TESIS

INVESTIGACION DE LEPTOSPIRAS EN SECRECION LACTEA DEL GANADO BOVINO DE LA REPUBLICA ARGENTINA

POR

NESTOR OSCAR STANCHI

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
BIBLIOTECA
LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

1984

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

RECTOR

ING. QCO. RAUL ADOLFO PESSACQ

SECRETARIO GENERAL

ING.QCO. PABLO OSCAR LUCHESSI

PROSECRETARIO GENERAL

NESTOR MIGUEL MASCIOTO

SECRETARIO DE ASUNTOS LEGALES

DR. HUGO JORGE PACHECO

SECRETARIO DE ASUNTOS ECONOMICOS-FINANCIEROS

CONT. ALDO H. ROSSI

SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS

PROF. MARIA CELIA AGUADO DE CORSICO

GUARDA SELLOS

ING. ANDRES RINGUELET

****

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

DECANO NORMALIZADOR

DR. FORTUNATO BLAS ISEAS

VICEDECANO

DRA. MARIA E. ETCHEVERRIGARAY

SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS

DR. JORGE HORACIO DILLON

SECRETARIO DE SUPERVISION ADMINISTRATIVA

SR. OMAR HUGO RAMIREZ

DIRECTORA DE ENSEÑANZA

SRA. HAYDEE C.R.DE PERETTO

DIRECTORA DE BIBLIOTECA

SRITA. HEBE PEDERNERA

DIRECTOR ECONOMICO-FINANCIERO

SR. HECTOR S. MOREIRA

****

NOMINA DEL PERSONAL DOCENTE POR CATEGORIAS

PROFESOR TITULAR "DEDICACION EXCLUSIVA"

ANGULO Eusebia	Investigadora	Titular
CARROZZA Jesús S.W.	Int.a la Biofísica	Titular
GALLO Guillermo G.	Clín.Grandes Animales	Titular
MARTIN Alcides A.	Anat.y Fisiol.Patológic.	Titular
MENENDEZ Néstor A.	Patolog.Aves y Pilíf.	Interino
PRACCA Lydia C.	Clín.Pequeños Animales	Titular
QUINTEROS Indalecio R.	Genética y Biometría	Titular
ZACCARDI Eduardo M.	Fisiología	Titular

PROFESOR TITULAR "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

AGUIRRE Walter G.	Microbiolog.Especial	Titular
ALBERDI Cecilio	Tec.y Sanid.Alimentos	Titular
ANDREATTA Jorge N.	Semiología y Propedeút.	Titular
BERTOLINI José M.	Anatomía Comparada	Interino
DELPRATO Ismael O.	Anat.Descript.y Topog.	EMERITO
JENSEN Alicia D.	Bioestadística	Titular
LED Jorge Eugenio	Parasit.y Enf.Parasit.	Interino-Lic
MANZULLO Alfredo	Inmunología I y II	EMERITO
MAROTTA Eduardo G.	Zootec,Especial I (OSC)	Titular
OCHOA Mario E.	Director-Inst.S.Catalina	Interino
OTTINO Julio F.	Histología y Embriología	Interino
PENNIMPEDE Enrique F.F.	Inmunología Gral.y Aplic.	Titular
PIOVANO Nicolas M.	Int.a la Bioquímica	Titular
RODRIGUEZ Benjamín R.	Zootec.Especial II (bye.)	Titular

PROFESOR TITULAR "DEDICACION SIMPLE"

AGUIRRE Walter G.	Microbiología Aplicada	Titular
ARGERI Nelson J.	Análisis Clínicos I	Interino
ARGERI Nelson J.	Análisis Clínicos II	Titular
BOCCIA Francisco O.	Patolog.Q.y Podología	Interino
CARROZZA Jesús S.W.	Física y Químic.Aplicada	Interino
de ANTONI Graciela A.	Genética Microbiana	Titular
GIMENO Emilio Juan	Higiene-Epid.y S.Pública	Titular

///

///

ISEAS Fortunato B.	Patología Médica	Interino
MARTIN Alcides A.	Patología General	Titular
MARTINO Olindo A.L.	Salud Pública	Titular
-OSTROWSKI Jorge E.B.	Patología d'l'Reprod.	Titular
PANZONI Erico E.	Economía Agraría	Titular
PEROTTI Rodolfo M.	Zootec.Esp.III(a.y p.)	EMERITO
SCIAMMARELLA Alfredo M.	Medicina Operatoria	Interino

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION EXCLUSIVA"

BOCCIA Francisco O.	Clínic.Pequeños Animales	Reemplaz.
BRANDETTI Eugenio	Patología de Aves y Pilíf.	-Reemplaz.
ERRECALDE Jorge O.	Farmacolog.F.y Terapeútic.	Interino
IDIART Julio R.	Anat. y Fisiolog.Patológ.	Titular
LAGRECA Liliana	Zootec.General y Agrost.	Titular
MONINA Marta I.	Clínica Grandes Animales	Interino

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

DIBBERN Alberto R.	Zootec.Especial II(ByE)	Interino-Lic
DURANTE Eduardo J.	Servicio C.de Cirugía	Interino
FELDMAN Raquel E.	Parasitología Comparada	Titular
FERNANDEZ de LIGER José H.	Clínica Grandes Animales	Titular-Lic.
FERNANDEZ Enrique J.	Enfermedades Infecciosas	Interino
GIMENO Eduardo J.	Patología General	Titular
GOMEZ Carlos M.	Inmunología Gral.y Aplic.	Interino
GRILLO Virginia E.	Zootec.Especial III(AyP)	Interino
MAGGI Nilda B.	Servicio C.de Cirugía	Reemplaz.
MARTINO Juan J.	Microbiología	Titular
NOIA Miguel A.	Int.a la Biofísica	Titular
NOVARINI Miguel A.	Farmacología F.y Terap.	Interino
ORTEGA César F.	Semiología y Propedeút.	Titular
PENNIMPEDE María T.del A.	Tecnología y S.Aliment.	Titular
REINOSO Enso H.	Micología Médica e Ind.	Interino
RUAGER Jorge	Anatomía y Fisiol.Pat.	Titular
REPETTO SANCHEZ Olindo	Medicina Operatoria	Reempl.

///

///

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION SIMPLE"

BACIGALUPO Néstor R.	Tec.y Sanidad de los Alim-	Titular
BRAVO BARDALES Tomás	Economía Agraria	Reemplaz.
ETCHEVERRIGARAY María E.	Virología	Titular
FINOCHIETTO Héctor D.	Patología Médica	Interino
GOMEZ Carlos M.	Inmunología II	Interino
MAGGI Nilda B.	Patología Quirúrg.y Pod.	Interino
MALIANDI Florestán S. (h.)	Higiene,Epid.y S.Pública	Titular
MOISO Alejandro C.	Microbiología	Titular
OLIVA Graciela A.	Virología	Interino
PRIO LOFEUDO Graciela E.	Zootecnia Esp.III(AyP)	Interino
RADMAN Nilda E.	Parasit.y Enferm.Parasit.	Reemplaz.
RENNER Juan F.	Clínica Grandes Animales	Interino
ROJAS Edmundo R.	Fisiología	Titular
RUTTER Bruno	Patolog.d'l'Rep.y Obst.	Titular
TARSIA Elba E.	Int.a la Biofísica	Titular
TESORIERO Catalina	Micrbiología Especial	Interino
VENTURINI Lucila M.	Parasit.y Enfermed.Paras.	Interino
VILLAR Martha E.	Análisis Clínicos I Pte.	Interino
VILLAR Martha E.	Análisis Clínicos II Pte.	Interino
YANNARELLA Francisco G.	Parasitología y Enf.Paras.	Interino-Lc

JEFE DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION EXCLUSIVA"

BASCHAR Héctor O.	Clínica Grandes Animales	Interino
FONROUGE Reinaldo D.	Higiene,Epid.y S.Pública	Interino
RONSINO Roberto	Sección Radioisótopos	Interino
TEJEDOR Eugenio D.	Genética y Biometría	Interino

JEFE DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

ALIVERTI Héctor M.	Zootec.Especial II(B.yE.)	Interino
ALLENDE Miriam G.	Servicio C. de Cirugía	Interino
ALLEVATO Hugo L.	Higiene,Epid.y S.Pública	Interino
AMASINO Carlos F.	Enfermedades Infecciosas	Interino
ARGERICH María C.	Genética y Biometría	Reemplaz.

///

///

AULICINO Oscar O.	Tecnología y S.d'l'Alim.	Interino
BABUSCI Máximo	Fisiología	Interino
BAMBILL Emilia C.	Zootec.Especial I Pte.(OSC)	-Interino
BERNAGOZZI Jorge A.	Inmunolog.Gral.y Aplicada	Interino
BISCHOFF Jorge R.	Genética y Biometría	Interino
BOREN Jorge L.	Parasit.y Enferm.Parasit.	Reemplaz.
BUGALLO Antonio	Farmacolog.F.y Terapeútic.	Interino
BUTLER Eduardo A.	Patología Quirúrg.y Podol.	Reemplaz.
CARBONE Cecilia	Animales de Laboratorio	Interino
CASTUMA María E.	Introd.a la Bioquímica	Interino
CATALA Juan C.L.	Anatomía Comparada	Reemplaz.
COSTA Enrique F.	Anatomía Descript.y Topog.	Interino
CREDARO Cristina N.	Análisis Clínicos I P.	Interino
CHAMPREDONDE Hugo N.	Patología General	Interino
del CASTILLO Federico C.	Histología y Embriología	Interino
DRAGONETTI Ana María	Clínica Pequeños Animales	Interino
FORNER Jesús J.A.	Tecnolog.y S.d'l'Aliment.	Interino
FREGOSSI Mario O.	Anatomía Descript.y Topog.	Interino
FRIGOLI Alicia E.	Int.a la Biofísica	Interino
FRIGOLI Alicia E.	Int. a la Biofísica	Interino
FUENTES Leticia S.	Int.a la Biofísica	Interino
GARCIA VALENTI Horacio	Zootecnia Esp.II -(ByE)	Interino
-GIANOTTI Ricardo S.	Tecnolog.y S.d'l'Aliment.	Interino
GIMENO Eduardo J.	Anat.y Fisiool.Patológic,	Interino
GONZALEZ Ester T.	Virología	Interino
GUAJARDO Margarita H.	Int.a la Bioquímica	Interino
GUGLIELMETTI Elda M.C.	Int.a la Biofísica	Interino
GUGLIELMETTI Elda M.C.	Física y Química Aplicad.	Interino
IBARGOYEN Guillermo S.	Patología General	Interino
LACCHINI Raúl A,	Zootecnia Gral.y Agrost.	Interino
LINZITTO Oscar R.	Histología y Embriología	Interino
LOJO María E.	Genética Microbiana	Interino
MARCANTONI Hugo	Histología y Embriología	Interino
MASSONE Raúl A.	Clínica Grandes Animales	Interino
MILLAN Margarita D.	Anatomía Descript.y Tpo.	Interino

///

///

MONTESINOS RAMOS Ignacio	Clínica Grandes Animales	Interino
MURO Alicia M.	Clínica Pequeños Animales	Interino
ORELLANA Jorge	Histología y Embriología	Interino
PELLON Horacio S.	Tecnología y S.d'l'Alim.	Interino
PIACENTINI Enrique	Tecnología y S.d'l'Alim.	Interino
PIAZZA Delia	Microbiologia Especial	Interino
PONS Eduardo E.	Clínica Grandes Animales	Interino
RAMIREZ Luis E.	Anat.Descript.y Topog.	Interino
RECALDE Ricardo J.	Pat.Quirúrgica y Podol.	Reemplaz.
RIVADAVIA Carlos A.	Int.a la Bioquímica	Interino
SALESSI Enrique	Fisiología	Interino
SARA Raúl C.	Pat.d'l'Reproduc.y Obst.	Interino
SCAVIA Ricardo C.	Anatomía Comparada	Interino
TABORCIA Juan A.	Patología General	Interino
TARABUSO Ricardo	Semiología y Propedeútica	Interino
TREBUCQ Rubén A.	Inmunolog.Gral.y Aplicada	Interino
VARELA Juan A.H.	Microbiología	Reemplaz.
VOCOS GIMENEZ Sara T.	Zootec.Especial II (B.yE.)	Interino

JEFE DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION SIMPLE"

AVILA Silvia M.	Microbiología Especial	Interino
BERNAGOZZI Jorge A.	Inmunología Gral.y Aplic.	Interino
CALONGE Carlos A.	Patología Médica	Interino
CASTAÑEDA Alberto C.	Clínic.Pequeños Animales	Interino
CESAR Norberto	Patología Médica	Reemplaz.
CUETO Eduardo R.	Zootec.Especial II(ByE)	Interino
CHIARAVALLI Juan C.	Zootec.Gral.y Agrost.	Interino
DELGADO CAFFE Osvaldo L.	Higiene-Epid.y S.Pública	Interino
DOMINELLI Heraldo A.	Patología Quirúrgica y P.	Interino
FERNANDEZ de LIGER José H.(h)	Patología Médica	Interino
FORMENTI Liliana E.	Microbiología Aplicada	Reemplaz.
GALLO Guillermo F.	Fisiología	Interino
GARCIA FRONTINI María V.	Parasitolog.y Enf.Parasit.	Interino
GIMENEZ Mabel A.	Zootecnia Especial I (OSC)	Interino
HERNANDEZ Zulma H.	Salud Pública	Interino

///

////

LACCHINI Raúl A.	Zootecnia Espec.I (OSC)	Interino
MANACORDA Ana M.	Anatomía Descript.y Top.	Reemplaz.
MARILINGO Aníbal J.	Medicina Operatoria	Interino
MELANI Gustavo H.	Patología Médica	Interino
MORRIS Marta R.	Micolog.Médica e Indust.	Interino
NICODEMO María del C.	Zootecnia Espec.IIIP.(AyP)	Interino
NOSETTO Edgardo O.	Virología	Interino
OCAMPO Jesús M.F.	Int.a la Biofísica	Interino
PERFUMO Juan C.	Anatomía y Fisiol.Patolog.	Interino
ROMERO Jorge R.	Parasit.y Enf.Parasit.	Interino
RONSINO Roberto	Fisiología	Interino
SALAS Laura I.	Semiología y Propedeútica	Interino
SANCHO José J.I.	Medicina Operatoria	Interino
SIMPSON María I.	Int. a la Biofísica	Interino
TREBUCQ Rubén A.	Inmunología I Parte	Interino
TUNES María del L.	Microbiología	Interino
VALLEJOS Ethel V.	Patología Médica	Interino
VENERE Rodolfo L.	Zootecnia Gral.y Agrost.	Reemplaz.
VENTURINI María C.	Inmunolog.Gral y Aplicad.	Interino
WARD Miguel V.	Farmacolog.F.y Terapeútic.	Reemplaz.

AYUDANTES DIPLOMADOS "DEDICACION EXCLUSIVA"

AVILA Silvia M.	Histología y Embriología	Interino
CASTELLANO María C.	Clínic.Pequeños Animales	Interino
CATALANO Vicente A.	Histología y Embriología	Interino
CERRUTTI Augusto S.	Sección Radioisótopos	Interino

AYUDANTES DIPLOMADOS "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

BERISSO Marcela M.	Enfermedades Infecciosas	Interino
CABRAL Marta S.	Tecnolog.y S.d'l'Aliment.	Interino
CAMINOA Ricardo A.	Microbiología Especial	Interino
FLAMINI Mirta A.	Histología y Embriología	Reemplaz.
GONZALEZ SANGUINETTI Silvia	Int.a la Bioquímica	Interino
HUERTA Alicia N.	Int.a la Bioquímica	Interino
MARENGO Alejandro G.	Higiene-Epid.y S.Pública	Interino

///

///

MILLAN Roberto G.	Histología y Embriología	Interino-Lic.
PETRUCCELLI Miguel A.	Patología d'Aves y Pilíf.	Interino
RAMIREZ Luis E.	Clínica Pequeños Animales	Interino
RENARD Jorge L.	Tecnología y S.d'l'Aliment.	-Interino
REYNA Juan C.	Histología y Embriología	Reemplaz.
RIVADENEIRA Elizabeth	Clínica Grandes Animales	Reemplaz.
RULE Roberto	Farmacología F.y Terapeút.	-Interino
TABORCIA Juan A.	Enfermedades Infecciosas	Interino
URQUIOLA Horacio M.	Fisiología	Interino
ZOHUAR Edith E.	Clínica Pequeños Animales	-Interino

AYUDANTES DIPLOMADOS "DEDICACION SIMPLE"

ALONSO Juan C.	Genética Microbiana	Interino-Lic.
ALT Celia M.	Microbiología Especial	Interino
ALLEVATTO Susana del C.	Zootec.Gral.y Agrostolog.	Interino
ANTONINI Alicia G.	Genética y Biometría	Interino
APREA Adriana N.	Medicina Operatoria	Interino
ARCHELLI Susana M.	Parasitología Comparada	Interino
BISCAYART Adriana C.	Int.a la Biofísica	Interino
BORISOFF Liliana E.	Clínic.Grandes Animales	Reemplaz.
BUSCAGLIA Celina	Zootec.Espec.III (AyP)	Interino-Lic.
CALVO Carlos J.	Anatomía y Fisiol.Patol.	Interino
CAMINOA Ricardo A.	Animales de Laboratorio	Interino
CATALANO Vicente A.	Sección Audiovisuales	Interino
CERRUTTI Augusto S.	Fisiología	Interino
COLOCCIA PAYBA Lilian G.	Anat.y Fisiol.Patológ.	Interino
CORTEZ Guillermo F.	Higiene-Epid.y S.Pública	Interino
COURREGES Marta M.	Patología Aves y Pilíf.	Interino
CUELLO Carlos E.	Clínica Grandes Animales	Reemplaz.
DELGADO CAFFE Osvaldo L.	Bioestadística	Interino
FARJAT María H.	Microbiología Aplicada	Reemplaz.
-FEATHERSTON Patricia L.	Micología Méd.e Indust.	Interino
GALOSI Cecilia M.	Int.a la Bioquímica	Interino
GONZALEZ Ester T.	Microbiología Aplicada	Interino
GUILLEN Griselda	Análisis Clínicos I Pte.	Interino

///

///

IRASTORZA Jorge A.	Patología Médica	Reemplaz.
LASTA Gregorio	Semiología y Propedeútic.	Reemplaz.
MEZZERA Ana María	Clínica Pequeños Animales	Interino
PIAZZA Delia	Microbiología Aplicada	Interino-Lic.
PLAZZOTTA Luis A.	Zootecnia Espec. IP.(OSC)	Interino
PONZONE Eduardo A.	Patología Reprod.y Obst.	Interino
REGGIOSO Ana M.	Int.a la Biofísica	Licencia
ROSSI Ismael D.	Enfermedades Infecciosas	Reemplaz.
SANGUINETTI Héctor R.	Anatomía y Fisiol.Patol.	Interino
SEMORILE Liliana C.	Genética Microbiana	Interino
SENISTERRA Guillermo R.	Int.a la Bioquímica	Reemplaz.

DIRECCION DE ENSEÑANZA - 30 de abril de 1984.-

ghc.-

Este trabajo de tesis fue realizado en el Departamento de Bacteriología, Sección Leptospirosis del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Castelar, y en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

INDICE: Página

INTRODUCCION 1

1.ANTECEDENTES 2

1.1.DEFINICION DE LA ENFERMEDAD 2

1.2.INCIDENCIA MUNDIAL 2

1.3.INCIDENCIA EN NUESTRO PAIS 3

1.4.1.ETIOLOGIA 4

1.4.2.RESISTENCIA 6

1.4.3.CARACTERISTICAS CULTURALES 6

1.5.EPIZOOTIOLOGIA 7

1.6.SINTOMATOLOGIA EN BOVINOS 9

1.7.DIAGNOSTICO 11

1.7.1.OBSERVACION DIRECTA 12

1.7.2.CULTIVO 13

1.7.3.MEDIOS SOLIDOS 14

1.7.4.INOCULACION DE ANIMALES 15

1.7.5.SEROLOGIA 15

1.8.MASTITIS A LEPTOSPIRAS 19

1.9.SOBREVIVENCIA DE LEPTOSPIRAS EN LECHE 25

1.10.SEROLOGIA EN SUERO LACTEO 26

1.11.POSIBLE INCIDENCIA ECONOMICA 28

1.12.POSIBLE INCIDENCIA DE LEPTOSPIROSIS EN HUMANOS 29

1.13.OBJETIVOS 30

2.TRABAJO EXPERIMENTAL 32

2.1.MATERIAL Y METODOS 32

2.1.1.TOMA DE MUESTRAS 32

2.1.2.PRUEBA CALIFORNIANA PARA MASTITIS 33

2.1.3.MEDIOS DE CULTIVO 33

2.1.4.METODOLOGIA DE SIEMBRA 36

2.1.5.ANIMALES DE EXPERIMENTACION 36

2.1.6.METODOLOGIA DE INOCULACION 36

2.1.7.PRUEBA DE AGLUTINACION MICROSCOPICA 38

2.1.8.DETECCION DE ANTICUERPOS EN SUERO DE LECHE 39

2.1.9.PRUEBA DE AGLUTINACION MICROSCOPICA EN SUERO SANGUINEO 39

2.2.RESULTADOS 40

2.3.DISCUSION 42

2.4.CONCLUSIONES 46

INVESTIGACION DE LEPTOSPIRAS EN SECRECION LACTEA DEL GANADO BOVINO DE LA REPUBLICA ARGENTINA

INTRODUCCION:

Dentro de las enfermedades del aparato reproductivo, la Leptospirosis comparte junto con la Brucelosis, Tricomoniasis y la Vibriosis (Campylobacteriosis) un papel preponderante.

