65	103	168
	108	215	
		OR	1.644
	Positivos	Negativos	
< 31 Lt hato	27.74%	72.26%	
> 31 Lt hato	38.69%	61.31%	

DISCUSIÓN

La *Leptospira* es una de las enfermedades de distribución mundial que puede afectar tanto a animales como a humanos, sin embargo es más común en climas cálidos y húmedos. El serotipo más común en Norteamérica es el *L. borgpetersennii* serovar hardjo (tipo *hardjo-bovis*) (Zuerner, 1988; Naiman et al., 2001). Debido a la dificultad de hacer un diagnóstico diferencial este microorganismo era comúnmente incluido dentro de la especie *L. interrogans* pero el desarrollo de las técnicas moleculares de diagnóstico ha resultado en una reclasificación taxonómica en donde se identifica a *L. borgpetersennii*.

De tal forma que los resultados del presente trabajo permiten determinar la presencia de *Leptospira borgpetersennii* serovar *hardjo tipo bovis* (LBHB) en México, que hasta ahora no había sido posible confirmar su presencia por carecer de un técnica de diagnóstico precisa que permitiera diferenciar entre *L. interrogans hardjo prajitno* y *L. borgpetersennii hardjo bovis* debido de que ambos serovar son serológicamente indistinguibles, pero genéticamente son dos tipos diferentes (Bolin et al., 2001), siendo la primera más común en Europa, mientras que la segunda está más distribuida a nivel mundial y es el serovar más común en los Estados Unidos (Ellis, 1986; Thermann et al., 1986; Naiman et al., 2001; Bolin, 2001).

La Leptospirosis puede ser agrupada en dos amplias categorías: una puede ser aquella adaptadas al hospedero (hospederos de mantenimiento) y las cepas

incidentales. El serovar *L. hardjo-bovis* es uno de los adaptado al ganado de los cinco que hay, los otros cuatro son *L. Pomona*, *L. grippotyphosa*, *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae*. Estos serovar son difíciles de diagnosticar debido que a la enfermedad asociada con la infección es generalmente subclínica y produce bajos títulos de anticuerpos, en el caso de serovar *L. hardjo-bovis* el microorganismo se aloja en riñones y tracto reproductivo de ahí el origen de los problemas reproductivos. En contraste, las infecciones incidentales de *Leptospira* son más fáciles de diagnosticar, en virtud que la infección cursa en una enfermedad más aguda y por lo tanto generan títulos de anticuerpos más altos, observan un mayor número de microorganismos en los tejidos y no son eliminados por la orina. Infecciones incidentales pueden provocar abortos, comúnmente entre los cuatro y siete meses de gestación, y nacimientos de becerros prematuros y débiles; síndrome de la caída de la leche; y, enfermedad severa del hígado y riñón (Rodning *et al.*, 2012).

La capacidad de poder diagnosticar *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo tipo bovis* utilizando técnicas moleculares como PCR, permite disponer de varias ventajas en comparación a los métodos tradicionales. Debido a que *L. hardjo-bovis* está adaptado al hospedero, la búsqueda de títulos no es un método confiable para poder determinar si un hato está infectado. De los métodos de laboratorio disponibles para determinar la presencia de *L. hardjo-bovis* se puede resaltar el aislamiento del microorganismo solo que requiere de condiciones especiales de laboratorio y de un periodo de tiempo prolongado de alrededor de 6 meses. (Quaresma-Bomfim *et al.*, 2008).