Es ésta una enfermedad zoonótica, que se presenta en nuestro país con características enzoóticas. Está ampliamente distribuída a lo largo de todo el territorio y su incidencia se ha visto incrementada en los últimos años (27).

Clínicamente la Leptospirosis bovina se manifiesta como una enfermedad de rodeo afectando a numerosos animales y produciendo como síntoma más notable el aborto. Otro síntoma citado en la literatura es la mastitis, problema sanitario que registra escasos antecedentes en nuestro país (23,5,57). Es muy probable que este tipo de mastitis no pase desapercibida, pero habitualmente no se la relaciona con una infección leptospiral. En otras oportunidades debido a la falta de signos de inflamación de la glándula sólo es posible detectar un brusco descenso de la producción láctea (milk drop syndrome), lo que dificulta su diagnóstico.

La existencia de Leptospiras como causal de mastitis ha sido confirmada en el mundo por numerosos aislamientos (16,61,86,40,64) y posterior reproducción experimental de este sindrome (16,61,129,130).

Es consideración de varios autores (100,59,31,84,33,65) que este sindrome ha experimentado un aumento de frecuencia en los últimos años. En líneas generales L.pomona (49,61,86,119,84),L.szwajisak (129,130), L.grippotyphosa (8,84), y L.hardjo (104,126,122,84,125, 31,33,65,85,40,41,9,64,129,130,59) participan en la etiología de este sindrome; siendo esta última serovariedad nombrada la de mayor prevalencia. Aparentemente en nuestro país las serovariedades pomona y canicola estarían involucradas en este proceso patológico (5, 23,57).

Sin embargo el aislamiento de L.hardjo a partir de riñones bovinos,equinos y armadillos por Myers y col., nos indujo a sospechar que, como en otros países, esta serovariedad podría actuar como agente etiológico de mastitis bovina en nuestro país (90,91,93).

En Argentina, más del 60% de los bovinos muestran positividad a

alguna de las serovariedades de Leptospiras cuando son enfrentados sus sueros por la técnica de aglutinación microscópica (27), indicando contacto previo o actual con estos microorganismos. Esta marcada incidencia nos hizo suponer que dentro de la variedad de manifestaciones clínicas, la mastitis podría ocupar un papel importante.

Dado que el porcentaje de caída de producción láctea varía en los rodeos afectados del 30 al 90%, existe unanimidad en considerar a las mastitis causadas por Leptospiras, responsables de importantes pérdidas económicas (125,65).

Por último, dado que en la búsqueda rutinaria de microorganismos productores de mastitis no se incluye el estudio e investigación de Leptospiras (128,54,55,15,53,97,11), hemos considerado como un aporte importante el poder dilucidar en qué medida las Leptospiras serían responsables de mastitis bovinas en la República Argentina.

Complementariamente se estudiarán los títulos específicos antileptospiras por la prueba de aglutinación microscópica utilizando muestras de leche y sangre en forma pareada.

1. ANTECEDENTES:

1.1. DEFINICION DE LA ENFERMEDAD:

La Leptospirosis es una enfermedad causada por cualquiera de las serovariedades patógenas de Leptospiras; de características febriles que afecta a bovinos, porcinos, caninos, equinos, ovinos y caprinos entre los animales domésticos, encontrándose en los integrantes de la fauna silvestre, y habiéndose aislado también en animales de sangre fría.

El hombre se ve frecuentemente afectado, siendo una zoonosis de tipo ocupacional o profesional (98).

1.2. INCIDENCIA MUNDIAL:

La bibliografía sobre esta enfermedad nos muestra la alta distribución de la Leptospirosis en todo el mundo. La característica cosmopolita de la Leptospira hace que los estudios se hallen dispersos en una gran cantidad de citas. Sin embargo, no todas las

serovariedades se hallan presentes en todos los países, encontrándose una distribución geográfica bastante circunscripta a cada una de ellas.

El primer aislamiento de Leptospiras del ganado bovino fue realizado simultaneamente en 1946 en Rusia e Israel. A partir de allí, se sucedieron aislamientos en Estados Unidos (126,138) Canadá (86),Inglaterra (59,65,40,41,42,43), Italia (9), Australia (12), Africa (62,63), Indonesia (124,125), Argentina (107, 23,2,5,90,91,93), Perú (79) etc.Datos éstos que indican la prevalencia de la Leptospirosis bovina en todo el mundo.

Si bien L.pomona ha sido indicada como la responsable de los abortos a Leptospiras producidos en Estados Unidos (Galton y Stoenner)(Cit.por 103),el incremento de los aislamientos de L. hardjo en casos de abortos bovinos estaría indicando posiblemente la importancia de esta serovariedad(138).

En Israel van der Hoeden encontró un 38% de seropositividad a L.bovis,afirmando que la Leptospirosis bovina está ampliamente extendida en cercano oriente.

Liceras de Hidalgo en 1973 aisla en riñones de bovinos recolectados en mataderos L.hardjo y L.pomona en el Perú, siendo quizá éste el primer aislamiento de L.hardjo en América Latina (79).

Herr et al. en 1982 aislan L.pomona de bovinos asociado con abortos en la República de Sud Africa (62). Asimismo Herr y Winnen en 1983 aislan por primera vez L.pomona en Botswana (Africa) (63).

1.3.INCIDENCIA EN NUESTRO PAIS:

Los primeros trabajos en busca de este microorganismo en animales (ratas) fueron efectuados por Spada en 1919 (112) (Cit.por 26)con resultados negativos. Recién en 1926 Mazza (82)(Cit.por 26) logra el primer aislamiento de un perro,denominándolo Treponema tabacalene que luego se identificó como Leptospira.

Sabino y Rennella en 1945 realizaron los primeros estudios serológicos en bovinos,hallando un 47% de positividad sobre 308 sueros examinados,siendo L.hyos (tarassovi) la serovariedad más frecuente (107) (Cit.por 26)

En 1960 Cacchione encuentra un 45 % de positividad en 2.110 sueros bovinos examinados, siendo en esta oportunidad el serogrupo Hebdomadis el de mayor incidencia, siguiendo luego Pomona y Tarassovi (22).

En 1965 Aguirre y col realizan una encuesta serológica en la zona de La Plata y alrededores en la especie bovina. Sobre 246 sueros examinados obtuvieron 154 positivos, lo que constituye un 62,6 % sobre el total. Encontraron anticuerpos específicos en mayor proporción al serogrupo Hebdomadis 64,9 % y tan sólo 5,2 % a Pomona (3).

En 1973 Cacchione y col hacen una recopilación de resultados serológicos en Argentina, realizados por distintos investigadores. Los bovinos presentan una incidencia del 52 % (26).

El mismo autor en 1980 observa un aumento de los índices de infección a través del tiempo. Este marcado incremento de focos con abortos y mortandades perinatales lo justifica por un mayor conocimiento de la enfermedad y a que la misma se sospecha con mayor frecuencia (27).

Según esta misma revisión bibliográfica, en la República Argentina se han aislado las siguientes serovariedades: Icterohaemorrhagiae, canicola, pomona, ballum, bataviae, paidjan, argentinensis, pyrogenes, tarassovi y hardjo.

En 1981 también el mismo autor comunica una incidencia serológica en bovinos del 63,2 %, dando el primer lugar a L.wolffi,(serogrupo Hebdomadis), luego Pomona y Tarassovi (28).

1.4.1.ETIOLOGIA

El agente causal de esta enfermedad es un microorganismo cuya clasificación taxonómica es la siguiente:

REINO	Vegetal	
PHYLUM	Thallophyta	
CLASE	Schizonycetos	
ORDEN	Spirochaetales	
FAMILIA	Leptospiraceae (69)	
GENERO	Leptospira	Leptonema
ESPECIE	Biflexa	Illini
	Interrogans	
	Parva	

Las Leptospiras se clasifican inmunológicamente en serogrupos y éstos en serovarieades. Estando en este momento en etapa de revisión y aprobación la nueva clasificación (47), ésta no se incluye y nos atenemos en este trabajo a la clasificación vigente al presente.

Las Leptospiras (Leptos=delgado,estrecho,fino; spira=un espiral; un espiral fino) son organismos flexibles y helicoidales, los cuales miden usualmente 6 a 20 µm de largo y cerca de 0,1µm de diámetro. El espiral tiene una amplitud de cerca de 0,1 a 0,15 um y una ondulación de 0,5 µm. El medio líquido los extremos se encuentran incurvados en forma de gancho, pero no es extraño encontrar que uno o ambos sean rectos temporariamente (48,102).

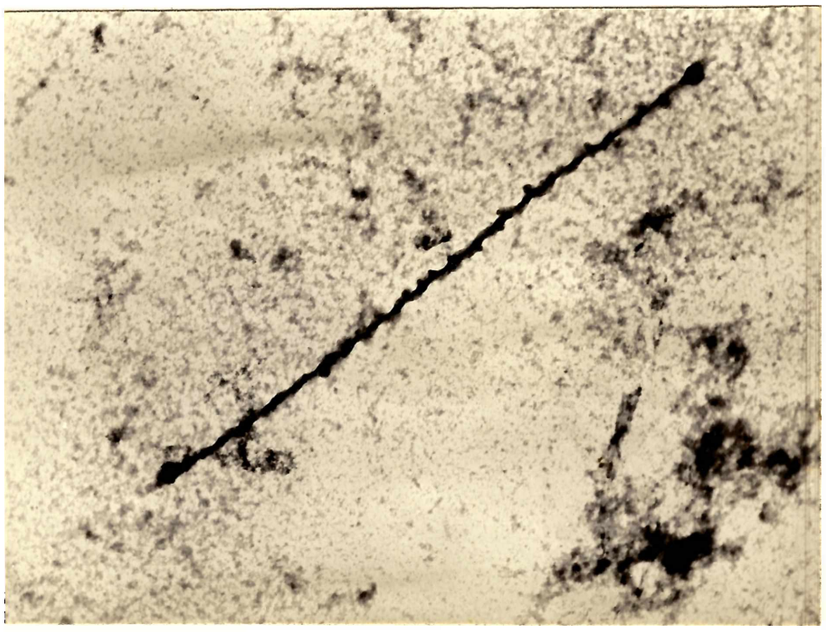
Las células de Leptospiras consisten en un cilindro protoplasmático helicoidal delineado por un complejo membrana citoplasmática-glicopéptido. Una membrana externa envuelve al organismo. Posee dos filamentos axiales+, los cuales se insertan subterminalmente en los extremos opuestos del cilindro protoplasmático. Los extremos libres se dirigen hacia la región media del organismo donde usualmente no se entrecruzan (47,48).

Tanto en medio líquido como en semisólido, el movimiento característico parece ser de rotación alternada alrededor del axis, y traslación sin diferenciación de polos. Las células en división se flexionan agudamente y vigorosamente en el punto de escisión (47).

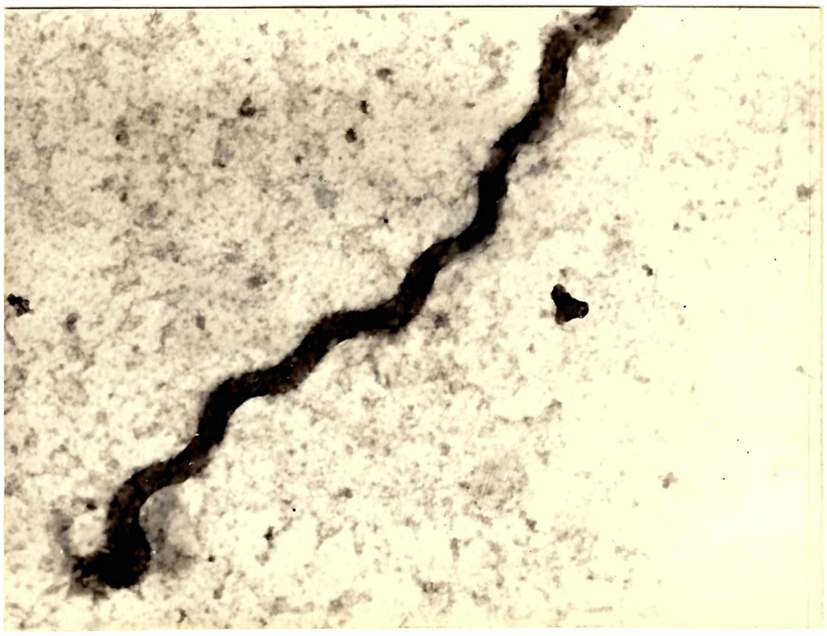
Las Leptospiras son aerófilas y microaerófilas. El crecimiento ocurre óptimamente a pH 7,2 a 7,6 (rango 6,8 a 7,8) y temperaturas por encima de 13°C (óptimo 28 a 30). El tiempo medio de generación es de 7 a 16 hs. El período de incubación para el crecimiento es usualmente de 6 a 14 días; el agregado de pyruvato de sodio suele acortar este período, sin embargo ciertas cepas necesitan 4 semanas o más (73).

En medio semisólido uno o más discos de crecimiento se forman 2 a 3 cm debajo de la superficie. En medio sólido (1% de agar) se producen colonias difusas en semiprofundidad, siendo éstas de diámetros variables (10,45,106,114,129,132,139,141,142). En medio líquido producen una débil turbidéz y de características bi-

+también llamados flagelos



Leptospira canicola,microfotografía electrónica (original)
Negativo:6000 x (ampliac.aprox. 1,75x)



Leptospira canicola,microfotografía electrónica (original)
Negativo:25.000x (ampliac.aprox. 1,75x)

Gentileza del Dr.A.Bolondi,Dto.Físico-Química.CICV.INTA
Castelar

rrefringestes (47,48,102).

Las Leptospiras biflexas e interrogans son morfológicamente indistinguibles. La motilidad de las Leptospiras,combinado a su pequeño diámetro,flexibilidad y forma, le permiten atravesar filtros de membrana de 0,1 a 0,45 µm de poro y migrar en medio solidificado con 1% de agar.

1.4.2.RESISTENCIA:

Las Leptospiras no resisten la desecación ni el calor, son muy sensibles a los cambios de pH, humedad, así como a la luz del sol directa, desinfectantes químicos, detergentes y jabón. In vitro la mayoría de los antibióticos le son letales.(84).

Temperaturas de 40 a 45°C son deletéreas si persisten durante 30 minutos (36,47). Leptospira icterohaemorrhagiae es capáz de sobrevivir a -27° C durante 9 meses. En orina diluída puede vivir 35 días y mas de 6 meses en suelo húmedo saturado con ésta.

Las Leptospiras biflexas o saprófitas llegan a sobrevivir 45 a 60 días en ambientes apropiados como ser lagos, arroyos, donde las condiciones de temperatura, pH y salinidad sean aceptables.

Las Leptospiras patógenas o interrogans normalmente no sobreviven más que algunos días en estos medios (28), llegando en ocasiones a vivir varias semanas (7).

1.4.3.CARACTERISTICAS CULTURALES:

Las Leptospiras pueden ser cultivadas en medios conteniendo suero, albúmina sérica o ácidos grasos de cadena larga (14 o más carbonos). Muchas cepas pueden ser cultivadas en medios libres de proteínas.

Los medios de cultivo mas usados de rutina son los de Stuart, Korthof, Fletcher (24) y Ellinghausen modificado (37,38,72). La adición de pyruvato de sodio aumenta notablemente el desarrollo de ciertas serovariedades de Leptospiras, especialmente acortando su tiempo de generación (73).

Los cultivos necesitan ser repicados frecuentemente a efectos de mantenerlos vivos. Es así que en medio líquido son necesarios

los repiques semanales y en medio sémisólido cada 45 días.Sin embargo pueden ser conservados por 2 años cuando se utiliza el medio bifásico de Fletcher y carbón (89,Myers+com.pers.).

En los medios antes nombrados se pueden obtener desarrollos de 6 a 8 x 10^9 células. Los únicos compuestos orgánicos necesarios conocidos son las vitaminas B1 y B12 y los ácidos grasos de cadena larga. Las Leptospiras incorporan bases púricas pero no pirimídicas en sus ácidos nucléicos. Por ello son resistentes a la actividad antibacteriana del análogo de la pirimidina el 5-Fluorouracilo (39,47,70). A efectos de evitar la contaminación de las muestras en los intentos de aislamiento, también la neomicina puede ser usada (88).

Ciertos medios libres de proteínas se han desarrollado a causa del alto costo que representan el suero de conejo o la albúmina bovina (19). Otros medios químicamente definidos han logrado tener éxito pero no son usados habitualmente (110,116).

1.5.EPIZOOTIOLOGIA:

La Leptospirosis es una enfermedad caracterizada por la diseminación de la infección dentro de especies o grupos de animales de un modo cíclico.

Usualmente un animal portador,sobreviviente de una infección aguda,infecta a otros nuevos. Animales jóvenes dentro de la misma área, pasan a infectarse debido a que frecuentan el mismo habitat.

El ambiente y las distintas zonas geográficas condicionan a las serovariedades presentes (28). En general, hay una gran diversidad de roedores y otros pequeños mamíferos que actúan como reservorios de diferentes serovariedades (47,20).

Investigaciones realizadas sobre la fauna silvestre,han revelado que las Leptospiras están extensamente distribuídas en muchas especies de rodedores (ratón de campo,rata,cuis) (20,2,93); carnívoros(perro,zorro);insectívoros (erizo); marsupiales (comadreja) (105); quirópteros (murciélagos); artiodáctilos (ciervos) y lagomorfos (conejo,liebre). Leptospiras patógenas han sido ais

+Myers D.,Centro Panamericano de Zoonosis.Buenos Aires.1984

ladas de aves, peces, reptiles y sapos (84,103), siendo éstos portadores naturales de Leptospiras (58).

Es importante determinar epidemiológicamente el llamado portador de "larga duración", ya que es el que provee el modo primario de sobrevivir de las Leptospiras en una región ezoótica (58).

La infección entre los animales de granja se efectúa principalmente a través de 2 mecanismos. El primero es por infección congénita o neonatal,seguida de recuperación a la cual continúa un estado de portador. El segundo, mucho mas importante, es a través de la orina de portadores que contaminan el suelo, pastos o aguas de bebida. El hombre puede contagiarse también a partir de estos animales (84,47,58).

Un roedor infectado (rata,cuis, etc.), puede infectar a bovinos u otro animal de granja, como así también a la propia especie (47).

Los portadores localizan su infección en el riñón, a pesar que usualmente no existen grandes trastornos, puede ir acompañado de un daño al parénquima renal, lo que aparentemente no sucede en los roedores (28).

En extensión a lo dicho, es el aspecto epidemiológico en que un portador contamina el agua o el suelo, donde comienza el ciclo de infección para el ganado. El agua contaminada es un problema extra que debe ser controlado, ya que es una vía potencial de infección para el hombre (47,58).

Doherty (1967) (Cit.por 84), ha informado que las condiciones ambientales y la cantidad de lluvia son importantes en la difusión de la infección a L.pomona en el ganado.

Especial importancia adquieren las aguas de los ríos de corriente lenta, arroyos, lagos, como así también el fango, difundiéndose la enfermedad por zonas distantes y afectando a nuevos huéspede (28).

La infección leptospirósica humana resulta primariamente de la exposición directa o indirecta con la orina de animales infectados. Otros modos de infección como la manipulación de tejidos animales infectados o ingestión de alimento o agua contaminados son considerados de menor importancia, sin embargo ciertos autores no le restan importancia a esta forma de transmisión.

Las Leptospiras pueden ingresar al organismo a través de pequeñas lesiones cutáneas, mucosa de la boca,nariz y ojos. También puede penetrar por la piel intacta si la exposición es por largo tiempo, cuando se está sumergido en el agua. Por lo tanto las personas que trabajen con carne, o con aguas contaminadas poseen mayor riesgo de contraer la infección (28,58,4,47).

Todas las secreciones del cuerpo pueden contener Leptospiras durante el estado agudo de la enfermedad. Estas han sido aisladas de semen (111) y leche de bovinos (64), suinos (135),hamsters (81), y cabra (Tripathy 1982+)(Cit.pot 58). Animales jóvenes pueden ser infectados aparentemente por amamantamiento de madres enfermas que posean Leptospiras en la leche (58).

El semen de los toros infectados puede ser portador de Leptospiras produciéndose transmisión a las hembras durante la cópula e Inseminación Artificial (21,111).

Jones estudió la viabilidad de L.pomona en extendidos de semen bovino, en el cual es capáz de sobrevivir, cuando no es tratado con antibióticos, por lo menos 30 días luego de congelado y conservado a -190° C (Cit.por 36).

La leche, orina, tejidos animales, fetos, placenta, secreción uterina de animales enfermos, pueden ser la causa de contaminación directa (21,36).

Un reciente reporte de Florida (Estados Unidos), en que L.hardjo y L.pomona infectaron a tamberos y a vacas lecheras, indica la potencial fuente de infección de los manipuladores de ganado con estos organismos (138).

1.6.SINTOMATOLOGIA EN BOVINOS:

La Leptospirosis puede cursar como una infección inaparente hasta producir graves signos clínicos incluyendo la muerte de los animales enfermos.

La infección subclínica que ocurre en el ganado, también es frecuente en roedores y especies silvestres. Muchos animales son portadores sanos, sin conocerse que hayan padecido la enfermedad ni siquiera en forma leve (84).

+Tripathy D.,Urbana Ill.,dato no publicado 1982 (Cit.por 58).

La forma aguda comienza generalmente con un aumento brusco de temperatura, que puede llegar a los 41°,5 C ,con depresión general y pérdida de apetito, el animal se aleja del rodeo y puede permanecer postrado.

En terneros, se presentan altos picos de fiebre, hemoglobinuria, ictericia y anorexia. Los animales suelen morir en un curso de 3 a 5 días, generalmente entre los 15 a 60 días pos parto.(28).

También la timpanización de ambos flancos,polidipsia,deshidratación, ojos hundidos, pelo quebradizo, secreción ocular y nasal se pueden observar en terneros. La muerte de éstos en los rodeos afectados comprende de muy pocos animales (5) a cerca del 50 % (8,23).

En bovinos adultos constituyen síntomas iniciales de la enfermedad:fiebre,anorexia y menor producción de leche,también se pueden notar ictericia y hemoglobinuria (84,66,103). En casos severos las membranas mucosas pueden estar congestionadas y hemorrágicas.

La leche de los animales en producción toma la apariencia del calostro y puede contener grumos y estrías de sangre. Clínicamente la ubre está normal a la palpación (40,23,33). La agalaxia perdura por 1 a 2 semanas, la recuperación no es habitualmente total (28,47,103,64,65,40). La secreción de leche anormal puede ocurrir en varias especies animales pero se presenta con mayor frecuencia en vacas (58).

En la forma crónica el aborto forma parte principal de la sintomatología, produciéndose a partir del séptimo mes de gestación. La placenta retenida y las dificultades reproductivas pueden complicar el cuadro (84).

Alston y Broom en 1958 asignan los siguientes porcentajes de incidencia a los síntomas atribuídos a Leptospirosis en 125 rodeos de vacunos (1952/54).

Aborto	58%
Reducción de Leche	47%
Fiebre	38%
Hemoglobinuria	30%
Anemia	19%
Ictericia	15%

Frecuentemente se reportan abortos "en tormenta", pudiendo variar su incidencia del 5 al 40% de los animales gestantes (103, 57).

El bovinos es afectado por las siguientes serovariedades:L.hardjo, L.pomona, L.grippotyphosa, L.canicola, L.icterohaemorrhagiae, y L.tarassovi; todas ellas responsables de abortos (28).

En la necropsia, se encuentra esplenomegalia, nefritis, neumonía, enteritis, peritonitis, nódulos linfáticos agrandados, mastitis, hiperemia de las meninges y líquido oscuro en cavidad toráxica de terneros (42,8,84).

Si la infección toma lugar durante la segunda mitad de la preñéz las Leptospiras penetran mas facilmente la placenta, haciendo una leptospiremia fetal y conduciendo a la muerte del feto y a su expulsión o su recuperación con producción de anticuerpos propios (84,85).

La localización de las Leptospiras en útero, puede provocar el aborto, tanto al comienzo-menos frecuente-,como al final de la gestación; el feto muere 24 hs antes del aborto o incluso puede verse retenido in útero una a tres semanas post-mortem (28,58).

La variedad de signos clínicos presentes en todas las especies, hace que el diagnóstico basado exclusivamente en la sintomatología, sea frecuentemente de difícil realización.

1.7.DIGANOSTICO:

Por ser la Leptospirosis una enfermedad que presenta muy variadas manifestaciones clínicas, resulta sumamente dificultoso arribar a un diagnóstico certero considerando tan sólo la sintomatología observada.

En el diagnóstico, cobra especial importancia la evaluación de la historia individual de los rodeos, los signos clínicos, lesiones, etc., necesitándose la mayor parte de las veces del laboratorio a efectos de encaminar el diagnóstico.

Resulta importante conocer la patogénesis de la enfermedad para la selección de las muestras a enviar en cada estadío de ésta.

El diagnóstico de laboratorio comprende: el aislamiento del agente causal y el estudio serológico.

1.7.1.OBSERVACION DIRECTA:

Las Leptospiras no son visibles por el microscopio de campo claro debido a que el espesor es menor que la amplitud media de la onda luminosa (0,5 µm). Sin embargo, pueden ser observada en microscopía en fresco con fondo oscuro y por contraste de fases.

La búsqueda de Leptospira en la sangre no es recomendable realizarla como un procedimiento de rutina, debido al bajo número presente y a que los artefactos de fibrina pueden hacer confundir al técnico no experimentado (47).

Luego de la segunda semana de enfermedad, las leptospiras pueden ser observadas y cultivadas en la orina de los animales portadores. El uso de una doble centrifugación puede aumentar la probabilidad de observar Leptospiras (47). En caso de tratarse de orinas ácidas la sobrevivencia se ve condicionada a una corta duración, mientras que si ésta es diluída o estabilizado su pH cercano a la neutralidad ésta se ve aumentada.

La inmunofluorescencia es también una ayuda en la detección de Leptospiras en orina o cortes de tejidos, sin embargo exige la preparación de conjugados y un equipo microscópico de inmunofluorescencia no accesible a todos los laboratorios.

Tinción: Varios procedimientos de deposición de sales de plata se han desarrollado para detectar Leptospiras en los líquidos corporales y en los tejidos (métodos de Fontana y/o Levaditti). Estos tienen las mismas limitaciones que la microscopía en fresco en campo oscuro; el pequeño número de microorganismos y los artefactos pueden hacer confundir con leptospiras. Por lo tanto estas técnicas no son recomendadas para el diagnóstico de rutina.

La impregnación argéntica y la inmunofluorescencia sin embargo son particularmente útiles para demostrar Leptospiras en especímenes en los cuales los tejidos ya han sido fijados, fetos abortados contaminados, u orina contaminada y/o formolizada,los que no pueden ser examinados por otros métodos (47)(42).

Las técnicas de tinción con colorantes de anilina son raramente utilizadas. El mejor método sea quizás la tinción prolongada con Giemsa (30 min) si es que este tipo de colorantes quiere ser usado.

1.7.2.CULTIVO:

El procedimiento de aislamiento, si bien nos brinda la seguridad diagnóstica, encuentra el grave inconveniente que usualmente este tipo de microorganismos requiere varias semanas de incubación antes que las Leptospiras puedan ser visualizadas. Por ésto, con esta metodología sólo se consigue hacer un diagnóstico retrospectivo de la enfermedad.

Las Leptospiras pueden ser cultivadas a partir de sangre, orina, tejidos de necropsia;hígado, riñón, bazo, líquido cerebro espinal, cámara anterior del ojo o fluído peritoneal.

En los primeros días de la afección existe leptospiremia, la que se prolonga muy poco tiempo. La sangre en este caso puede ser sembrada en los distintos medios de cultivo especiales para Leptospiras. Si bien éstas pueden ser aisladas de Líquido Céfalo Raquídeo durante el final de la primer semana de enfermedad, generalmente este procedimiento no es llevado a cabo.

El cultivo de orina puede resultar positivo ya en los primeros días de la enfermedad, sin embargo es más factible tener éxito a partir de la segunda semana pos-infección.

En caso de muerte de animales, estos microorganismos pueden ser aislados por cultivo de órganos; cuando los fetos son procesados en corto tiempo luego del aborto, también es posible recuperar Leptospiras de ellos.

Estos cultivos se realizan en medios especiales como ser el Stuart, Korthof, Fletcher y Ellinghausen modificado. El procedimiento de incluir diferentes concentraciones de agar (Ellinghausen modificado,Fletcher) es debido a que ciertas Leptospiras crecen mejor en el primo aislamiento en medios semisólidos, necesitando para adaptarse a los líquidos varios repiques.(24,29,47,83, 119,62).

Si bien las Leptospiras son sensibles a la mayoría de los antibióticos in vitro, se usa con éxito el agregado de neomicina a la concentración de 300 µg/ml en medio Ellinghausen modificado o 5 µg/ml en medio Fletcher a efectos de impedir el desarrollo de la flora contaminante (88).

También el agregado a los medios del análogo de la pirimidina

el 5-Fluorouracilo (100 a 200 µg/ml) que actúa como bacteriostático, permite el desarrollo de las Leptospiras (36,70,88,129,62).

1.7.3.MEDIOS SOLIDOS:

Se han desarrollado medios sólidos para el crecimiento y aislamiento de Leptospiras. Thiermann (129,130) observa por estudios experimentales que sólo con medio Ellinghausen modificado sólido, consigue el aislamiento a partir de muestras de leche de bovinos inoculados con Leptospiras del serogrupo Hebdomadis, no logrando desarrollo en otros medios ni por pasaje por hamster.

El creciemiento de Leptospiras en medios sólidos fue descripto por Fukushima en 1927 (51)(Cit.por 139). Sin embargo recién tomó impulso con el medio desarrollado por Cox y Larson en 1957 (32).

Armstrong en 1960 utilizando el medio de Cox y Larson con 1% de agar, diferencia dos tipos de colonias: unas de pequeño diámetro y algo opacas, y otras de mayor diámetro, de apariencia de velo y muy traslúcidas; desarrollándose todas las serovariedades (interrogans y biflexas) en profundidad. A efectos de evitar el crecimiento de hongos agrega Cicloheximide. Algunas colonias fueron extremadamente transparentes, siendo muy dificultosa su observación (10).

Roth en 1961 aisla en medio sólido 88 cepas a partir de 227 riñones de animales silvestres; todas ellas crecieron en profundidad (106).

Yanagawa en 1962, utilizando también el medio de Cox y Larson en placas de Petri, logra una diferenciación parcial de las Leptospiras biflexas de las patógenas (140,141,142).

Stalheim 1963 no encuentra diferencias entre la antigenicidad o infectividad al ratón, entre los distintos tipos de colonias observables de una misma cepa. Las Leptospiras biflexas desarrollaron en 4 a 6 días, mientras que las interrogans necesitaron 7 a 10 días más (114).

Tripathy en 1971 utilizó el medio Ellinghausen con el agregado de 1% de agar, logrando el desarrollo en 3 a 7 días de incubación. Observó además que las colonias pequeñas pertenecen a Leptospiras de extremo recto,mientras que las colonias grandes perte

necen a Leptospiras de extremos en forma de gancho (132).

El mismo autor en 1980, recomienda la adición de suero de conejo al 5% o en su defecto pyruvato de sodio (100 µg/ml) al medio Ellinghausen a efectos de facilitar el desarrollo de las colonias de Leptospiras del serogrupo Hebdomadis. Aconseja este medio cuando el número de Leptospiras en la muestra es escaso (134).

Wood, Johnson y Palin en 1981, utilizando el medio Ellinghausen con 10% de suero de conejo más el agregado de pyruvato de sodio (100 µg/ml) con 1% de agar, observan la presencia de dos tipos de colonias, unas de superficie y otras de profundidad (139).

Thiermann en 1981 aisla,a partir de leche de bovinos experimentalmente inoculados con L.hardjo y L.szwajizak en medio sólido de Ellinhgausen, Leptospiras que formaron colonias blancas y de bordes difusos. Parece ser que éstas pueden penetrar rápidamente en el medio sólido y por lo tanto quedar separadas de las sustancias antileptospíricas de la leche (129).

1.7.4.INOCULACION DE ANIMALES:

Se utilizan para el aislamiento de Leptospiras los animales de laboratorio. Estos constituyen una valiosa ayuda, ya que en numerosas oportunidades sólo por pasaje sucesivo a través de éstos, se logran aislar algunas cepas que no crecen directamente en los medios de cultivo.

Se emplean para este fin el cobayo (Cavia porcellus) y el hamster (Microcrisetus auratus), a los cuales se los inocula por vía intraperitoneal con el material a estudiar.

Luego, en el momento de elevación de la temperatura corporal, generalmente entre los 5 a 7 días, se procede a la extracción de sangre por punción cardíaca y con ésta se realizan hemocultivos en los medios habituales.

1.7.5.SEROLOGIA:

Para el diagnóstico de la Leptospirosis, la detección de anticuerpos en el animal afectado cobra especial atención debido a la dificultad que representa el aislamiento del agente causal.

Se utiliza el método descripto por Schüffner y Mochtar en 1927

(108). Aunque esta técnica de aglutinación microscópica es una de las más antiguas, ha sido y sigue siendo la prueba de elección para la búsqueda de anticuerpos antileptospiras. Esta se basa en el enfrentamiento del suero problema previamente diluído, con cultivos vivos de Leptospiras en partes iguales, que luego de un período de incubación es observado por microscopía en fondo oscuro en busca de aglutinación producida por estos complejos antígeno/anticuerpo.

Los diversos resultados serológicos dependen del estadío de la enfermedad. En la etapa aguda todavía no existen anticuerpos presentes en sangre. En la segunda fase, comienzan a formarse éstos y concomitantemente desaparecen las Leptospiras de la sangre (84).

Por lo menos dos muestras de sangre deben ser obtenidas con dos semanas de intervalo. Al momento del aborto la prueba puede ser negativa, pero frecuentemente altos títulos de anticuerpos son detectables cuando ésta es repetida 7 a 10 días después (8, 84).

Sin embargo Hanson (1982) afirma que los títulos de la vaca preñada y abortada generalmente han tenido un pico con anterioridad al aborto, por lo que muestras pareadas de suero usualmente no evidencian cambio o pueden exhibir una disminución del título (58).

Los niveles se elevan rápidamente, según Hodges y Ris (143), y como el aborto debido a la infección leptospírica ocurre varias semanas después de la infección, es usualmente imposible demostrar un aumento en el título luego del aborto (Cit. por 80).

Según Michna (1970), los títulos 1/1000 pueden mantenerse estacionarios por varias semanas y en algunos casos pueden hacerlo por meses o años (84).

Una historia sobre la vacunación del ganado contra Leptospirosis es imperativa para una evaluación real de los hallazgos serológicos (58); la serología luego de la vacunación puede resultar positiva por 1 a 3 meses (117).

Aunque los títulos continúen negativos luego de un muestreo pareado, el aislamiento de Leptospiras de animales con seronegatividad, si bien es poco común, hay que tenerlo en cuenta a efectos de no descartar esta enfermedad (8).

Little en 1980 reporta que muchos animales clínicamente sanos tienen anticuerpos contra Leptospiras, siendo su significado poco claro (80).

Un número de trabajadores ha apuntado que la infección por Leptospira hardjo no estimula altos títulos detectables en la prueba de aglutinación microscópica y han sugerido que valores de 1/40 a 1/50 pueden ser usados como altos títulos (80).

Ellis y col en 1976 aislan Leptospiras de fetos donde los títulos serológicos de las madres fueron de sólo 1/100 a 1/300 (41).

En otro reporte el mismo autor encuentra en un brote de mastitis que los títulos en sangre se elevan hasta llegar en algunos casos a 1/300.000 (40). También afirma que la presencia de altos valores en el suero del ganado que nunca mostró signos clínicos indica que la infección subclínica ocurre en muchos casos.

Ellis y Michna en 1976, interpretan los hallazgos serológicos con el siguiente criterio: dilución 1/10 fuertemente positivo, indica una exposición pasada; un título de 1/300 positivo indica una infección reciente.

Un título de 1/100 según Michna(1970) indica la presencia de una infección actual o pasada no implicando con ello la posibilidad de aborto del animal.

En un estudio realizado sobre 131 bovinos, durante una enzootia, más de 50 demostraron positividad a L.grippotyphosa, sin embargo ninguno de los animales presentó signos clínicos (8).

El criterio seguido en la Universidad de Cornell (Estados Unidos) es considerar positivos a los animales reaccionantes a la dilución 1/1600, sin embargo las muestras pareadas son necesarias para confirmar el disgnóstico.

Según Myers, incluso los distintos medios de cultivo pueden llegar a variar los títulos de la aglutinación microscópica (92), sin embargo, ésto no se considera actualmente como diferencias realmente importante (68).

Por otro lado, se han desarrollado distintos métodos para la detección de anticuerpos presentes en suero sanguíneo (ELISA,prueba macroscópica en placa, fijación de complemento, etc.) pero no son usados habitualmente en nuestro país.

Ante esta variación en los datos sobre la serología, se considera que sólo las muestras pareadas de suero obtenidas con 10 a 15 días de intervalo, pueden llegar a ser valiosas para una aproximación en el diagnóstico de esta enfermedad. Aún así,hacen falta estudios tendientes a esclarecer definitivamente el significado de los resultados serológicos.

1.8.MASTITIS A LEPTOSPIRAS:

En 1947 Baker y Little (16)(Cit.por 86), observan una espiroqueta no identificada en el fluído alantóideo de huevos embrionados inoculados con sangre de cobayo al cual se le había inyectado leche anormal. También reprodujeron el síndrome en forma experimental en vacas lactantes.

Fenestad y Borg-Petersen describen en 1958, dos casos de Leptospirosis donde los animales abortaron, aislando a partir de orina de uno de ellos Leptospira pomona. Los primeros síntomas observados fueron pérdida de apetito, leche teñida de sangre y una leve ictericia. Los animales se recuperaron en dos semanas siendo entonces la leche de aspecto normal (49).

Hengl y col (1958) en Hungría describen un proceso de mastitis producida por L.pomona o L.hyos (=tarassovi). Los autores reprodujeron la enfermedad en forma experimental y lograron el aislamiento a partir de leche unos pocos días post inoculación (61)(Cit.por 86).

En un brote en Nueva Zelandia, Kirschner y col (1952) observan que la producción de las vacas lecheras sobrevivientes a la enfermedad pueden sufrir un daño en la ubre con cesación subsecuente de la lactación (77)(Cit.por 8).

Alston y Broon en 1958 afirman que en muchos casos entre vacas lecheras, los primeros signos son usualmente observados en la leche, la que se torna rosada y contiene coágulos de sangre. La secreción se ve reducida a veces a unas gotas de fluído viscoso; refieren además que L.grippotyphosa produce fiebre, hematuria y leche teñida de sangre, llegando algunos animales a morir por la enfermedad.

Estos autores afirman que en un 47% de los casos de Leptospirosis, existe una reducción de la producción láctea, ocupando el primer lugar los abortos; agregando que L.canicola es capáz de producir pérdida de apetito, ictericia, hemoglobinuria y menor producción láctea (8).

Mitchell y Boulanger (1959), informan que numerosos brotes se produjeron en el área de Ottawa (Canadá) donde los síntomas observados fueron abortos y mastitis atípicas. Los estudios llevados a cabo en las leches mastíticas dieron resultados negativos

a los microorganismos ordinarios, sin embargo éstas mostraban un conteo celular alto. Los cuatro cuartos mamarios estaban afectados, aislando de dos animales (serológicamente negativos) L. pomona de leche por inoculación a cobayos, y de uno de ellos de orina cuando era positivo 1/1000. Es importante destacar que de uno de los bovinos de los cuales se aisló Leptospiras a partir de leche, recibió un día antes penicilina por vía intra muscular y una infusión intra mamaria en los cuatro cuartos conteniendo penicilina, dihidroestreptomicina, neomicina y polimixina B (86).

Mitchell y col (1960) logran, inoculando leche de animales afectados, transmitir Leptospiras por vía intra mamaria. Esto podría tener importancia en la contaminación de la máquina de ordeño.

Robertson, Boulanger y Mitchell en Ottawa comunican un brote de mastitis y abortos ocurridos en 1961, donde 4 vacas revelaron un tipo atípico de mastitis caracterizado por ubres flácidas y secreción grumosa amarillenta, uno de los animales abortó 15 días después de presentar los síntomas enunciados. Aislaron en esta oportunidad a partir de orina de estas vacas, L.hardjo; recalcando los autores la necesidad de realizar 8 pasajes ciegos a través de cobayos para lograr luego el desarrollo en medio Fletcher. Los intentos de aislamiento en sangre y leche fueron negativos (104).

Stoenner y col en 1963 en Estados Unidos al describir la manifestación neurológica de una vaca lechera de la cual se aisló L.pomona a partir de líquido céfalo raquídeo, presentó en primera instancia anemia, hemoglobinuria y todos los cuartos blandos conteniendo leche manchada de sangre. Microscópicamente la glándula mostró que los alvéolos estaban libres de sangre pero contenían neutrófilos de unas pocas células dispersas en secreción coagulada, a una masas moderadamente densas a veces asociada con una completa disolución de epitelio alveolar (119).

Sulzaer y col en 1964 comunican que en un rodeo de 27 animales en Estados Unidos, 4 mostraron secreción de leche amarilla, con disminución de producción; de éstos, dos abortan posteriormente. Aislan en esa oportunidad L.hardjo en medio Fletcher a

partir de orina diluída en solución fisiológica (126).

Sullivan y Stallman en 1969 en Australia, hacen referencia a la dificultad de aislamiento que presenta L.hardjo,asociando a esta serovariedad con casos de descenso brusco de producción de leche, mastitis atípica y aborto (122).

Michna en 1970 en una revisión sobre Leptospirosis resalta que la mastitis desempeña un importante rol dentro de la sintomatología clínica de la enfermedad. Leptospira canicola,grippotyphosa, hardjo y pomona tanto en las formas agudas, sub agudas y crónicas serían responsables de este sindrome (84).

Sullivan y Callan en 1970 en Australia en un rodeo de 300 vacas en lactancia, donde aproximadamente 30 estaban afectadas, el primer síntoma observado fue un descenso del 30% de la producción, acompañado de fiebre, depresión e inapetencia que se sumaron a ubres flácidas donde todos los cuatro cuartos estaban afectados. La leche era amarilla con pequeños grumos y ocasionalmente presencia de sangre. No intentaron el aislamiento a partir de leche, pero se aisló L.hardjo de muestras de orina (125).

Estos autores opinan que debería tenerse en cuenta la infección por L.hardjo en el diagnóstico diferencial de los brotes de mastitis cuando los procedimientos bacteriológicos de rutina resulten negativos.