De acuerdo a Bellows *et al.* (2002) las implicaciones de la presencia de *Leptospira* de en un hato son principalmente de índole económica en los siguientes aspectos:

- 1) Días abiertos, ya que si se considera el costo promedio de un día abierto de \$ 59.00 pesos cuando las vacas tienen más de 175 días abiertos como en el caso de las vacas positivas a LBHB (De Vries, *et al.*, 2010); en el caso de aquellos animales que tengan más de 220 días de periodo abierto, las pérdidas serán de al menos \$2,655.00 pesos/Vaca.
- 2) Infertilidad, muerte embrionaria y servicios repetidos, las pérdidas tempranas de preñeces causan un incremento de 45 días abiertos lo que se puede cuantificar en pérdidas entre \$1,200 y \$3,000 por vaca con pérdida embrionaria.
- 3) Reducción en la producción de leche, las vacas que tienen una pobre fertilidad no tienen adecuados niveles de producción de leche en etapas tardías de la lactancia para que pueda ser rentable; sin embargo en el presente estudio esto no pudo observarse debido que los hatos de los animales que resultaron positivos a *L.hardjo-bovis* tenían producciones mayores a 31 litros diarios.
- 4) Costos del desecho, los hatos que tienen mayores días abiertos su probabilidad de desecho es mayor lo que implica en incrementar el costo del reemplazo debido que es necesario tener una mayor disponibilidad, aspecto que se puede observar en el presente caso en donde los hatos que tenía un mayor número de animales positivos a *L. hardjo-bovis* tenía una tasa de desecho mayor al 31%.

Considerando las pérdidas económicas ya señaladas, la importancia de hacer un diagnóstico preciso de la presencia de esta enfermedad permite el diseñar

programas más efectivos de prevención y control de este serotipo. El control de este patógeno requiere de una combinación de medidas de bioseguridad, tratamiento de antibióticos, esquemas apropiados de vacunación y eliminación de portadores. Iniciando el programa de control con un esquema de aplicación de antibióticos de larga duración y de un programa adecuado de vacunación (Bolin, 2003; Rodning *et al.*, 2012).

Al no disponer de manera amplia de pruebas de diagnóstico diferencial de los serovar de *Leptospira* en la actualidad se utilizan vacunas polivalentes de este patógeno que contienen células muertas completas de diferentes serotipos, las cuales son efectivas en proveer inmunidad contra infecciones incidental con cepas no adaptadas al hospedero, sin embargo son poco efectivas para proveer una respuesta inmune adecuada para cepas adaptadas al hospedero como es el caso del serovar *L.hardjo-bovis*. Zuerner *et al.*, (2011) señalan que la formulación estándar de vacunas contra el serovar Hardjo induce títulos altos de anticuerpos y puede reducir pero no previene contra la colonización renal crónica o la dispersión por orina. Debido a que la orina de animales infectados es la fuente de principal de infección y dada la naturaleza oblicua de la fauna silvestre, roedores, la prevalencia del serovar Hardjo, hace que la prevención de toda exposición a *Leptospira* es prácticamente imposible en la mayoría de las unidades de producción, por lo tanto el mejoramiento de la resistencia a través de la vacunación con los serotipos presentes de *Leptospira* es una medida necesaria de bioseguridad (Bolin, 2003).

Se han reportado diversos estudios en donde se han evaluado vacunas formuladas con aislados de campo de *L. borgpetersenni* serovar hardjo encontrándose que éstas prevenían infección y colonización de tejidos cuando se exponían a cepas de *L. borgpetersenni* serovar hardjo provenientes de Estados Unidos y Europa (Naiman *et al.*, 2001). Naiman *et al.*, (2001) y Wang *et al.*, (2007) concuerdan que uso de vacunas monovalente para *L. borgpetersenni* serovar hardjo puede inducir una fuerte respuesta inmune de tipo celular Th1 debido a las características de la cepa utilizada en la fabricación de la vacuna. Bolin (2003) señala que el régimen tradicional de vacunación contra leptospira está conformado por dos dosis iniciales de vacunación, seguido por una dosis anual a todo el ganado usando una vacuna pentavalente. En el caso de un hato abierto la vacunación será dos veces al año, sin embargo, señala que el señalado régimen de vacunación no es efectivo contra el serovar Hardjo, y no se recomienda aplicar más de dos vacunaciones al año.