Corbould en 1971, en Tasmania (Australia) informa que la infección por Leptospiras del serogrupo Hebdomadis ha afectado extensamente al ganado de carne y leche durante los años 1969/70, produciendo pérdida de la producción de leche,mastitis y abortos. De 7 rodeos donde 1 a 16 animales fueron afectados, el único síntoma observado fue una súbita pérdida de la producción, aislando L.hardjo a partir de orina en 3 de ellos (31).

Davidson en 1971 en Highlands (Australia) reporta un considerable número de Leptospirosis debida a L.hardjo en el ganado lechero, los síntomas, al igual que los casos anteriores consistieron en ubres flácidas, leche amarilla o teñida de rojo por sangre. Algunos animales abortaron un tiempo después de presentar la mastitis (33).

Hoare y Claxton en 1972 en New South Wales (Australia) informan sobre una marcada pérdida de producción láctea (50 al 90%)

en donde L.hardjo fue aislada de orina de algunos animales. Todos los cuatro cuartos estaban afectados; la mayoría de las vacas afectadas recuperaron su producción en 2 semanas. De un 5 a 10% de los animales que padecieron de mastitis abortaron en 6 a 12 semanas después de los primeros síntomas clínicos. Cifras superiores al 10% de 600 tambos reportaron que más del 50% de los animales estuvieron afectados, sumado a infecciones subclínicas que bajaron el total de leche producido (65).

Michna, Ellis y Dikken en 1974 en Inglaterra reportan casos de abortos en un rodeo lechero; previamente estos animales habían presentado leche teñida de sangre sin evidencia de mastitis. Leptospira hardjo fue aislada en medio Stuart a partir de riñones de dos vacas sacrificadas (85).

Ellis, O'Brian,Pearson y Collins en 1976 en Irlanda realizan el primer aislamiento en el mundo de L.hardjo a partir de leche y sangre de vacas con síntomas de mastitis. Setenta de ciento cuarenta animales se vieron afectados por una brusca disminución o cesación de la producción láctea. Las leches retornaron a su apariencia normal en 2 semanas. Se aisló L.hardjo sólo por pasaje por hamster y los primeros desarrollos ocurrieron en medio Ellinghausen modificado (EMJH). La presencia de Leptospiras en la ubre pareció estar asociado con la fase bacteriémica de la infección (40). Los autores postulan como posible vía de infección, en concordancia con Mitchell (1960), la contaminación del equipo de ordeñe.

Ellis y Michna en 1976 en un estudio serológico realizado sobre 29 rodeos indican que algunos casos de abortos estuvieron precedidos por mastitis similares a las descriptas por otros autores. Los anticuerpos encontrados en suero sanguíneo pertenecieron al grupo Hebdomadis en títulos de 1/300 (41).

Andreani y col en 1979 en Italia, describen un grave foco de Leptospirosis debida a L.hardjo, en donde abortaron 19 vacas.Los síntomas fueron abortos, mastitis atípica, fenómenos de hipogalaxia y queratoconjuntivitis (9).

Higgins, Harbourne, Little y Stevens en 1980 en Surrey (Inglaterra) reportan en diferentes campos casos de mastitis y abortos debidos a la serovariedad hardjo. En uno de ellos el 50% de 250

vacas se vieron afectadas, estando todos los cuartos mamarios flácidos y con leche semejante al calostro. Globalmente hubo una enorme pérdida de producción láctea; los animales sin embargo no perdieron el apetito. Las vacas se recuperaron en 2 a 5 días con o sin tratamiento. Los casos clínicos de mastitis continuaron ocurriendo por espacio de 6 semanas y durante ese período 2 vacas abortaron (64).

En otro de los tambos hubo una inexplicable pérdida de producción láctea por un lapso de 2 meses. Si bien no se notaron síntomas de mastitis, 5 vacas abortaron durante período. La pérdida representó el 33% de la Producción. Se aisló L hardjo de 2 muestras de leche en medio Ellinghausen modificado (EMJH) semisólido con 150 ug/ml de 5-Fluorouracilo. La presencia de Leptospiras en leche fue el resultado directo de la Leptospiremia. A diferencia de lo que ocurre con la mastitis a L. pomona, en esta oportunidad no observaron leche teñida de sangre en más de 100 vacas afectadas.

Pearson y col en 1980, resaltan la incidencia en aumento de este sindrome en el Reino Unido, recalcando asimismo la importancia económica del mismo. Por otro lado, informan que existe evidencia probada de la enfermedad clínica en humanos, particularmente en trabajadores rurales (100).

Thiermann en 1981, en Estados Unidos reproduce experimentalmente la enfermedad con L.hardjo y L.szwajisak en bovinos, logrando el aislamiento a partir de leche sólo cuando utiliza el medio Ellinghausen modificado (EMJH) sólido. Sin embargo las Leptospiras fallaron en el crecimiento excepto cuando éste fue enriquecido con pyruvato de sodio o suero de conejo al 5%. Los cultivos obtenidos de leche fueron realizados durante los primeros 10 días de la mastitis y antes de la aparición de anticuerpos en ella (129).

El mismo autor en 1982 comunica que en la reproducción experimental citada, durante la fase aguda de la infección, las vacas mostraron signos clínicos suaves, sin embargo las mastitis fueron observadas en todos los animales. Las diferentes serovariedades de Leptospiras y los diferentes orígenes de las cepas parecen tener un rol significante en la severidad de la infección (130).

Hathaway, Little y Stevens en 1982 en Inglaterra, encuentra que seguido a un brote de mastitis y posterior aborto de vacas aislan L.hardjo de fetos. Afirman además que la mastitis debida a esta serovariedad y el aborto, se incrementaron marcadamente durante 1981 en ese país (59).

En Argentina a partir de la revisión bibliográfica sobre el tema que nos compete, notamos una carencia de investigaciones sobre Leptospirosis, en su relación específica o directa con las mastitis bovinas. No hemos detectado intentos de aislamiento ni tareas experimentales complementarias.

Cacchione y col en 1961, comunican el aislamiento de una cepa de L. canicola en la localidad de Venado Tuerto (Santa Fe). Destacan la alta mortandad de terneros observada e indican que algunas madres presentaban alteración de la producción láctea, con una leche densa y aspecto filante. En esa misma comunicación relatan el aislamiento de una cepa de L.pomona apartir de terneros de un establecimiento de Marcos Juárez. También informan sobre la disminución de la producción láctea y denuncian la presencia de coloración amarilla-cremosa en la leche de algunas vacas del mismo establecimiento(23).

Igualmente Aguirre y col en 1967, estudiando 4 brotes de mortandad de terneros, logran el aislamiento de una cepa de L.canicola, resaltando que las vacas no presentan sintomatología (4).

Aguirre y col en 1968, comunican el aislamiento de una cepa de L. pomona a partir de agua de bebedero de un establecimiento de la Provincia de Buenos Aires; donde se producían abortos, mastitis y mortandad de terneros. Si bien obtienen muestras de diversos materiales, entre ellos leche, no detallan la metodología empleada en los estudios microbiológicos ni tampoco señalan claramente si las leches fueron procesadas o no. En definitiva no se obtienen datos que puedan relacionar las mastitis y la cepa aislada, quedando sí en claro la importancia del agua de bebida como receptáculo de las contaminaciones producidas por los reservorios y como fuente de infección para los bovinos (5).

Cacchione en 1981 en una revisión sobre el tema, recalca el problema sanitario que representa la secreción de leche sangui-

nolenta, con grumos y aspecto filante, además de la importancia económica de la disminución de la producción (28).

Habich y col. en 1983, describen una "tormenta" de abortos en un establecimiento de la Provincia de Salta, en el cual también resaltan que la producción láctea era de 2 a 3 litros diarios por animal, siendo la presentación de la leche de aspecto normal. La serología encontrada fue alta para las cepas L.pomona y L.wolffi, considerando los autores que esta última es de significación "no clara". Sin embargo el aislamiento en repetidas oportunidades de L.hardjo a partir de órganos de bovinos, equinos y armadillos aclararía esta situación. Debemos recordar que tanto L.wolffi como L.hardjo pertenecen al mismo serogrupo y responden con una reacción serológica cruzada inherente al mismo. En el trabajo descripto tampoco se realiza el intento de aislamiento de ningún material (57).

Como denominador común las mastitis causadas por Leptospiras muestran una marcada disminución en la producción láctea y una variada gama de manifestaciones clínicas que van desde la ausencia de signos al compromiso total de la glándula, mostrando positividad a la prueba californiana para mastitis (C.M.T.). También hay variedad en la presentación de las leches que podrán ser viscosas, grumosas, de color amarillo o rosado debido a la presencia de sangre. La recuperación se efectúa en 1 a 3 semanas, no retornando habitualmente a su producción anterior.

Queremos finalmente destacar que trabajos como el de Tessi y col (128), Giraudo y col (54,55), y otras numerosas investigaciones centralizadas en la búsqueda de agentes bacterianos productores de mastitis bovinas, omiten el estudio de Leptospiras como posible agente causal del síndrome nombrado (15,53,97,11).

1.9.SOBREVIVENCIA DE LEPTOSPIRAS EN LECHE:

Bernikof y col en 1948 determinan que L.grippotyphosa patógena puede sobrevivir 3 días en leche sin diluir (18)(Cit. por 84).

Kirshner, Miller y Garlik en 1952, demostraron que las Leptospiras sobreviven escaso tiempo en leche cruda (30 min) pero el microorganismo permanece vivo 60 días en leche diluída (77)(Cit. por 36 y 84).

El mismo autor en 1957 encuentra en la leche un agente antileptospiral que actúa en sólo 45 minutos,dañando el cilindro protoplasmático (78)(Cit.por 36).

Stalhein en 1965 demostró que los lípidos del riñón y la leche son los inhibidores del desarrollo de las Leptospiras ya que ejercen un profundo efecto de lisis (115).

Shigekawa y Stocktmon demostraron que las Leptospiras sobreviven por lo menos ocho meses en leche desnatada cuando se conservaron en hielo seco (Cit.por 36).

Dorta en 1965 observa que cuando se agrega una gota de leche al medio de cultivo,disminuye el desarrollo con respecto al tubo control;mientras que si se colocan 3 gotas sólo se observan muy pocas Leptospiras vivas (36).

1.10.SEROLOGIA EN SUERO LACTEO:

La bibliografía sobre este tema es escasa y contradictoria. Van der Hoeden en 1955 realiza la serología comparada en suero lácteo y sanguíneo;indicando que la prueba en leche es específica.Raramente encontró resultados negativos en leche cuando había positividad en sangre a altos niveles.Trabajó con brotes de Leptospirosis naturales en bovinos.Los títulos fueron muy variables; animales positivos en suero sanguíneo 1/200,en leche sus valores variaron de negativos a 1/64;los positivos en sangre 1/1000 lo fueron en leche de negativos a 1/320;mientras que los positivos en sangre 1/2000 correspondieron a valores de negativos a 1/512 en suero lácteo (66).

Morse y col. en 1955 demostraron anticuerpos en leche por períodos de hasta 29 meses luego de la infección.En general los mayores títulos fueron encontrados entre vacas que habían estado en lactancia por menos de un mes.Luego de cuatro meses,los títulos se negativizaban,y si estaban presentes no superaban diluciones de 1/10.Los autores observaron considerable variación en su persistencia en vacas individuales.No se demostraron anticuerpos en suero de leche en animales cuyos valores sanguíneos eran de 1/10 a 1/100. Los mayores títulos de anticuerpos en suero lácteo fueron observados en vacas que habían padecido recientemente la infección,enfatizando que los títulos persisten en suero lácteo por muchos meses seguido a la infección (87).

Nicol y col en 1960, trabajando con yeguas y titulando antitoxina tetánica, determina que la mayor concentración en la mama sucede en el calostro, siendo los anticuerpos 4 a 5 veces más concentrados que en suero sanguíneo (96).

Cabrey en 1961, recomienda el uso de la prueba de aglutinación microscópica en leche cuando la recolección de sangre resulta dificultosa, o a efectos de tener una visión generalizada de los anticuerpos presentes en los animales. Sin embargo los resultados negativos no pueden considerarse conclusivos; pareciendo ser los títulos mayores en vacas que recién comienza la lactancia(30).

Derbyshire en 1962, realiza una revisión sobre los conocimientos de la inmunidad en la glándula mamaria. En ésta, hace referencia a que el epitelio mamario de las vacas forma una barrera impermeable al pasaje de anticuerpos. Sin embargo, la permeabilidad se incrementa en la época del parto, donde los anticuerpos son detectados en el calostro al mismo título que en suero sanguíneo. También se ha presentado evidencia que los anticuerpos pueden pasar del suero a través del epitelio glandular en el final de la lactancia (34).

Fenestad y Borg-Petersen en 1962 estudiaron los títulos en vaquillonas infectadas artificialmente. Los valores calostrales fueron 3 a 10 veces superiores que en suero sanguíneo, pero luego de 24 hs decrecieron a niveles de 1/10 a 1/100. No pudieron detectar anticuerpos a la dilución de 1/30 veintiseis días después, en contraste con los hallazgos de Morse y col (Cit.por 30).

Cabrey indica que el hallazgo más notable fue encontrar títulos en suero lácteo negativo a 1/40 cuando en sangre correspondían a 1/10; mientras que en otros casos vacas con títulos en suero sanguíneo 1/1000 tenían niveles en suero lácteo de negativo a 1/640. La variación entre los cuatro cuartos no fue alta, coincidiendo en la mayor parte de los casos (30).

Baglioni y col en 1966 encuentran que los títulos sanguíneos de la vaca tienden a disminuir con el tiempo pero cuando se avecina el parto suben sus valores de 1/100 a 1/500.Los anticuerpos son concentrados en el calostro (14).

Hussaini en 1976 muestra que animales con altos títulos sanguíneos (1/100 a 1/1600), en leche los valores no superaron la dilución 1/64. El autor indica que en los resultados no existen diferencias notorias entre las distintas distribuciones de anticuerpos en sangre y leche. Sugiere que en concordancia con el título 1/100 sanguíneo catalogado como positivo por estar directamente relacionado con el título 1/4 en leche, también debería ser tomado como índice de positividad (67).

Ellis y Michna en Glasgow realizaron una reproducción experimental con L.hardjo en vaquillonas preñadas (1977). El mayor título calostral encontrado fue de 1/100.000, correspondiéndose con idénticos valores sanguíneos. Los máximos niveles fueron encontrados en las muestras recolectadas inmediatamente luego del parto, los que cayeron rápidamente en los tres días de lactación y persistieron a bajos niveles hasta 32 días (44).

Thiermann en 1981 afirma que los títulos encontrados en los terneros fueron similares a aquellos pertenecientes a la leche materna. Los niveles de anticuerpos en leche fueron paralelos y frecuentemente excedían los valores en suero sanguíneo, a veces en una a dos diluciones (129).

Cacchione y col realizan el control serológico en leche de 10 vacas infectadas naturalmente, 5 de ellas presentaron títulos de 1/100 a 1/500 (25).

1.11.POSIBLE INCIDENCIA ECONOMICA:

Resulta sumamente difícil determinar la incidencia económica real que pueda tener la Leptospirosis como tal, y menos aún tener una imagen acertada sobre la mastitis específicamente relacionada a ella. Aún así, los distintos autores han tratado de llamar la atención sobre el posible significado económico que ésta puede ocupar dentro de la producción lechera.

Mitchell y col en 1959 indican que la pérdida económica causada por reducción en la lactancia puede ser considerable especialmente si un gran número de vacas de un rodeo es afectado. Sumado a ésto, la producción individual no vuelve nunca al estado anterior de pre-infección (86).

Szyfres en 1964 llama la atención por la frecuencia observada de la interrupción o disminución de la producción lechera, acotando el significado que ello representa para la Argentina (127).

Cacchione en 1973 hace referencia al significado económico que representa la Leptospirosis para la ganadería de los países latinoamericanos donde no se ha logrado expresar en cifras las pérdidas producidas por abortos, menor producción de carne y leche etc (26).

Ellis y col en 1976 hacen referencia a que la disminución parcial o total de producción durante el período de enfermedad, sumado a la necesidad de aplicar antibióticos, causa una considerable pérdida económica (40).

Pearson, Greer y Ellis en 1980 indican que la proporción del ganado afectado puede variar de una vaca ocasional al 50% del rodeo. Económicamente el síndrome de menor producción láctea puede tener una marcada repercusión (100).

Las usinas lácteas también se ven afectadas al recibir leche en malas condiciones o con restos de antibióticos debido al tratamiento de los animales.

1.12.POSIBLE INCIDENCIA DE LEPTOSPIROSIS EN HUMANOS:

Si bien está muy discutida la posibilidad de transmisión de las Leptospiras a través de la leche, existen numerosos casos citados en la literatura mundial en donde no está suficientemente clara la vía de penetración del microorganismo, estando en muchos casos relacionados directamente con tamberos o su familia.

Bernikof y col (1948) cita un brote de Leptospirosis humana resultado del consumo de leche cruda de vacas convalecientes o enfermas infectadas con L.grippotyphosa (18)(Cit.por 84).

Szyfres cita en 1964 en Argentina el caso de un tambero que fue diagnosticado dudoso ya que pasó de una serología negativa a positiva 1/200 a L.pomona 2 meses después (127).

Michna en 1970 refiere que cuatro tamberos en Surrey revelaron síntomas de meningitis aséptica debida a L.hebdomadis (84).

Davidson en 1971 reporta la infección de dos hijos de un tambero, ocasionado por L.hardjo; las vacas de este establecimiento

presentaban síntomas de mastitis atípica. También informa que hubo casos de tamberos que mostraron signos de influenza diagnosticados como Leptospirosis. El autor sugiere que la infección humana por L.hardjo está mucho más difundida que lo habitualmente supuesto (33).

Corbould en 1971 informa de cuatro casos de tamberos enfermos en Tasmania (Australia) infectados con L.hardjo con síntomas de influenza (31).

Hoare y Claxton en 1972 comunican que numerosos casos humanos se reportaron coincidentes con más de 60 brotes de mastitis en Australia (65).

Ellis en 1976 dice:"El efecto antileptospiral de la leche y el hecho que la pasteurización destruye a las Leptospiras, indica que la infección humana por leche pasteurizada es muy improbable. Sin embargo el haber recuperado Leptospiras de leche de vaca luego de 4 horas de la recolección sugiere que la leche fresca puede constituir un peligro limitado a los trabajadores rurales".

Higgins en 1980 reporta el caso de dos tamberos que enfermaro aproximadamente una semana después que los primeros casos de mastitis fueron detectados (64).

Pearson finalmente en 1980 indica el riesgo humano que representa este sindrome de menor producción láctea en relación con los trabajadores rurales (100).

1.13.OBJETIVOS:

1.13.1.Investigar la presencia de Leptospiras en muestras de leche de bovinos de nuestro país, hecho no realizado o denunciado hasta el presente y teniendo en cuenta la importancia que mundialmente han adquirido las mastitis leptospirósicas.

1.13.2.En caso de lograrse aislamiento, tratar de correlacionar su hallazgo con las características de las mastitis y sintomatología clínica que muestren los animales.

1.13.3.Realizar contralor serológico a partir de suero lácteo. Se pretende de esta manera correlacionar la presencia de anticuerpos y los posibles aislamientos.

1.13.4. Estudiar comparativamente los títulos obtenidos a partir de suero sanguíneo con aquellos encontrados en suero lácteo.

1.13.5. En los casos de aislamiento, determinar las características biológicas de las cepas.

1.13.6. Mediante el procesamiento bacteriológico de muestras de leche comprobar la presencia de Leptospiras en las mismas y en qué medida serían éstas responsables de producir mastitis.

2.TRABAJO EXPERIMENTAL

2.1.MATERIAL Y METODOS:

La metodología de aislamiento empleada en este trabajo fue realizada de acuerdo a Baker y col (16), Hengl y col (61), Mitchell y col (86), Ellis y col (40), Higgins y col (64) y Thiermann (12,130), quienes lograron resultados exitosos empleando los mismos.

2.1.1.Toma de muestras:

Las muestras se extrajeron de animales con síntomas de mastitis sub aguda y aguda detectadas clínicamente y sub clínica detectadas por C.M.T. (Prueba Californiana para Mastitis).

En total se procesaron 212 muestras de leche procedentes de 15 establecimientos ganaderos; 42 de éstas fueron tomadas de animales clínicamente sanos en los cuales existía sospecha del inicio de brotes de Leptospirosis, correspondientes a dos tambos del partido de Carmen de Areco. La recolección fue efectuada durante el período 1983 - 1984.

Todos los tambos pertenecen a la Provincia de Buenos Aires, estando repartidos de la siguiente manera:Partido de Cnel.Brandsen:1; Partido de Carmen de Areco:7;Partido de Navarro:5;Partido de Luján:2.

Recolección:Las ubres fueron lavadas cuidadosamente y secadas con toalla de papel o papel higiénico esterilizados.

Luego se desinfectó el orificio del pezón con algodón embebido en alcohol 70°, teniendo la precaución de que éste no quede goteando del mismo.

Se eliminaron los primeros chorros de leche (31). Las muestras se colectaron entonces en tubos estériles con tapón de goma, de 10 ml de capacidad. En la recolección el tubo se coloca lo más horizontal posible procediendo al llenado del mismo.

Inmediatamente fueron refrigeradas o congeladas en hielo seco según posibilidad de arribo al laboratorio.

Luego de la siembra en los medios de cultivo y la inoculación al animal de laboratorio se controló el pH de las leches en forma sistemática.

Parte de las muestras fueron obtenidas de diversos establecimientos rurales por gentileza de Profesionales del Departamento de Patología Animal del CICV del INTA Castelar. El resto de las mismas fueron recolectadas en forma personal, controlando el estado sanitario de los animales.

2.1.2.Prueba Californiana para Mastitis C.M.T.:

El reactivo fue preparado en el Laboratorio de mastitis del INTA, compuesto por un detergente aniónico y un indicador de pH.

En la lectura de esta prueba se siguió el siguiente criterio: Negativo o Trazas:Negativo; valor 1+ y 2+:mastitis subclínicas; valor 3+: mastitis clínica. (°)

2.1.3.Medios de Cultivo:

Se utilizaron en este trabajo los medios de Stuart y Korthof, ambos líquidos y el semisólido de Fletcher que fueron preparados de acuerdo a la metodología aplicada por el Laboratorio de Leptospiras del INTA Castelar (24).

Se preparó asimismo el medio Ellinghausen (37,38) modificado por Johnson y Harris (72), sólido y semisólido enriqueciéndolo por la adición de suero de conejo a una concentración final del 8% (39,40).

Composición de los medios de cultivo:

a)Medio líquido de Stuart: Se utilizó el Stuart Medium Base (Difco,Detroit,Michigan.USA), el que se prepara rehidrantando 3,4 g en 1000 ml de agua destilada. Luego se controla el pH a 7,6 y se esteriliza por autoclave por 15 min a 121°C.

Se deja enfriar y se le adiciona un pool de suero normal estéril y levemente hemolizado de conejos clínicamente sanos a una concentración final del 10%. Todos los conejos se testaron previamente por aglutinación microscópica de sus sueros, utilizándose sólo los que tuvieron serología negativa.

Composición del STUART MEDIUM BASE (Difco)

Bacto Asparagina	0,132	g
Cloruro de amonio	0,268	g
Cloruro de magnesio.$6H_2O$	0,406	g
Cloruro de sodio	1,808	g
Fosfato disódico	0,087	g
Bacto-Rojo fenol	0,01	g

b)Medio semisólido de Fletcher: Se utilizó el Fletcher Medium Base (Difco),preparado por rehidratación de 2,5 g en 1000 ml de agua destilada, se autoclava a 121°C por 15 min, se deja enfriar y se agrega suero de conejo de las mismas características que para el medio Stuart y se inactiva a 56°C tres veces durante 30 min.

(°)Criterio utilizado en el Laboratorio de Mastitis,Patología Animal.INTA Castelar.

cada vez con intervalo de varias horas o de un día para el otro. El pH final del medio se lleva a 7,9 de acuerdo a la recomendación del fabricante (29).

Composición del FLETCHER MEDIUM BASE (Difco)

Peptona	0,3	g
Extracto de carne	0,2	g
Cloruro de sodio	0,5	g
Agar	1,5	g

c)Medio líquido de Korthof: Este medio está compuesto de la siguiente manera

Peptona Difco	0,800	g
Cloruro de sodio	1,400	g
CO_3 HNa	0,020	g
Cl_2 Ca	0,040	g
PO_4 H_2K	0,180	g
PO_4 HNa_2	0,960	g
ácido nicotínico	0,001	g
agua destilada	1000	ml

Se agregan las drogas al agua destilada en ebullición, se controla el pH y se filtra por papel de filtro; se esteriliza al día siguiente por autoclave a 1 atmósfera por 30 min (24). Se deja enfriar y se agrega suero de conejo al 8% (concentración final) y vitamina B 12 0,001 g. Se lleva a baño-maría a 56°C por 30 min 2 o 3 veces con intervalo de varias horas a un día.

d)Medio Ellinghausen modificado: Se utilizó el medio Ellinghausen (37,38) modificado por Johnson y Harris (72) en 1967. Soluciones stock separadas de los siguientes productos químicos se realizan en 100 ml de agua destilada

Zn $SO_4.7H_2O$	0,4	g
Ca $Cl_2.2H_2O$	1,0	g
Cl_2 Mg.$6H_2O$	1,0	g
Fe $SO_4.7H_2O$	0,5	g
Cu $SO_4.5H_2O$	0,3	g
Tween 80	10	ml

Preparación del medio Basal: Se utilizó el Leptospira Medium Base EMJH de Difco Lab (Detroit,Michigan USA) deshidratado. Para rehidratar el medio se procede a disolver 2,3 g en 900 ml de agua destilada. Se esteriliza por autoclave por 15 minutos a 121 °C. Este medio se preparó en dos formas a saber: semisólido 0,25% y

sólido 1%, usando agar noble (Difco).

Composición del LEPTOSPIRA MEDIUM BASE EMJH (Difco)

Fosfato de sodio dibásico	1,0	g
Fosfato monobásico de potasio	0,3	g
Cloruro de sodio	1,0	g
Cloruro de amonio	0,25	g
Tiamina	0,005	g

Se ajusta el pH a 7,4

Preparación del suplemento de albúmina: Se preparó el suplemento con la adición de 20g de albúmina bovina Fracción V (Sigma Chemical Company,St.Louis, USA) en 100ml de agua destilada. Se adicionan la siguiente cantidad en mililitros de solución stock lentamente sobre la solución de albúmina

Cl_2 Ca	2,0	ml
Cl_2 Mg	2,0	ml
SO_4 Zn	2,0	ml
SO_4 Cu	0,2	ml
SO_4 Fe	20,0	ml
Vitamina B12	2,0	ml
Tween 80	25	ml

Se lleva a un volumen final de 200 ml y se ajusta el pH a 7,4. Se esteriliza por filtración.

El medio albúmina completo se prepara por adición de 1 volumen de suplemento albúmina a 9 volumenes de medio basal. Se agrega suero de conejo estéril, inactivado previamente 40 min a 56° C a una concentración final del 8% (39,40).

e)Inhibidor de contaminación bacteriana: Paralelamente se suplementaron los medios de Korthof y Ellinghausen modificado semisólido con 5-Fluorouracilo (Fluoracilo,Lab.Roche),inhibidor éste de la contaminación bacteriana secundaria (70,136), el que se agregó luego de la adición de suero de conejo,en forma estéril. En este caso se modificó la técnica de preparación del medio de Korthof, inactivando el suero de conejo previamente y en forma separada del medio de cultivo ya que el 5-Fluorouracilo no resiste calentamientos superiores a 35° C (109).

Todos los medios fueron llevados a estufa a fin de realizar control de esterilidad y se almacenaron refrigerados. Antes de la siembra, fueron dejados 2 horas a temperatura ambiente o colocados en estufa por 30 minutos.

2.1.4.Metodología de siembra:

Una vez arribadas las leches al laboratorio se procedió a la siembra en los distintos medios de cultivo. Para ello se utilizó pipeta Pasteur colocando una gota de leche en cada tubo. En una parte de las leches se procedió a diluirlas aproximadamente 1/1000 en medio líquido de Stuart o Korthof y sembrarlas luego en medio Ellinghausen semisólido.

Para la siembra en medio sólido en placa, se usaron cajas de petri de 100 mm de diámetro, las que fueron sembradas con ansa y llevadas a incubación por 60 días a 28° C aumentando el tenor de humedad ambiente por adición de algodón humedecido en agua a efectos de evitar el resecamiento del agar.

El tiempo y temperatura de incubación del resto de los medios fueron los mismo que para el Ellinghausen sólido en placa.

2.1.5.Animales de experimentación:

Dada la dificultad que presentan algunas serovariedades de Leptospiras para su aislamiento, hemos considerado importante la incorporación de animales de laboratorio a fin de ampliar las posibilidades de éxito. Por lo tanto se utilizaron cobayos jóvenes (Cavia porcellus) de 200 g de peso y hamsters jóvenes (Mesocrisetus auratus) de 30 a 40 g de peso. Previa inoculación se verificó la temperatura corporal por vía rectal, descartándose aquellos que presentaron un estado febril.

2.1.6.Metodología de inoculación:

Los animales de experimentación fueron inoculados por vía Intra-peritoneal, según las técnicas rutinarias de aislamiento de acuerdo a Cacchione 1962 (24).

Para ello se procedió a mezclar leche de vacas diluyéndolas en PBS (Solución salina de Buffer Fosfato) y aplicando 2 ml por animal.

Composición de la Solución Salina de Buffer Fosfato (PBS)

Solución madre:

° $Na_2 HPO_4$ 10,96 g en 154,4 ml de agua destil.

°° $Na H_2PO_4 . H_2O$ 3,15 g en 45,6 ml de agua destil.

Solución de trabajo: Mezclar 40 ml de la solución madre con 100 ml de solución 0,85% de NaCl en agua destilada y diluir todo a 1 litro con agua destilada.

2)Los días 5, 6 y 7 post-inoculación se procedió a la toma de temperatura de los cobayos y hamsters a efectos de seguir curva térmica. Tosdos los animales fueron sangrados los días mencionados (presentaran o no hipertermia)por punción cardíaca, realizándose hemocultivos en los siguientes medios: Fletcher, Korthof, Stuart y Ellinghausen modificado semisólido (sin agregado de inhibidores de contaminación).

Para realizar la punción cardíaca de los hamsters fué necesario realizarlo bajo los efectos de la anestesia inducida por eter. A este fin se colocó un trozo de algodón embebido en el anestésico mencionado, dentro de un frasco grande con tapa a rosca. El hamster se toma de su caja con una pinza anatómica y se lo introduce en el frasco donde se deja hasta que los primeros efectos anestésicos se hacen sentir; es importante retirarlos inmediatamente ya que se producen muchas muertes debido a sobredosis. Una vez anestesiado se lo retira se realiza la punción cardíaca siguiendo las técnica habituales.

3)Entre los 15 y 20 días post-inóculo, se realizó extracción de sangre por punción cardíaca a efectos de valorar la aparición de anticuerpos, procesándose los sueros por la técnica de aglutinación microscópica, descripta más abajo.

4)Siete días después, los animales fueron sacrificados y necropsiados a fin de verificar posibles lesiones anátomo patológicas macroscópicas. En forma estéril se extrajeron pequeñas porciones de órganos con pipeta pasteur a saber: hígado,bazo,riñón;sembrándose en los medios de cultivo mencionados en el punto 2.

5)Un macerado de estos órganos se inoculó nuevamente a otro ani-

°Carlo Erba

°°Mallinckrodt

mal de laboratorio repitiendo la operación hasta el punto 4.

2.1.7.Prueba de Aglutinación Microscópica:

Se efectúa esta técnica a efectos de valorar los títulos específicos antileptospiras presentes en suero sanguíneo, líquido céfalo raquídeo, orina o suero de leche, de animales u hombre. Esta técnica es altamente específica y se realiza de la siguiente manera:

Son necesarios cultivos vivos de Leptospiras clonados, de activo crecimiento, con una densidad aproximada de 2 x 10^8 Leptospiras por mililitro para ser utilizados como antígenos; correspondientes a los serogrupos mencionados abajo y utilizándose las siguientes cepas:

SEROGRUPO	SEROVARIEDAD
Australis	bratislava,Jež Bratislava
Autumnalis	autumnalis,Akiyami A
Ballum	ballum,Castellon 3
Canicola	canicola,Hond Utrech IV
Cynopteri	butembo,Butembo
Grippotyphosa	grippotyphosa,Moskva V
Hebdomadis	wolffi,3705
Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae,Copenhageni M-20
Pomona	pomona,Marcos Juárez
Pyrogenes	pyrogenes,Salinen
Tarassovi	tarassovi,Perepilicin

Se realizan diluciones del suero comenzando según la especie: 1/25 en cobayos y hamsters y 1/200 en bovinos, con solución salina de Buffer Fosfato (PBS) pH 7,2

Cantidades iguales de antígeno y suero diluído son mezcladas e incubadas 1 1/2 a 4 horas a 30° C. Las mezclas de suero y antígenos son luego examinadas por microscopía en campo oscuro para visualizar aglutinación.

En caso de sueros positivos, los mismo se continúan diluyendo en factor 2 hasta valorar el punto final de aglutinación. Este es tomado como la dilución de suero que muestre 50% de aglutinación dejando 50% de células libres comparado con un cultivo control diluído 1/2 en PBS (68).

2.1.8.Detección de Anticuerpos en suero de Leche:

Se procedió con todas las leches procesadas a extraer el suero, realizándose la prueba de aglutinación microscópica, a efectos de determinar los títulos específicos antileptospiras secretados por la glándula mamaria.

Para extraer el suero se colocó en cada tubo 1 o 2 gotas de cuajo líquido bovino comercial(+),se deja a temperatura ambiente una a dos horas y se centrifuga a 2000 rpm por 15 minutos; luego se extrae con pipeta Pasteur el suero cuidando de no pipetear la capa de grasa que queda sobrenadando.

Se partió de diluciones iniciales del suero de leche de 1/10 realizadas en PBS, enfrentándose con los serogrupos mencionados en el punto 2.3.7. Paralelamente se realizó un control rutinario de aglutinación. Las diluciones se continuaron en base 2 a saber: 1/20, 1/40, 1/80, 1/100, 1/120, 1/140, 1/160, 1/180 y 1/200.

2.1.9.Prueba de Aglutinación Microscópica en suero Sanguíneo:

En todos los casos en que nos fue posible, se extrajeron muestras pareadas de sangre y leche de un mismo animal; las mismas totalizaron 61.

La sangre fue extraída de la vena coccígea media inmediatamente después de la recolección de leche y en el mismo brete de ordeño. El suero sanguíneo fue procesado siguiendo la técnica de aglutinación microscópica descripta en 2.3.7. partiendo de diluciones 1/200. Siempre que en las leches aparecieron serovariedades no encontradas a esta dilución en la muestra correspondiente en sangre, se procedió a realizar diluciones más bajas empleando las mismas que para suero lácteo.

(+)Lab.CHR.Hansen,Quilmes,Argentina.

2.2.RESULTADOS:

A)Se analizaron un total de 212 muestras de leche, todos los intentos con las mismas para lograr aislamientos de Leptospiras fueron negativos, no observándose cultivos sospechosos. Los animales de experimentación (cobayo y hamster) no evidenciaron signos de enfermedad ni elevación de la temperatura corporal; los hemocultivos procedentes de los mismos fueron negativos. En las necropsias no se visualizaron lesiones macroscópicas que hicieran sospechar la presencia de Leptospiras, y la serología practicada en estos animales no mostró presencia de anticuerpos.

Con los cultivos de leche en medio sólido en placa no se logró en ningún caso finalizar la incubación de 60 días. Al prepararse éstos sin inhibidores de contaminación, implicó que a las pocas semanas las placas estuvieran prácticamente cubiertas con contaminantes; los hongos en ciertas ocasiones cubrieron rápidamente las mismas.

En los medios Korthof y Ellinghausen semisólido en que agregó el inhibidor de contaminación 5-Fluorouracilo, éste cumplió su acción en forma efectiva, pudiéndose llevar las experiencias hasta el término de 60 días.

En los medios Stuart y Fletcher en que éste no fue agregado, similarmente a lo ocurrido en el medio en placa, la contaminación fue muy alta, lo que obligó a descartar los tubos antes de cumplirse el lapso previsto.

B)El las 212 muestras de leche se realizó la prueba de aglutinación microscópica: 77 (36,3%) fueron negativas y 135 (63,6%) positivas, habiéndose considerado el valor de dilución de 1/10 como positivo (Gráf.1).+ De las positivas 58 (43%) poseían coaglutininas; de éstas 14 (24%) fueron a más de 3 serovariedades.

La distribución de frecuencias de las distintas serovariedades encontradas está representada en los gráficos 2 y 3. Ningún animal mostró positividad a la serovar canicola tanto en sangre como en leche por lo que no se la incluye en tablas ni gráficos.

En muy pocas ocasiones se encontraron valores que superaron la dilución 1/100, llegando un sólo animal a títulos de 1/200. Los valores se centraron en la dilución 1/10 (gráf.4); la distri

+En gráficos y tablas los nombres de las serovariedades han sido abreviados con las 3 o 4 primeras letras de los mismos.

bución por serogrupo está representada en la tabla 1; la mayor frecuencia correspondió a L.wolffi, seguida de pomona y tarassovi, la diferencia a favor de la primer serovariedad es de alta significación estadística (Prueba de Chi cuadrado).

Con referencia a los distintos grados de mastitis, las mismas fueron clasificadas como normal, subclínica y clínica aguda; las cuales representaron el 20, 53 y 27% respectivamente del total de muestras. El mayor porcentaje de suero lácteo positivo correspondió a las mastitis clínicas (38%), luego la subclínica (36,6%) y los menores en leche normal (34,4%), sin embargo estas diferencias muestran no ser importantes. La tabla 2 y el gráfico 5 representan la distribución por títulos de los distintos tipos de mastitis.

Los valores de anticuerpos antileptospiras encontrados en suero sanguíneo correspondientes a 61 muestras, representaron un 96,8% de positividad, siendo las serovariedades pomona, wolffi y tarassovi las de mayor incidencia. El gráfico 6 representa la frecuencia de las distintas serovariedades, indicando asimismo el porcentaje correspondiente a cada una de ellas.

La mayor frecuencia de positividad se centro en la dilución 1/200 (tabla 3). Se tiene en cuenta que la misma es considerada como valor inicial positivo. El gráfico 7 indica la distribución de títulos y frecuencia encontrada en tres serovar.

También a efectos de comparar los valores encontrados en suero sanguíneo y lácteo se procedió en 61 oportunidades a extraer en forma pareada las muestras. La tabla 4 brinda un panorama de la relación existente entre ambos con referencia a la serovar homóloga.

A partir de los datos obtenidos, se realizó una prueba de asociación para verificar la independencia entre las muestras.

En las 61 muestras de leche 22 (36%) fueron negativas y 39 (64%) fueron positivas.

	Positivas	Negativas	total
Leche	39	22	61
Sangre	59	2	61

No se pudo sostener la hipótesis de independencia respecto de la positividad de las muestras según se trataran de leche o sangre, por lo que no podemos asegurar que la mayor positividad en sangre y la menor positividad en leche se deba al azar del muestreo (Prueba de Chi cuadrado:0,001).

Se realizó el mismo procedimiento estadístico a efectos de comparar los sueros positivos en sangre y en leche con respecto a la serovariedad homóloga (wolffi,pomona y tarassovi). La mayor positividad en suero sanguíneo es estadísticamente significativa y por lo tanto no corresponden al azar tanto para wolffi (Chi cuadrado:0,01) como para pomona (Chi cuadrado:0,001); no sucedió lo mismo con la serovar tarassovi (Chi cuadrado:0,5 a 0,10).

Por otro lado cuando se relativiza cada serovariedad con la totalidad de positivos de cada muestra se observa un comportamiento escencialmente similar (Graf.11).

La tabla 8 y el gráfico 8 indican la presencia a las distintas serovariedades observadas en 61 muestras de leche correspondiente a las procesadas en forma pareada con suero sanguíneo.

Las tablas 5, 6 y 7 muestran en las tres principales serovariedades la comparación entre los valores de leche y sangre; observándose valores tan altos como 1/3200 a 1/6400 en suero sanguíneo siendo negativos en suero lácteo. A la inversa en la serovariedad wolffi, y en menor medida en pomona y tarassovi, se visualiza positividad en suero lácteo, mientras que en sangre corresponde con valores negativos.

Los gráficos 8, 9 y 10 muestran una visión generalizada en positividad, serovariedad y títulos encontrados en 61 muestras de suero sanguíneo (8), 61 de suero lácteo correspondiente a la toma pareada (9) y 212 muestras de leche (10); en donde se puede observar la curva de puntos máximos por títulos y serovariedad presente en cada tipo de muestras.

2.3.DISCUSION:

En el presente trabajo, las vacas fueron elegidas de rodeos en los cuales en la mayoría de los casos no existía sospecha de Leptospirosis ni antecedentes de vacunación. Sólo en 2 de ellos se presentaron abortos de origen desconocido al final de la gestación, siendo considerados como sospechosos.

El intento de aislamiento con resultados negativos realizado en 212 bovinos distribuídos entre 15 rodeos, indicaría que la incidencia de la mastitis a Leptospiras no sería tan alta como podría suponerse. Una posibilidad de la falta de aislamiento sería debido a la presencia de anticuerpos en un 63% de los casos, que es lógico suponer que actuarían como inhibidores de estos microorganismos (129).

Se realizó una anamnesis exaustiva con los propietarios o encargados de los establecimientos a los fines de constatar si hubo o había caída brusca de producción de leche en animales aislados o en grupo, como así también alteraciones de la leche como ser presencia de sangre o grumos asociado a falta de signos de inflamación de la glándula; obteniéndose en casi todas estas encuestas resultados negativos. Hicimos también incapié en el conocimiento de animales tratados con antibióticos, tanto por vía sistémica como intramamaria, a efectos de no extraer material de los mismos.

A pesar de haber seguido la metodología de aislamiento empleada por otros autores, encontramos un alto desarrollo bacteriano secundario. Es de suponer que esta flora asociada correspondería a los microorganismos productores de mastitis, los cuales serían sensiblemente menores en casos de etiología leptospirósica. Sin embargo con los procedimientos culturales empleados en este trabajo, se comprobaría que el agregado de un inhibidor de la flora bacteriana asociada, es estrictamente necesario cuando se trabaja con muestras de leche. En este caso se utilizó el 5-Fluorouracilo dando un resultado exitoso.

Idealmente se debió realizar una dilución seriada de todas las muestras procesadas tal como lo recomienda Thiermann (129) hecho que sólo se pudo concretar con una parte de las mismas por carecer de una adecuada cantidad de medios de cultivo.