El uso de antibióticos puede ser útil para tratar animales de manera individual y en general erradicar infecciones persistentes de Hardjo; este esquema tiene la ventaja que detiene la eliminación por orina y mejora los signos clínicos asociados con la infección persistente, no obstante este método no deberá ser la única estrategia para la prevención y control de la enfermedad, este autor recomienda un esquema que combine la vacunación con el uso selectivo de antibióticos lo que concuerda con lo señalado por Naiman *et al.* (2002).

CONCLUSIONES

1. Los resultados del presente trabajo permiten determinar la presencia de *Leptospira borgpetersenii serovar hardjo tipo bovis* (LBHB) en México, que hasta ahora no había sido posible confirmar por carecer de una técnica de diagnóstico precisa que permitiera diferenciar entre *L. interrogans hardjo prajitno* y *L. borgpetersenii hardjo bovis* debido a que ambos serovar son serológicamente indistinguibles, pero genéticamente son diferentes.
2. Se comprueba que la presencia de LBHB afecta los indicadores de desempeño reproductivo en la población de estudio, específicamente en referencia a servicios por concepción, muerte embrionaria, tasa de desecho y días abiertos.
3. Aun cuando la producción de leche no se afecta directamente por la presencia de LBHB en el hato, la infección tiene un efecto negativo sobre los días abiertos lo que disminuye la producción total de leche en la vida productiva de la vaca.
4. El diagnóstico preciso de LBHB permite establecer programas de vacunación específicos para el control de la leptospirosis ocasionada por este serovar mejorando así el desempeño productivo de los animales.

Literatura Consultada

1. Ahmed A, Engelberts M, Boer K, Ahmed N, Hartskeerl R. Development and Validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. Plos one. 2009; 4(9): e 7093.
2. Alonso-Andicoberry C, FJ. García-Peña, L.M Ortega-Mora. Epidemiología, Diagnostico y control de la Leptospirosis bovina. Dpto. de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040-Madrid 2001.
3. Athanazio DA, et al. Rattus Norvegicus as a model for persistent renal colonization by pathogenic leptospira interrogans. Actra. Trop. 105:176-80, 2008 (Pub Med: 18093568)
4. Barr, BC, Anderson, M.L. Infectious Diseases causing bovine abortion and fetal loss. Vet. Clin. North AM. Food Anim. Pract. V9: 343-368. 1993
5. Bharti A, Nally J, Ricaldi J, Matthias M, Dias M, Lovett M, et al. Leptospirosis; a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis. 3 (12): 757-71. 2003.
6. Blumerman SL, Herzing CT, Baldwin CL. WC1 + gammadelta T cell memory population is induced by killed bacterial vaccine. Eur J Immunol. 37:1204-16, 2007 (Pub Med: 17429840)
7. Bolin CA. Leptospira interrogans serovar hardjo Infection of cattle, Proc AM. Assoc. Bov. Prac. 24:12-14, 1992.
8. Bolin. C.A. Diagnosis and Control of Bovine Leptospirosis. Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference. March 12-14, 2003. Reno, NV p155-160.
9. Bolin CA, AB Thierman, Handsaker AL, Foley JW. Efecto de la vacunación con una vacuna de leptospira pentavalente para leptospira interrogans serovariedad hardjo sobre la infección en vacas gestantes. AM Vet. Res. 50:161-165. 1989 (Pub Med.)
10. Bolin CA, Alt DP. Uso de una vacuna monovalente de leptospira para prevenir la colonización renal y la excreción urinaria en ganado expuesto a leptospira borgpetersenii serovar hardjo. AM J Vet Res. 62:995-1000. 2001 (Pub Med)
11. Bolin CA, ALT DP, Zuerner RL. Protection of cattle from renal and genital tract colonization with leptospira borgpetersenii serovar hardjo. Proceedings of the 21 st. World Buiatrics Congress. Punte del Este, Uruguay. December 2000.