Con referencia al suero lácteo, se partió de diluciones de 1/10. Los títulos encontrados no concuerdan con los hallados por van der Hoeden (1955); ya que en ningún caso encontramos títulos superiores a 1/200, a diferencia de este autor en donde los valores en sangre de 1/2000 corresponderían a 1/512 en suero lácteo.

Morse et al no encontraron anticuerpos en leche cuando los títulos sanguíneos eran de 1/10 a 1/100; mientras que en este tra-

bajo a estos títulos correspondieron en leche a 1/20, si bien la frecuencia analizada a esta dilución ha sido baja.

Existen coincidencias en los valores dados por Cabrey y col (1961) quien encontró sueros negativos y leche positiva hasta valores incluso tan altos como 1/80. Por otro lado no coinciden en los títulos mayores ya que cuando en sangre eran de 1/1000 encontraron valores de hasta 1/640 en leche; mientras que nosotros hallamos que la dilución 1/1600 en sangre, en leche no superaron títulos de 1/80.

Nuestros datos coinciden con los hallados por Hussaini en 1976, sin emabrgo disentimos en considerar que no existen diferencias notorias entre las distintas distribuciones de anticuerpos.

Ellis y Michna en 1977, sostienen que los anticuerpos en leche estuvieron presentes por 32 días, mientras que Fenestad y Borg-Petersen no encuentran anticuerpos 26 días post-parto. En cambio Morse en 1952 manifiesta que éstos persisten por 4 meses. Si bien no se han constatado la persistencia de los mismos, al trabajar con 15 rodeos diferentes y con distintos animales, es de suponer que se abarcaron períodos diversos post-contacto con Leptospiras, por lo que coincidiría con los trabajos de este último autor indicando que la persistencia de los mismos es de larga duración. Habría que realizar futuros estudios tendientes a determinar la persistencia de los mismos mediante reproducción experimental de este síndrome.

De los análisis estadísticos realizados, se observa la falta de asociación de positividad en suero de leche y sangre, por lo que la prueba de aglutinación microscópica en suero lácteo no sería apta para valorar el índice de infección que presenta el ganado. Sin embargo, es importante recalcar la coincidencia de distribución relativa del total de positivos de cada muestra (suero de leche y sangre).

El haber encontrado animales positivos en leche y negativos en sangre (tablas 4, 5, 6 y 7), nos podría estar indicando tal como lo afirman ciertos autores (Derbishire,1962; Galan,1984+) que la glándula mamaria es una fuente de producción de anticuerpos locales cobrando en este caso importancia la Ig A, ha-

+Galan,J.;Cornell University, Ithaca,N.Y.; U.S.A.,1984 (Com.Pers)

bitualmente considerada de poco valor en el bovino (131), pero que podría explicar esta serología.

La incidencia serológica de las distintas serovariedades encontradas en 212 muestras de leche, concuerda con aquellas halladas en suero sanguíneo de bovinos de nuestro país (27,28), hecho coincidente con los datos obtenidos a partir de las muestras de leche y sangre tomadas en forma pareada.

Finalmente ciertos autores afirman que el paso de anticuerpos de la sangre al alvéolo en los cuartos mamarios mastíticos se vería aumentado (11,144), por el contrario nosotros no hemos encontrado diferencias entre los distintos animales muestreados (normal, mastitis subclínica, mastitis clínica).

2.4.CONCLUSIONES:

1)Al no lograrse aislamientos, se podría concluir que la mastitis a leptospiras desempeñan un escaso papel dentro del rango de agentes etiológicos productores de mastitis. Sin embargo, debido al alto porcentaje de leches poseedoras de anticuerpos, son necesarios mayores estudios centrados en animales que sean serológicamente negativos tanto en leche como en sangre y su seguimiento en el tiempo.

2)La prueba de aglutinación microscópica en leche no se correlaciona con los títulos en suero sanguíneo; diferencias altamente significativas fueron encontradas también para las serovariedades wolffi y pomona consideradas aisladamente, no sucediendo lo mismo con la serovar tarassovi. No se tiene en claro las razones de ello, siendo necesarios futuros estudios a fin de explicar estas diferencias.

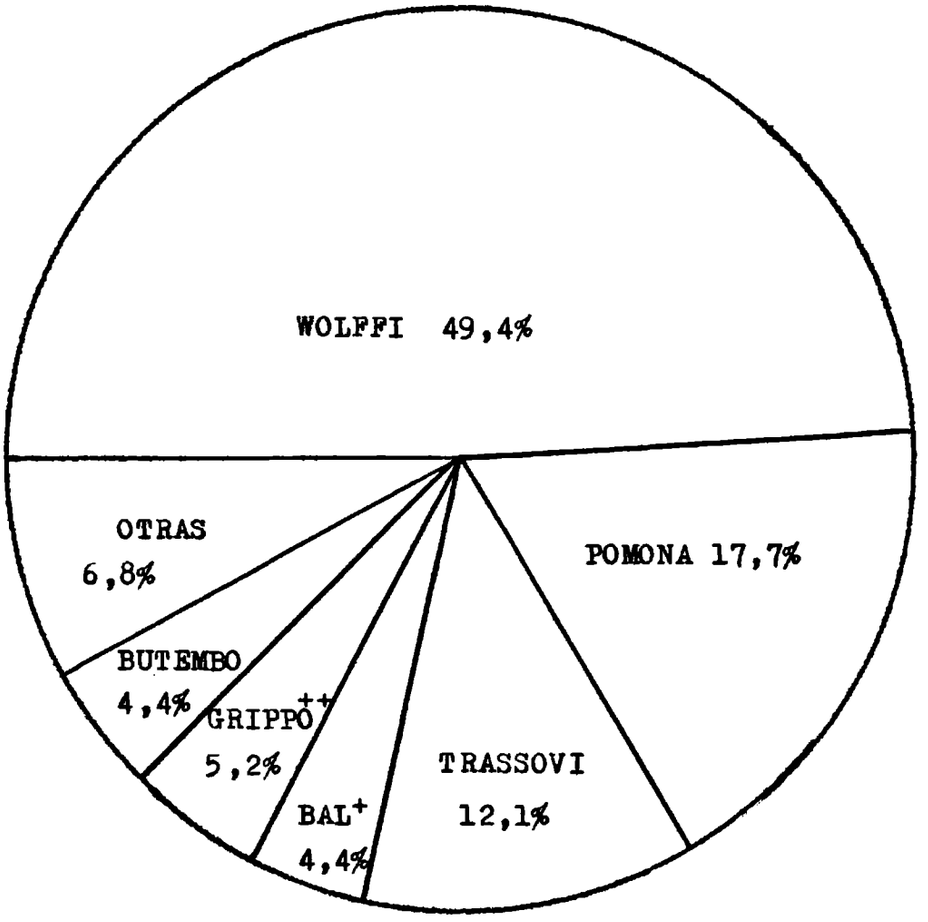
3)Existe un comportamiento escencialmente similar cuando se relativiza cada serovariedad con la totalidad de positivos de cada muestra (sangre y leche).

4)Habría que determinar por otro lado que tipo de Inmunoglobulina es detectada en leche en el caso específico de Leptospirosis.

5)No existen diferencias importantes entre los distintos tipos de muestras de leche analizadas (normales,mastitis subclínica y clínica aguda) con referencia a la presencia de anticuerpos antileptospiras.

6)El empleo del 5-Fluorouracilo es efectivo y necesario para inhibir la flora bacteriana asociada en las muestras de leche; se recomienda para futuros intentos el agregado del inhibidor nombrado.

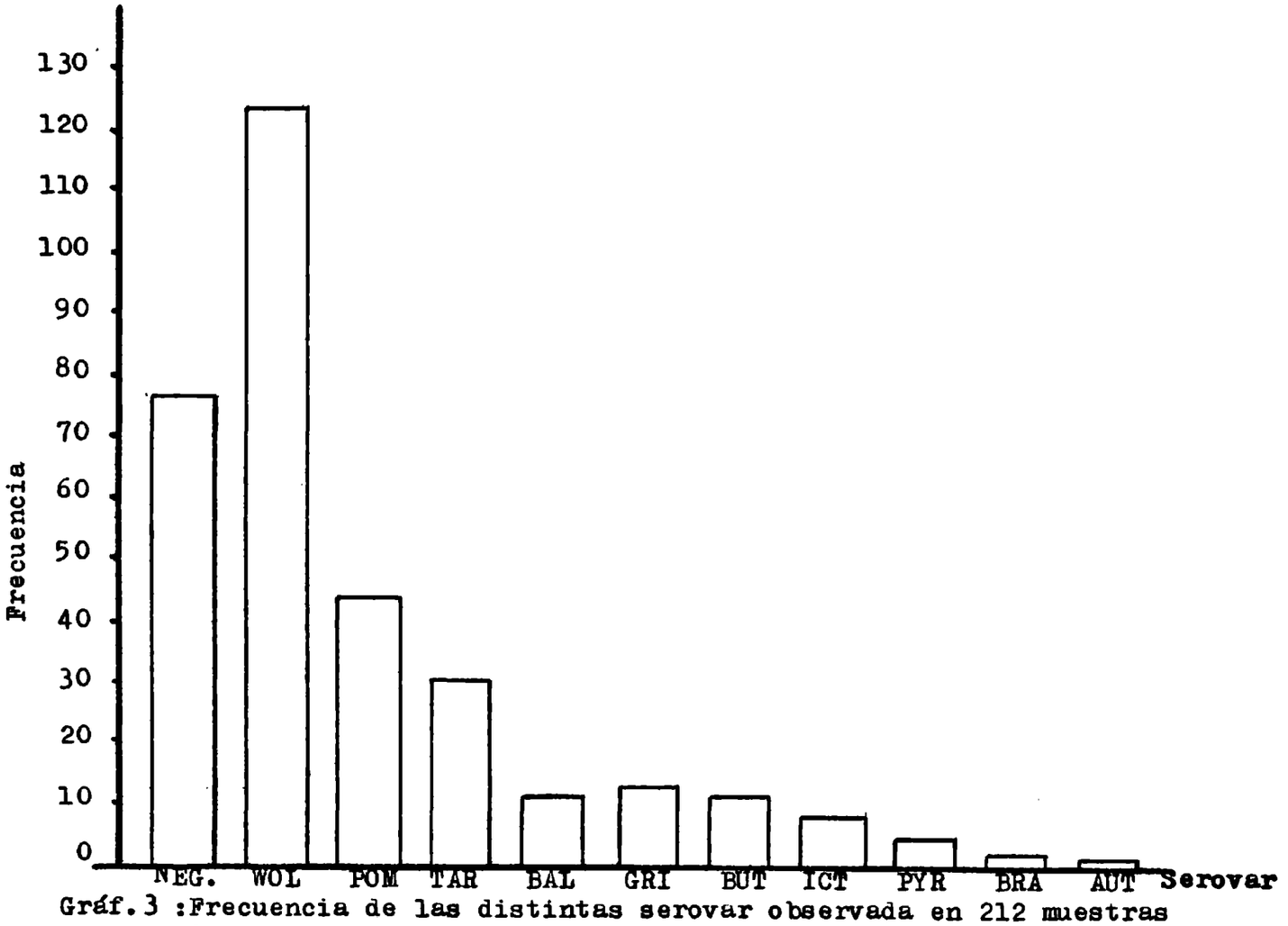
Gráf. 1 :Porcentaje de positividad en 212 muestras de leche.



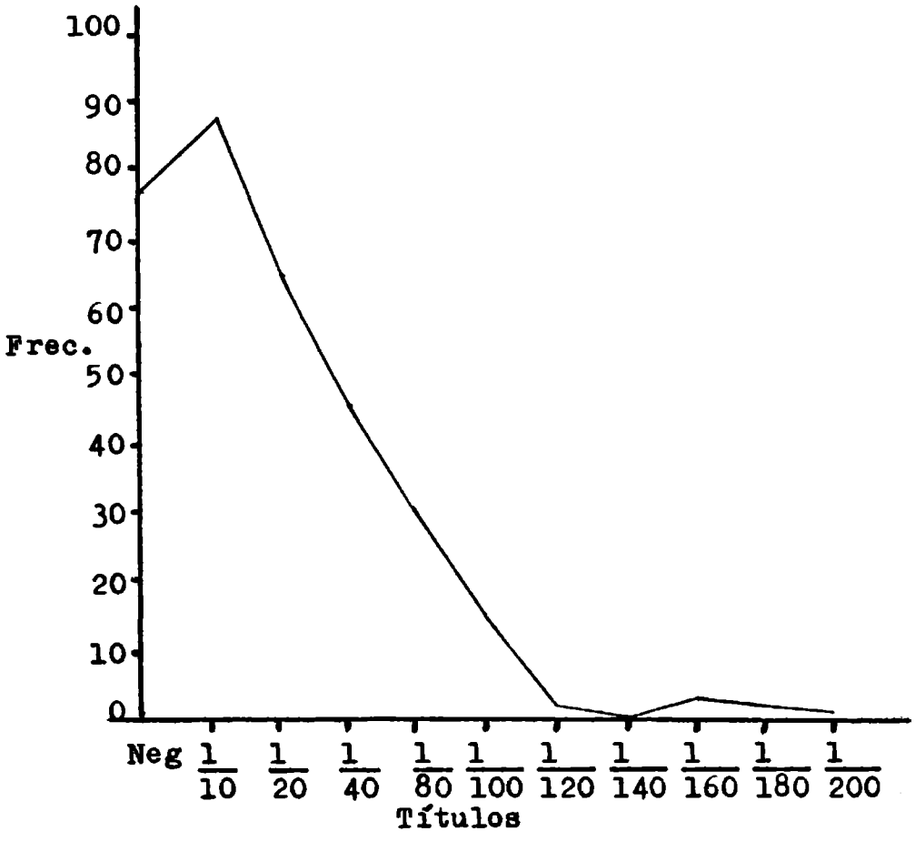
Gráf. 2 :Porcentaje de positividad a las distintas serovariedades en 212 muestras de leche.

+ BAL:BALLUM

++GRIPPO:GRIPPOTYPHOSA



Gráf. 3 :Frecuencia de las distintas serovar observada en 212 muestras de leche



Gráf. 4:Anticuerpos antileptospiras encontrados en 212 muestras de leche de bovinos pertenecientes a 15 tambos.

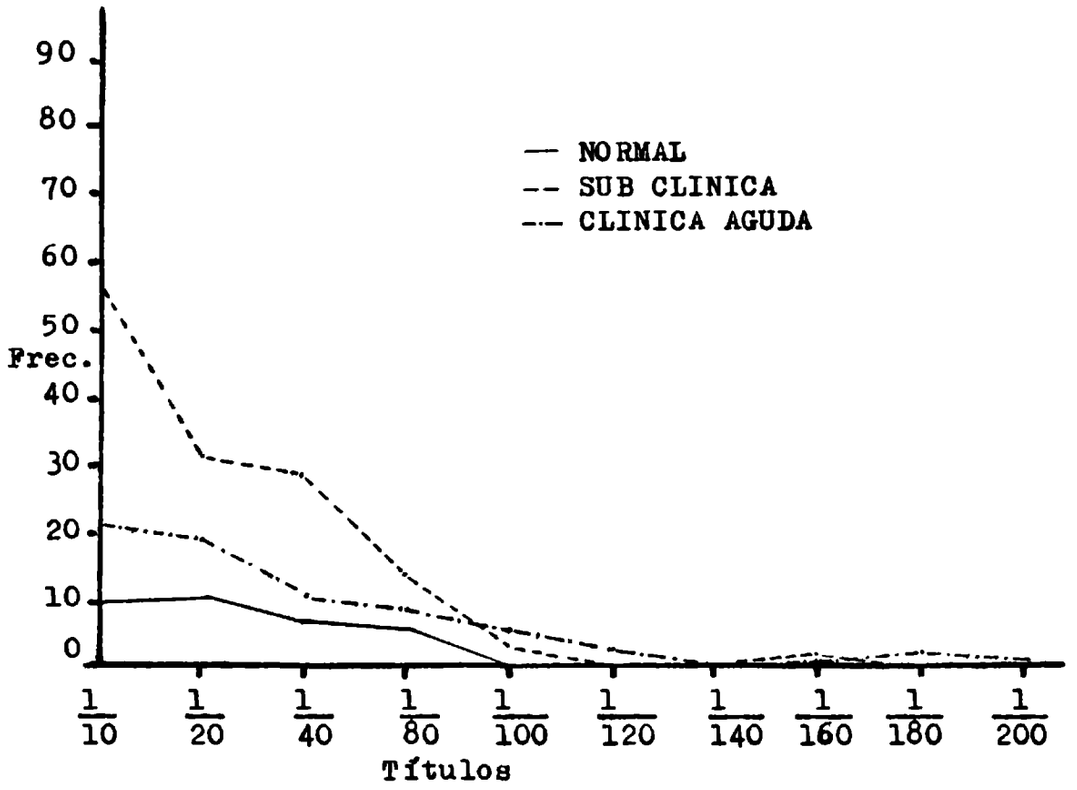
Tabla 1 :Serovariedades y títulos encontrados en 212 muestras de leche

	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/180	1/200	T.
WOLFFI	20	37	28	21	12	2	-	2	-	1	123
POMONA	13	14	11	3	1	-	-	-	2	-	44
TARASSOVI	14	6	3	4	2	-	-	1	-	-	30
BALLUM	8	2	1	-	-	-	-	-	-	-	11
GRIPPOTYPHOSA	8	1	2	2	-	-	-	-	-	-	13
BUTEMBO	9	2	-	-	-	-	-	-	-	-	11
ICTEROHAEMO-RRHAGIAE	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
PYROGENES	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	5
BRATISLAVA	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
AUTUMNALIS	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
TOTAL	87	64	45	30	15	2	-	3	2	1	249

Tabla: 2 Relación entre los distintos grados de mastitis y la reacción de aglutinación microscópica en suero lácteo, correspondiente al cuarto afectado, realizado en 212 muestras de leche.

Aglut.Micr.	Neg.	Pos.	Positividad a cada serovar									
Mastitis			1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/180	1/200
NORMAL 42 ※(19,8%)	16 (38,0%)*	26 (62,0%)	10	11	7	6	-	-	-	-	-	-
SUBCLINICA 112 ※(52,8%)	41 (36,6%)*	71 (63,4%)	56	31	29	14	4	-	-	2	-	-
CLIN.AGUDA 58 ※(27,4%)	20 (34,5%)*	38 (65,5%)	21	20	11	9	6	2	-	1	2	1
Total 212 ※(100%)	77	135	87	62	47	29	10	2	-	3	2	1

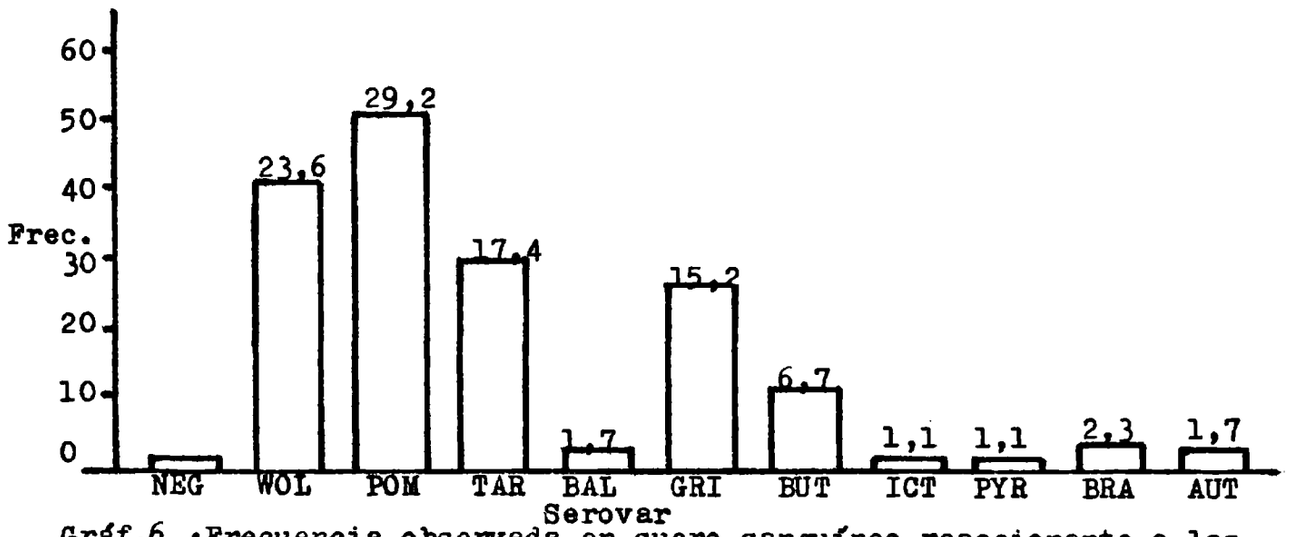
※ Entre paréntesis figuran los porcentajes de los distintos tipos de mastitis.
* Entre paréntesis figuran los porcentajes de negatividad y positividad correspondiente a cada clasificación



Gráf. 5: Relación entre los distintos grados de mastitis y la reacción de aglutinación microscópica en suero lácteo (Serovar homóloga)
+ 212 muestras

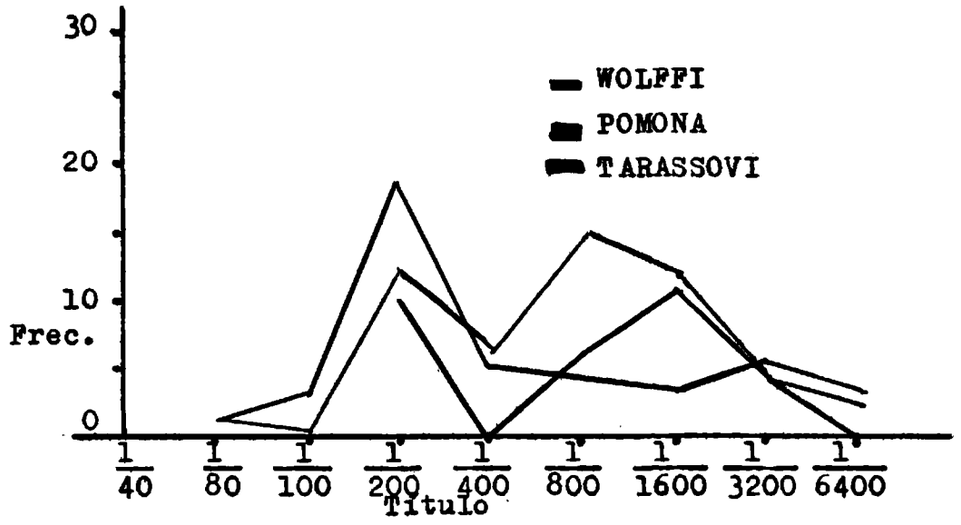
Tabla 3:Títulos y serovariedades encontrados en 61 muestras de suero sanguíneo.