12. Brian M, David Alt, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin C. Protection Killed leptospira borgpetersenii vaccine induced potent Th1 immunity comprising responses by CDA and gammadelta T lymphocytes. Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts 01003. USA. 2001
13. Cerqueira G, M, Bride A, Pecardeu M, Ribeiros S, Moreira A, Morel V, et al. Distribution of the leptospiral immunoglobulin like (lig) genes in pathogenic leptospira species and application of Lig B to typing leptospiral isolates. J Med. Microbiol. 58(Pt9): 1173-81. 2009.
14. Clima, Wikipedia. Org. Consulta en Línea. 2013.
15. Coleman, WB and Tsangalis, GJ. Molecular diagnostics: For the clinical laboratorian. Human Press. ISBN 1-58829-356-4 Pgs. 47-56. 2006.
16. Coordinación general de ganadería. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México. SAGARPA. 2010.
17. De la Peña-Moctezuma A, Bulach D, Adler B. Genetic Differences among the LPS biosynthetic loci of serovars of leptospira interrogans and leptospira borgpetersenii. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 31 (1): 73-81. 2001.
18. De Vries A, Leeuwen J, Thatcher W. Economics of Improved Reproductive Performance in Dairy Cattle. University of Florida. 2010.
19. Dong H, Huy, Xue F, Sun D, Ojcius D, Maoy, et al. Characterization of the OMPL1 gene of pathogenic leptospira species in China and cross-immunogenicity of the OMPL1 protein. BMC Microbiol. 8:223. 2008.
20. Ellis WA. Bovine leptospirosis: Cost, treatment and control. Simposio Internacional sobre leptospira y leptospirosis en las Americas. FMVZ, UNAM, México, DF. 2004
21. Ellis WA. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet. Clin. North AM L. Anim. Pract. 10(3):463-478. 1994.
22. Ellis WA, Mc Dowell SWJ, Mackie DP, Pollock JM, Taylor MJ. Inmunidad a leptospirosis bovina. Memorias del congreso mundial de buiatria. Punta del este Uruguay. 2000.
23. Ellis WA, Thierman AB, Marshall IB. Los genótipos de leptospira hardjo y su papel en la enfermedad clínica. Memorias 14° congreso mundial sobre enfermedades del ganado. Dublin, Irlanda. 1986.

24. Escamilla PH, Martinez MJ, Medina CM, Morales SE. Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Querétaro, México. *Can. J. Vet. Res.* 71:314-317. 2007.
25. Faine S, Adler B, Bolin CA, Perolat P. *Leptospira y leptospirosis* 2a ed. Melbourne, Australia: Medi Sci; Press. 1999.
26. Grave Kampc. Van de Kempf, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Evs GS, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primer. *J. Gen Microbiol.* 139:1691-710. 1993.
27. Haake D, Suchard M, Kelley M, Dundoom, Alt D, Zuerner R. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J. Bacterial.* 186(9): 2818-28. 2004.
28. Heath SE, Johnson R. *Leptospirosis* JAUMA 205:1518-1523. 1994.
29. JD. Allen, Maney CL, Wilks CR. Evaluación de una vacuna contra hardjo, para evitar leptospirosis en bovinos expuestos a una infección natural con leptospira interrogans serovar hardjo. *Aust. Vet J.* 58:93-96. 1982 (Pub Med).
30. Kawata H, Dancel L, Villanueva S, Yanagihara Y, Kaizumi M, Watanabe H. Fla B-Polymerase chain reaction (Fla B-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of leptospira Spp. *Microbiol. Immunol.* 45(6):491-96. 2001
31. Kirk JH. Infectious abortions in dairy cows. *Vet. Med. Ext. Fact Sheet.* Univ. of California, Davis. Accessed. 2011.
32. Ko A, Guarant C, Picardeau M. *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 7(10): 736-47. 2009
33. Koizumi N, Watanabe H. *Leptospirosis* vaccines: Past, present and future. *J. Postgrad Med.* 51 (3):210-4.
34. Levett P, Morey R, Galloway R, Turner D, Steiger Walt A, Mayer L. Detection of pathogenic leptospires by real time quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 54(Pt1):45-9. 2005.
35. Lin M, Surujballo O, Nielsen K, Nadin-Davis S, Randall G. Identification of a 35-kilodalton serovar-cross reactive flagellar protein, Fla B, from leptospira interrogans by N-terminal sequencing, gene cloning, and sequence analysis, *Infect Immun.* 65(10):4355-9. 1997.