	1/20	1/40	1/80	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	TOTAL
WOLFFI	-	-	1	3	18	5	4	3	5	3	42
POMONA	-	-	1	-	12	6	15	12	4	2	52
TARASSOVI	-	-	-	-	10	-	6	11	4	-	31
BALLUM	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3
GRIPPO-TYPHOSA	-	1	-	2	19	2	3	-	-	-	27
BUTEMBO	-	1	-	-	11	-	-	-	-	-	12
ICTEROHAE-MORRHAGIAE	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
PYROGENES	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
BRATISLAVA	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	4
AUTUMNALIS	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	3
TOTAL	3	7	2	5	76	13	28	26	13	5	178



Gráf.6 :Frecuencia observada en suero sanguíneo reaccionante a las distintas serovariedades

+El número superior de las barras corresponde al porcentaje de cada serovar con respecto al total de positivos

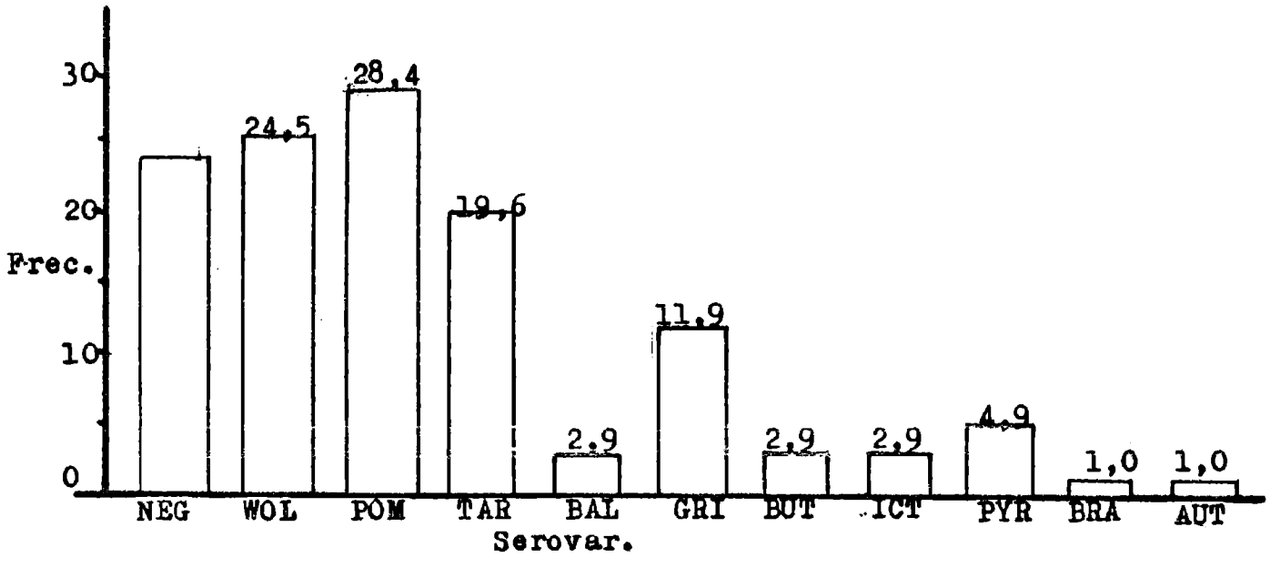


Gráf. 7 :Frecuencia de las principales serovariedades reaccionantes en referencia a sus títulos en 61 muestras de suero sanguíneo.

Tabla 4 :Relación entre títulos en suero de leche y suero sanguíneo con referencia a la serovariedad homóloga en 61 muestras de animales.

Sangre / Leche	NEG	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
NEG	-	NI	NI	NI	NI	NI	57	9	14	7	4	3
1/10	8	-	3	4	1	1	11	1	5	9	3	-
1/20	4	-	-	2	-	2	5	2	3	2	6	-
1/40	2	-	-	1	1	-	-	-	1	7	-	-
1/80	3	-	-	-	-	2	-	-	4	2	-	2
1/100	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
1/180	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
1/200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NI:No investigado
Los títulos sanguíneos menores de 1/200,fueron realizados únicamente cuando el suero lácteo correspondiente al mismo animal era positivo y en suero sanguíneo negativo al título nombrado.
(1/200 dilución inicial realizada en sangre)



Gráf.8 :Frecuencia de las distintas serovariedades observada en 61 muestras de leche,correspondiente a las procesadas en forma pareada con suero sanguíneo.
+El número superior de las barras corresponde al porcentaje de cada serovar con respecto al total de positivos

Tabla 8:Presencia de anticuerpos en 61 muestras de leche,correspondientes a las procesadas en forma pareada con suero sanguíneo.

Títulos / Serovar	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/180	1/200	Total
WOLFFI	4	13	3	5	-	-	-	-	-	-	25
POMONA	11	7	7	2	-	-	-	-	2	-	29
TARASS	13	2	1	3	1	-	-	-	-	-	20
BALLUM	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	3
GRIPPO	6	1	1	1	3	-	-	-	-	-	12
BUTEMB	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	3
ICTERO	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
PYROGE	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	5
BRATIS	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
AUTUMN	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Total	46	26	13	11	4	-	-	-	2	-	102

Tabla 5:Relación entre los títulos de suero de leche y sangre con referencia a la serovariedad wolffi (Hebdomadis).

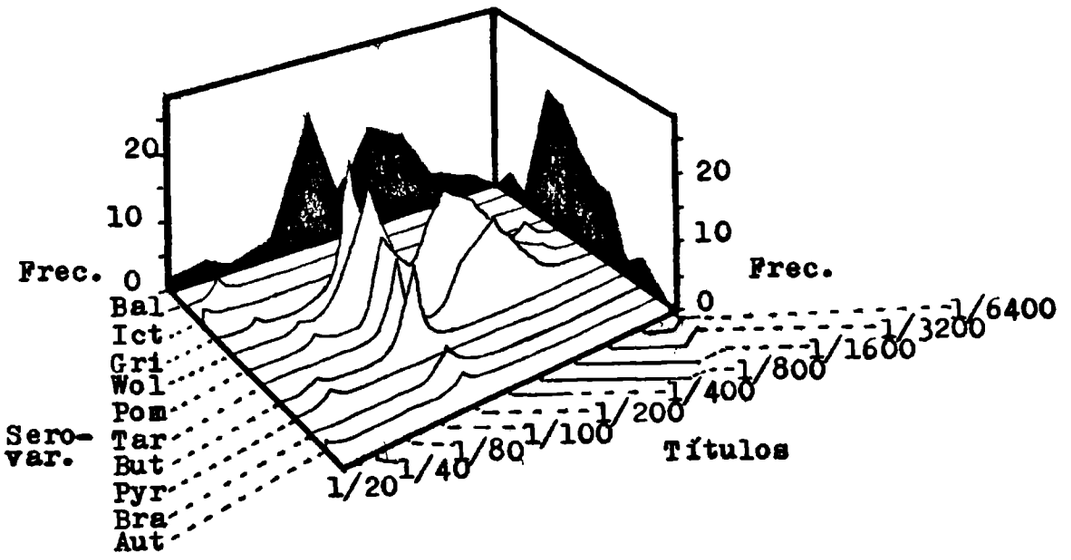
Sangre / Leche	Neg	1/80	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
Neg.	16	-	-	14	3	-	3	1	1
1/10	-	-	1	2	-	-	-	1	-
1/20	2	-	2	1	2	3	-	3	-
1/40	1	1	-	-	-	1	-	-	-
1/80	2	-	-	1	-	-	-	-	-

Tabla 6:Relación entre los títulos de suero de leche y sangre con referencia a la serovariedad pomona (Pomona)

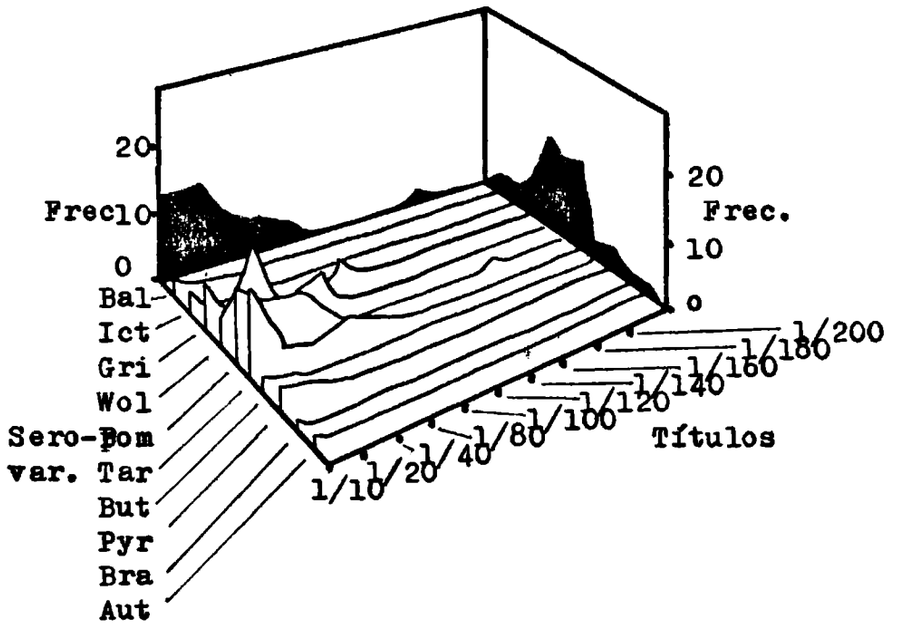
Sangre / Leche	Neg	1/80	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
Neg.	10	-	-	7	4	9	2	-	2
1/10	-	1	-	4	1	2	2	1	-
1/20	-	-	-	1	-	1	2	3	-
1/40	-	-	-	-	-	1	6	-	-
1/80	-	-	-	-	-	2	-	-	-
1/100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/180	2	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 7:Relación entre los títulos de suero de leche y sangre con referencia a la serovariedad tarassovi (Tarassovi).

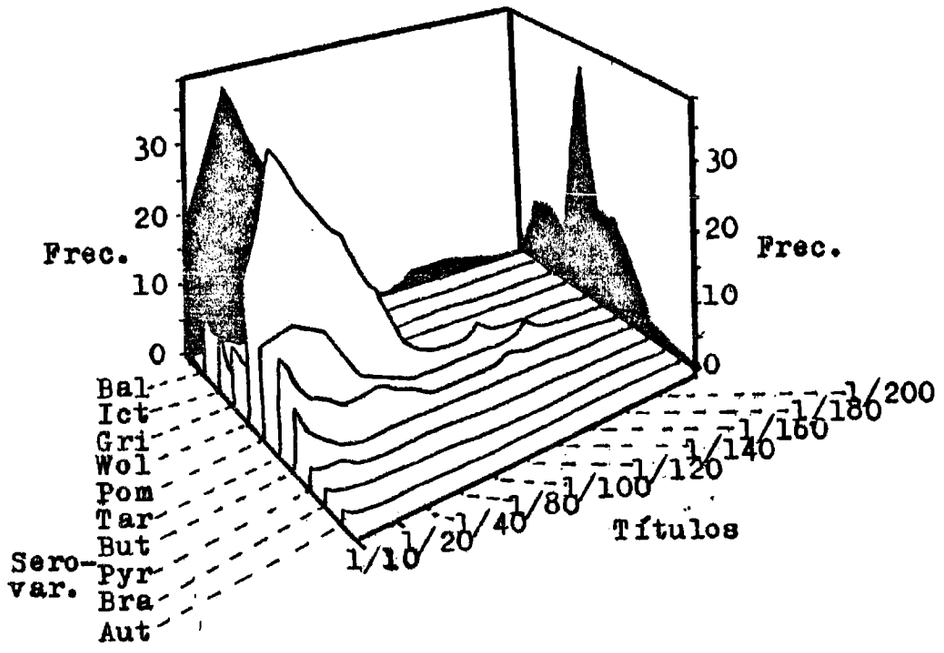
Sangre / Leche	Neg	1/80	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
Neg.	31	-	-	4	-	3	2	2	-
1/10	1	-	-	2	-	1	6	2	-
1/20	-	-	-	2	-	-	-	-	-
1/40	-	-	-	-	-	-	1	-	-
1/80	-	-	-	-	-	2	2	-	-
1/100	-	-	-	1	-	-	-	-	-



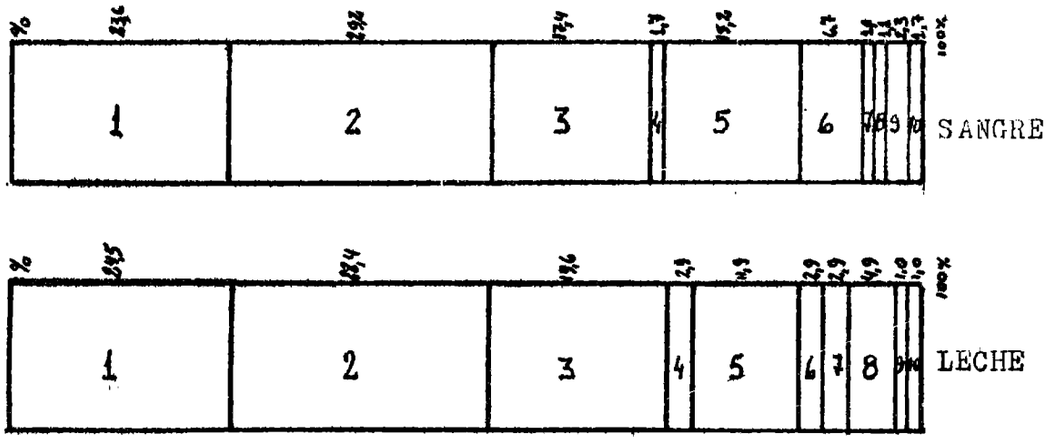
Gráf. 8 :Representación de positividad,serovariedad y títulos encontrados en 61 sueros sanguíneos.



Gráf.9 :Representación de positividad,serovariedad y títulos encontrados en 61 muestras de leche correspondientes a las extraídas en forma pareada con sangre.



Gráf.10 :Representación de positividad,serovariedad y títulos encontrados en 212 muestras de leche.



Graf.11. Relativización de cada serovariedad con la totalidad de positivos de cada muestra.

Ref.:1.Wolffi;2.Pomona;3.Tarassovi;4.Ballum;5.Grippotyphosa; 6.Butembo;7.Icterohaemorrhagiae;8.Pyrogenes;9.Bratislava;10.Autumnalis.

2.7.BIBLIOGRAFIA

1)ABDU M.,SLEIGHT S.,Pathology of experimental Leptospira pomona infection in hamsters. Cornell vet.,LV,1,(74:86),1965

2)AGUIRRE W.G.,GALLO G.,REINOSO CASTRO,MARTIN A.,FERNANDEZ E. Leptospirosis bovina:hallazgos de nuevos focos. Tipificación de cepa aislada. Rev.Fac.C.Vet.La Plata año IX,20,III° Ep.,I/III,(55:61),1967

3)AGUIRRE W.G.,BOTARGUES A.,IRIBARREN J.,von SEELEN B., Prevalencia de anticuerpos específicos para Leptospiras en bovinos. Rev.Fac.C.Vet.La Plata,año VII,III Ep.,(189:195),1965

4)AGUIRRE W.G.,LED J.,BOTARGUES A.de,DORTA G.,TUNES J.,Relación entre la infección leptospirósica suina y la presencia de anticuerpos en obreros de la carne. Rev.Fac.C.Vet.,año IX,n° 21,III Ep.,(141:143),1967

5)AGUIRRE W.G.,GALLO G.,JENSEN A.,TOBIA M.,Brotes de leptospirosis bovina en la Provincia de Buenos Aires.Rev Fac.C.Vet.,La Plata,año X,22,III Ep.,(83:88),1968

6)ALBA J.,Mastitis subclínica.Nueva vacuna para su control. ACINTACNIA,1,n°5,(28:29),1984

7)ALEXANDER A.,YAGER R.,KEEFET,Bull.Off.int.Epiz.,61,(273), 1964

8)ALSTON J.,BROOM J.,Leptospirosis in man and animals.Ed.Livingstone LTD,Edinburg and London.(p.367),1958

9)ANDREANI E.,TOLARI F.,PIAZZA D.,Descrizione di un grave focolaio di Leptospirosis bovina da L. interrogans sierotipo hardjo in provincia di Udine.Annales de la Fac.de Med.Vet. de Pisa,XXXII,(53:60),1979

10)ARMSTRONG J.,GOLDBERG H.,Observations on the colonial Morphology of Leptospires. Am.J.vet Res.,21,March, (311:315), 1960

11)ASOCIACION ARGENTINA de Lucha contra la Mastitis. Estimación de las pérdidas en volumen de producción de leche provocadas por la mastitis bovina en la República Argentina.Orien.Láctea,III,35,(16:20)1984

12)ASSOCIATION OF Leptospira Hardjo with abortions in a group of Heiffers. Aust.vet.Joru.,50,July,(325),1974

13)BADIOLA J.,THIERMANN A.,CHEVILLE N.,Pathologic features of Leptospirosis in Hamsters caused by Leptospira interrogans serovar hardjo and szwajizak. Am.J.vet. Res.,44,1,(91:99),1983

14)BAGLIONI T.,BIANCHI C.,RUGGERI L.,Imminutá passiva trasmessa per via colostrale nella Leptospirosis bovina. La Clinica Veterinaria,89,1,(14:16),1966

15)BAIER W.,Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades de la ubre.Rev.Med.Vet,51,1,(27:31),1970

16)BAKER J.,LITTLE R.,Leptospirosis in cattle.J.Exp.Med.,88, (295:307),1948

17)BARRIOLA J.,ARGENTO E.,CASTRONOVO S.,ARGENTO O.,INNOCENTE E.,de TORRES R.,Respuesta inmune en Leptospirosis en bovinos: detección de anticuerpos circulantes contra L. pomona por enzimo inmunoensayo en fase sólida.Rev.Med.Vet.(BsAs)64,1,(6:16),1983

18)BERNKOFF H.,OLITZKI L.,STUCZYNSKI L.,HALEVI C.,J.Inf.Dis., 83,(232),1948

19)BEY R.,JOHNSON R.,Protein free and low protein media for the cultivation of Leptospira.Infect.Immun.,19,(562: 569),1978

20)BIRNBAUM S.,SHENBERG E.,TORTEN M.,The influence of maternal antibodies on the epidemiology of Leptospiral carrier state in mice. Am.Jour. of Epidem.,96,4,(313:317) 1972

21)BLOOD D.,HENDERSON J.,Medicina Veterinaria,3er.Edic.Español Ed.Interamericana,Mexico,(1008 p),1974

22)CACCHIONE R.,BULGINI M.,MARTINEZ E.,CASCELLI E.,Leptospirosis experimental.Efectos de las Leptospiras sobre la coagulación sanguínea en cobayos.Rev.Inv.Gan.,9, (135:147),1960

23)CACCHIONE R.,CEDRO V.,BULGINI M.,MARTINEZ E.,CASCELLI E., Leptospirosis bovina.Aislamiento y clasificación de cepas de ganado bovino en la Argentina.Rev.Inv.Gan. 11,(41:50),1961

24)CACCHIONE R.,Leptospiras y técnicas de Laboratorio.Rev.Inv. Gan.,14,(105:124),1962

25)CACCHIONE R.,de LA FUENTE A.,CASCELLI E.,MARTINEZ E.,Inmunidad pasiva antileptospira en bovinos lactantes e inminudad activa después del destete.Rev.Inv.Agrop. VI,11,(11I:120),1969

26)CACCHIONE R.,Enfoques de los estudios de las Leptospirosis humana y animal en américa latina.1)Introducción.Argentina,Bolivia y Brasil.Rev.Asoc.Arg.Microbiol.,V, 1,(36:53),1973

27)CACCHIONE R.,CASCELLI E.,SARAVI M.,MARTINEZ E/, Difusión e importancia de laleptospirosis animal y humana en la Argentina.,Rev.Med.Vet.(BsAs),61,3,(266:246)1980

28)CACCIONE R.,Actualización en Leptospirosis. Enfermedad en Animales y en el hombre. Curso sobre problemas sanitarios.Fac.Cienc.Vet.U.N.C.P.B.A.,Tandil,1981