36. Moles y Cervantes P, Luna Alvarez M, Gavaldan Rosas D. Aspectos económicos, epidemiológicos de serovariedades de *L. interrogans* en bovinos en México. Foro complejo abortivo en bovinos, Puebla, México. 2007.
37. Naiman BM, et al. Evaluation of type 1 immunoresponse in naive and vaccinated animals following challenge with leptospira borgpetersenii; serovar hardjo: Involvement of WC1 (+) gammadelta and CD4 T cells. Infect Immun. 70:6147-57. 2002 (Pub Med: 12379692)
38. Naiman, B.M., Alt, D., Bolin, C.A., Zuerner, R., Baldwin, C.L. Protective Killed *Leptospira borgpetersenii* Vaccine Induces Potent Th1 Immunity Comprising Responses by CD4 and $\gamma\delta$ T Lymphocytes. Infect. Immune. 2001, 69(12):7550-7558.
39. Naiman, B.M., Alt, S.B., Bolin, C.A., Brown, R., Zuerner, R., Baldwin, C.L. 2002. Evaluation of Type 1 Immune Response in Naïve and Vaccinated Animals following Challenge with *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo: Involvement of WC1 + $\gamma\delta$ and CD4 T Cells. Infect. Immune. 2002, 70(11):6147-6157.
40. Nally JE, Chow E, fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic leptospira interrogans infection. Infect Immun. 73:3251-3260. 2005 (Pub Med: 15909340)
41. Natali M, Piedad A. Aplicación de la pruebas de PCR convencional simple y multiple para la identificación de aislamientos de leptospira Spp. En Colombia. Grupo de investigación en medicina tropical; Instituto colombiano de medicina tropical, Universidad CES, Medellín, Colombia. 2010.
42. Pearson JKL, Mackie DP, Ellis WA. Milk Drop Syndrome Resulting from leptospira hardjo. Vet. Rec. 106-135.
43. Quaresma-Bomfim, M.R., Barbosa-Stancioli, E.F., Cota-Koury, M. 2008. Detection of pathogenic leptospire in urine from naturally infected cattle by nested PCR. The Veterinary Journal 178 (2008) 251-256.
44. Rodning, S.P., Edmonson, M.A., Gard, J. A., Lovelady, A.S. 2012. Leptospirosis in Cattle. Alabana Cooperative Extension System ANR-0858. Alabama A & M Auburn Universities. <http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-0858/ANR-0858.pdf> Consultado 5 sep 2013.
45. Slack A, Symonds M, Dohnt M, Smythe L. Identification of pathogenic leptospira species by conventional or real-time PCR and secuencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene, BMC Microbiol. 6:95. 2006.

46. Slack, A.T., Symonds, S.I., Dohnt, M.F., Smythe, L.D. 2006. The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998–2004. *Epidemiol. Infect.* (2006), 134. p.11217-1225.
47. Thermann AB, Handseker AL, Foley JW, White FH, Kingscote BF. Reclasificación de leptospiras aisladas en America del Norte pertenecientes a los serogrupos Mini y Sejroe por análisis de endonucleasa de restricción, *Am J Vet. Res.* 47:61-66. 1986 (Pub. Med.)
48. Wang, Z., Jin, L., Wegryn, A. 2007. Leptospirosis Vaccines. *Microb. Cell Fact.* Dec 11; 6:39
49. Xue F, Yan J, Picardeau M. Evolution and pathogenesis of leptospira Spp. Lessons learned from the genomes. *Microbes infect.* 11(3):328-33. 2009.
50. Zuerner, R. L., Alt, D.P., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Olsen, S.C. A *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo Vaccine Induces a Th1 Response, Activates NK Cells, and Reduces Renal Colonization. *Clin. Vaccine Immunol.* 18(4):684-691