29)CAMINOA R.,ALT M.,Técincas de laboratorio para el diagnóstico de Leptospirosis.Acta Bioquim.Clin.Latin., XVIII,2,(353:365),1984

30)CARBREY E.,PACKER R.,The detection of antobody against Leptospira pomona in composite herd samples.Am.J.vet. Res.,22,(573:578),1961

31)CORBOULD A.,Leptospira Hardjo in Tasmania.,Aust.Vet.Jour., 47,Jan,(26),1971

32)COX C.,LARSON A.,Colonial growth of Leptospira.J.Bacteriol 73,(587:589),1957

33)DAVIDSON K.,Leptospira hardjo infection in man associated with an outbreak in a dairy herd.Aust.Vet.Jour.,47, Aug.(408),1971

34)DERBYSHIRE J.,Immunity in Bovine Mastitis.The veterinary Bulletin,32,1,(1:10),1962

35)DOHERTY P.,Qd.J.agric.anim.Sci.,24,(329),1967

36)DORTA G.,Acción de constituyente tisulares,secreciones y excreciones sobre Leptospiras in vitro.Tesis Bact. Clin. e Ind.,Fac.C.Vet.,U.N.L.P.,1965

37)ELLINGHAUSEN H.,Mc.CULLOUGH W.,Nutrition of Leptospira pomona and Growth of 13 other serotypes:A Serum-free Medium employing oleic albumin complex.Am.J.vet.Res 26,110,(39:44),1965

38)ELLINGHAUSEN H.,Mc.CULLOUGH W.,Nutrition of Leptospira pomona and Growth of 13 other serotypes:Fractionation of oleic Albumin Complex and a medium of bovine Albumin and polisorbate 80.Am.Jour.vet.Res,26,110,(45::51),1965

39)ELLINGHAUSEN H.,Growth,Cultural characteristics,and antibacterial sensitivity of Leptospira interrogans serovar hardjo.Cornell vet,73,(225:239),1983

40)ELLIS W.,O'BRIEN J.,PEARSON J.,COLLINS D/,Bovine Leptospirosis:Infection by the Hebdomadis serogroup and mastitis.Vet Rec,99,Nov.6,(368:370),1976

41)ELLIS W.,MICHNA S.,Bovine Leptospirosis:Infection by the Hebdomadis serogroup and abortion-A herd study.Vet Rec. 99,Nov.20,(409:412),1976

42)ELLIS W.,MICHNA S.,BOVINE Leptospirosis:Demonstration of Leptospires of the Hebdomadis serogroup in aborted fetuses and a premature calf.,Vet.Rec.,99,Nov.26,(430:432),1976

43)ELLIS W.,O'BRIEN J.,NEIL S.,HANNA J.,BRYSON D.,The isolation of a leptospire from an aborted bovine fetus. Vet.Rec.,Dec.4,99,(458:459),1976

44)ELLIS W.,MICHNA S.,Bovine Leptospirosis:experimental infection of pregnant heifers with a strain belonging to the Hebdomadis serogroup.Res.in Vet.Sci., 22,(229:236),1977

45)FAINE S.,HOEDEN van der J.,Virulence-linked colonial and morphological variation in Leptospira.Jour.of Bacteriol.,88,5,(1493:1496),1964

46)FAINE S.,ADLER B.,RUTA G.,A mechanism of Immunity to Leptospirosis.AJEBAK,52,2,(301:310),1974

47)FAINE S.,Guidelines for the control of Leptospirosis.WHO publication n°67,England,(p.171),1982

48)FAINE S.,STALLMAN N.,Amended descriptions of the Genus Leptospira Noguchi 1917 and the Species L.interrogans (Stimson 1907)Wenyon 1926 and L.biflexa (Wolbach and Bingwe 1914)Noguchi 1918.,Int.Jour.of.Syst.Bacteriol 32,4,(461:463),1982

49)FENESTAD K.,BORG-PETERSEN C.,Studies on Bovine Leptospirosis and abortion.II Demosntration of Leptospires in foetuses from field cases of abortion in cattle. Nordisk Vet.Med.,10,(302:308),1958

50)FENESTAD K.,BORG-PETERSEN C.,Antàbody and plasma cells in bovine fetuses infected with Leptospira saxkoebing. Jour.of Inf.Diseas.,110,1,(63:69),1962

51)FUKUSHIMA B.,Uber die Nährboden der Sprirochaten Uber Kulturverfahren der Spirochaeta icterohaemorrhagiae und ähnlicher spirochaeten.Sci.Rep.Gov.Inst.Infect.Dis. Tokyo.Imp.Univ. 6,(545:554),1927

52)GARCIA CARRILLO C.,Leptospirosis:anotaciones prácticas sobre cultivo.Univ.de Caldas,Vet.yZoot.,nº7,(55:66), 1966

53)GIL TURNES C.,Agentes de mastitis en leche total de establecimiento.Rev.Med.Vet.,51,1,(43:52),1970

54)GIRAUDO J.,TAMAGNINI A.,Diagnóstico y tratamiento de mastitis subclínica.Antibioterapia al secado.Gac.Vet.,XL, 328,(99:105),1978

55)GIRAUDO J.,TAMAGNINI A.,Mastitis.Evaluación de un programa de control en un establecimiento lechero.Gac.Vet.XLI 342,(412:419),1979

56)GOCHENOUR W.,Laboratory Diagnosis of Leptospirosis:Demosntration of Leptospires.Vet.Med.,Nov.,LII,(562:570) 1957

57)HABICH G.,ECHAIDE I.,GONZALEZ R.,Una "tormenta" de abortos, aparentemente debida a Leptospirosis,en un rodeo afectado por varias enfermedades reproductivas.Rev.Med Vet.(BsAs),64,5-6,(322:328),1983

58)HANSON L.,Leptospirosis in domestic animals:The public health perspective.JAVMA,181,dec.15,12,(1505:1509),1982

59)HATHAWAY S.,LITTLE W.,STEVENS A.,Isolation of L.interrogans serovar hardjo from aborted bovine fetuses in England Ve t.Rec.,111,July 17,(58),1982

60)HEIDRICH H.,RENK I.,Enfermedades de las glándulas mamarias en los animales domésticos.Ed.Labor,España,1er.Ed. en Español,1969

61)HENGL R.,KASZA L.,KEMENES F.,A tejelő tehenek elapsztasa (tőgyulladasa)Leptospirosis Következteben.Mag allator.Lapja,13,(33:37),1958

62)HERR S.,RILEY A.,NESER J.,ROUX D.,DE LABGE J.,Leptospira interrogans serovar pomona associated with abortion in cattle:Isolation methods and laboratory animal histopathology.Onderstepoort J.vet Res.,49,(57:62) 1982

63)HERR S.,WINNEN G.,The first isolation of Leptospira interrogans serovar pomona from cattle in Botswana.Jor. of the S.African Vet.Asso.,June,(83:84),1983

64)HIGGINS R.,HARBOURNE J.,LITTLE T.,STEVENS S.,Mastitis and abortion in dairy cattle associated with leptospira of serotype hardjo.Vet.Rec.,107,Sep.27,(307:310) 1980

65)HOARE R.,CLAXTON P.,Observations on Leptospira hardjo infection in New South Wales.,Aust.Vet.Jour.,48,May, (228:232),1972

66)HOEDEN van DER J.,A milk agglutination test in Leptospirosis.Cornell Vet.,45,(190:192),1955

67)HUSSAINI S.,A comparative study on the use of whey and serum for microscopic agglutination test for the detection of Leptospira antibodies.Br.vet.J.,132,(621: :626),1976

68)INTERNATIONAL COMMITTER ON SYSTEMATIC BACTERILOGY of the International Union of Microbiological Societies-Sub committe on the taxonomy of Leptospira.Meeting 6 to 10 August,Boston,USA,1982

69)INTERNATIONAL COMMITTE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY of the International Union of Microbiological Societies-

Sub committe on the taxonomy of Leptospira.Meeting 14 September,1983

70)JOHNSON R.,ROGERS P.,5-Fluorouracil as a selective agent for growth of Leptospirae.,Jour.of Bacteriol.,87, 2,(422:426),1964

71)JOHNSON R.,ROGERS P.,Diferentiation of pathogenic and Saprophytic leptospires with 8-azaguanine.Jour.of Bacteriol.,88,6,(1618:1623),1964

72)JOHNSON R.,HARRIS V.,Diferentiation of pathogenic and Saprophytic leptospires.I Growth at low temepratures Jour.of Bacteriol.,94,1,(27:31),1967

73)JOHNSON R.,WALBY J.,HENRY R.,AURAN N.,Cultivation of Parasitic Leptospires:Effect of Pyruvate.,Applied Microbiol.,26,1,(118:119),1973

74)KEAST J.,FORBES B.,WANNAN J.,Bovine Leptospirosis in New South Wales including the result of a 10-Years survey.Aust.vet Jour.,40,Jan,19:26),1964

75)KIRKBRIDE C.,BICKNEL E.,REED D.,ROBL M.,KNUDTSON W.,WOHLGEMUTH K.,A diagnostic survey of bovine abortion n and stillbirth in the Northern Plains States.JAVMA, 162,7,(556:560),1973

76)KIRKBRIDE C.,Abortive disease of cattle:their significance and prevalence.Vet.Med.(Small Anim.Clin.)August, (1151:1155),1979

77)KIRSCHNER L.,MILLER T.,GARLICK C.,Swineherd's disease in New Zealand.Infection with Leptospira pomona in man calves and pigs.N.Z.med.J.,51,98,1952

78)KIRSCHNER L.,MAGUIRE T.,BERTRAED W.,Further evidence of the antileptospiral effect of milk,electron microscopic studies.Brit.J.Exp.Path.,38,4,(357:361),1957

79)LICERAS DE HIDALGO J.,Leptospiras hardjo y pomona aisladas de vacunos del Perú.Rev.Inst.Zoon.e Inv.Recuar.II, 1/2,(46:52),1973

80)LITTLE T.,RICHARDS M.,HUSSAINI S.,JONES T.,The significance of leptospiral antibodies in calving and aborting cattle in South West England.Vet.Rec.,106,March 8, (221:224),1980

81)LUECK B.,Histopathologic changes in the mammary gland of the lactating hamster during the acute phase of Leptospirosis.M.S.Thesis.Univ.of Illinois,Urbana,1980

82)MAZZA S.,Sobre una espiroquetosis encontrada en un perro de tabacal.Bol.Inst.Clin.Quir.,136,1926

83)MENGES R.,ROSENQUIST B.,GALTON M.,A method for the isolation of Leptospires.,JAVMA,137,5,(313:316),1960

84)MICHNA S.W.,Leptospirosis.Vet.Rec.,86,April 25th,(484:496) 1970

85)MICHNA S.W.,ELLIS W.,DIKKEN H.,The Isolation of Leptospira hardjo from an aborting cow.Res.vet Sci.,17,(133:135) 1974

86)MITCHELL D.,BOULANGER P.,Leptospirosis in Canada.IV An atypycal mastitis in cattle due to leptospira pomona. Can Jour of Com Med.,XXIII,8,(250:255),1959

87)MORSE E.,ALLEN V.,POPE R.,KROHN A.,Leptospirosis in Wisconsin.II Serological studies.JAVMA,127,nov.(422:426), 1955

88)MYERS D.,VARELA DIAZ V.,Selective Isolation of Leptospiras from contaminated material by incorporation of neomicin to culture media.Applied Microbiol.,25,5,(781: :786),1973

89)MYERS D.,VARELA DIAZ V.,SINIUK A.,Long term survival of Leptospira in a Biphasic culture medium containing charcoal.Applied Microbiol,25,4,(514:516),1973

90)MYERS D.,JELAMBI F.,Isolation and Identification of Leptospira hardjo from cattle in Argentina.Trop.Geogr.Med. 27,(63:70),1975

91)MYERS D.,Serological studies and Isolations of serotype hardjo and Leptospira biflexa Strains from Horses of Argentina.Jour.of Clin.Microbiol.,3,6,(548:555),1976

92)MYERS D.,Effect of culture medium on agglutinability of Leptospires by the microscopic-agglutination test. Assoc.Arg.Microbiol.,8,1,(14:20),1976

93)MYERS D.,CUBA CAPARO A.,PAYAN MORENO J.,Aislamiento del serotipo hardjo y otras leptospiras de armadillos de Argentina,Bol.Of.San.Panam,83,1,(56:64),1977

94)NATIONAL COMMUNICABLE DISEASE CENTER,Leptospirosis.Human Leptospirosis in the United States.March,1969

95)NERVIG R.,CHEVILLE N.,BAETZ A.,Experimental Infection of calves with Leptospira interrogans serotype szwajizak. Am.J.Vet.Res.,39,3,(523:525),1978

96)NICOL L.,GIRARD O.,CORVAZIER R.,CHEYROUX M.,RECULARD P., ZiZa ET Ph.,Etude comparée de la transmission de l'immunuté des méres aum nouveau-nés.Rev.D'Immun. et de Thér.Antimic.,24,1/2,(16:23),1960

97)NURMI E.,KOIRANEN L.,Bacteriological Review of milk samples from clinical mastitis.Nord.Vet.Med.,19,Jan., (36:40),1967

98)O.P.S./O.M.S.,El control de las enfermedades transmisibles en el hombre,12°Ed.,Leptospirosis(214:216),1978

99)PEARSON J.,GREER D.,Relationship between somatic cell counts and bacterial infections of the udder.Vet. Rec.,95,(252:257),Sep.21st.,1974

100)PEARSON J.,MACKIE D.,ELLIS W.,Milk drop syndome resulting from Leptospira hardjo.Veter.Rec.,Feb.9,(135:136), 1980

101)RIS D.,Limitations of the use of 5-Fluorouracil as a Selective agent for the isolation of Leptospirae.Appl. Microbiol.,27,1,(270:271),1974

102)RITCHIE A.,ELLINGHAUSEN H.,Electron Microscopy of Leptospires.I.anatomical features of Leptospira pomona. Jour.of Microbiol.,89,1,(223:233),1965

103)ROBERTS S.,Obstetricia Veterinaria y Patología de la Reproducción(Teriogenología),1er.Ed.Español,Ed.Hemisferio Sur,(p.1021),1979

104)ROBERTSON A.,BOULANGER P.,MITCHELL D.,Isolation and Identification of a Leptospire of the Hebdomadis serogroup (L.hardjo) from cattle in Canadá.Can.J.Comp. Med.Sci.,28,1,(13:18),1964

105)ROTH E.,KNIERREM B.,La ocurrencia natural de L.pomona en un opossum(Didelphis virginiana).Reporte preliminar.JAVMA,132,Feb.,(97:98),1958

106)ROTH E.,LINDER D.,ADAMS W.,The use of agar plates as an aid for the Isolation of Leptospires.Am.J.vet.Res. 22,march,(308:312),1961

107)SAVINO E.,RENNELLA E.,Leptospirosis en animales vaunos, equinos y lanares de la Rep.Argentina.Rev.Inst. Malbrán,(13:72),1945/48

108)SCHUFFNER W.,MOCHTAR A.,The differentiation of Leptospiral strains.The course of agglutination and lysis.Trop. Dis.Bull,24,(714:715),1927

109)SERVICIO CIENTIFICO LABORATORIO ROCHE.,5-Fluorouracilo(Agente quimioterápico para el tratamiento paliativo de ciertas afecciones neoplásicas)

110)SHENBERG E.,Growth of Pathogenic Leptospira in Chemically Defined Media.,93,5,(1598:1606),1967

111)SLEIGHT S.,WILLIAMS J.,Transmission of bovine leptospirosis by coition and artificial insemination.A preliminary report.JAVMA,138,(151:152),1961

112)SPADA C.,Investigación sobre Sp.icterohaemorrágica en ratas de Buenos Aires.Rev.Sudamer.End.Inm. y Quimiot 2,(424),1919

113)SRIRANGATHAN N.,Collection and Shipping of Milk Samples. in the Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Mastitis.,National Mastitis Council,October,1979,Washington

114)STALHEIM O.,WILSON J.,Leptospiral Colonial Morphology. Jour.of Bacteriol.,86 (482:489),1963

115)STALHEIM O.,Leptospiral lysis by lipids of renal tissue and milk.,J.of Bacteriol.,89,2,(545),1965

116)STANECK J.,HENNEBERRY R.,COX C.,Requerimiento para el desarrollo de Leptospiras patógenas.Inf.Immun.7,6, (886:897),1973

117)STRINGFELLOW D.,BROWN R.,HANSON L.,SCHUNRRENBERGER R., JOHNSON J.,Leptospirosis bovina.¿Puede interferir la vacunación con una bacterina multivalente con el diagnóstico serológico?JAVMA 182,(165:167),1983 (Trad.Theriss,1,1,(56:61),1983)

118)STUART D.,LANGHAN R.,The effects of L.pomona Hemolysin on pregnant ewes,cows,and sows.,Jour.Inf.Dis.,111,1, (63:77),1962

119)STOENNER H.,The laboratory diagnosis of Leptospirosis.Vet. Med.,LII,nov.,(540:542),1957

120)STOENNER H.,Leptospiral abortion of beef cattle caused by Leptospira pomona and Leptospira hardjo.JAVMA,151, 8,(1087:1090),1967

121)STOENNER H.,HADLOW W.,WARD J.,Neurologic manifestations of Leptospirosis in a dayri cow.JAVMA,142,5,(491: :493),1963

122)SULLIVAN N.,STALMAN N.,The isolation of a strain of Leptospira,serotipe hardjo,from cattle in Queensland. Aust.Vet.Jour.,45,Jun.,(281:283),1969

123)SULLIVAN N.,Experimental infection of pregnant cows with Leptospira hardjo.Aust.Vet.Jour.,46,April,(123:1250 1970

124)SULLIVAN N.,The history of Leptospira hardjo.Aust.Vet.Jour. 46,april,(125),1970

125)SULLIVAN N.,CALLAN D.,Isolation of Leptospira hardjo from cows with mastitis.Aust.Vet.Jour.,46,Nov.,(537:539) 1970

126)SULZER C.,SHOTTS E.,GALTON M.,STEWART M.,Leptospirosis due to serotype hardjo in cattle.JAVMA,144,(888:890)1964

127)SZYFRES B.,Repercusión humana de la Leptospirosis bovina. El Veterinario,I,1,(8:9/30),1964

128)TESSI M.,ESPONDA A de,COMINI S. de,TAHER G. de,PAURA A., MOGUILEWSKY M.,CASADO N.,ROMANO L.,WEIDMANN P.,Etiología microbiana de mastitis bovina subclínica en la cuenca lechera santafesina.Rev.Arg. de Microbiol. 11,2,(49:56),1979

129)THIERMANN A.,Use of solid medium for isolation of Leptospires of the Hebdomadis serogroup from bovine milk and urine.Am.J.vet.Res.,42,12,(2143:2145),1981

130)THIERMANN A.,Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup.Am.J.vet.Res.,43,5,(780:784),1982

131)TIZARD I.,An introduction to veterinary Immunology.Ed.Saunders Co.,USA,1st.Ed.,(p.367),1977

132)TRIPATHY D.,HANSON L.,Agar overlay Method for Growth of Leptospires in solid medium,Am.J.vet.Res.,32,7,(1125:1127),1971

133)TRIPATHY D.,Pathogeninity of Leptospira grippotyphosa for Gerbils,Hamsters,and Voles.,Am.J.vet.Res.,35,4,(547::549),1974

134)TRIPATHY D.,HANSON L.,Growth of Hebdomadis group of Leptospires in solid medium.Am.J.vet.Res,41,7,(1153:1154) 1980

135)TRIPATHY D.,HANSON L.,Mansfield M.,et al.,Pathogenesis of Leptospira pomona in lactating sows and transmission to pigglets.Proc.Annu.Meet.U.S.Anim.Health Assoc.85,(188:191),1981

136)TOBIA M.B.,Empleo del 5-Fluorouracilo como inhibidor de contaminantes en el cultivo de Leptospiras.Tesis Bact.Clin.e Ind.,Fac.C.Vet.,U.N.L.P.,1969

137)WEST E.,TOOD W.,MASON H.,BRUGGEN van J.,Bioquímica Médica Ed.Interamericana,4ta.Ed.Español,(p.1214),1969

138)WHITE F.,SULZER K.,ENGEL R.,Isolation of Leptospira interrogans serovar hardjo,balcanica and pomona from cattle at slaughter.,Am.J.vet.Res,43,7,(1172:1173)1982

139)WOOD J.,JOHNSON R.,PALIN K.,Surface colonies of Leptospira interrogans.Jour.of Clin.Microbiol.13,1,(102::105),1981

140)YANAGAWA R.,WILSON J.,Two types of Leptospirae distinguishable by their growth in boiled serum medium.Jour. Inf.Dis.,110,1,(70:74),1962

141)YANAGAWA R.,HIRAMUNE T.,AKAIKE Y.,Growth of saprophytic and pathogenic leptospirae on solid medium in carbon dioxide free air.J.of.Bacteriol,85(953:954)1963

142)YANAGAWA R.,HIRAMUNE T.,FUJITA J.,Effects of carbon dioxide on the colonial growth of pathogenic leptospirae. J.Bacteriol.,85,(875:880),1963

143)HODGES ; RIS, N.Z.vet.J.(22:25), 1974

144)ABA,J.C.;Mastitis subclínica.Nueva vacuna para su control.
ACINTACNIA,1,5,(28:29),1984

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Juan José Martino (Directosr de este trabajo), al Dr. Roberto Cacchione, al Dr.Mario Saraví, al Dr. Eduardo Soria y Dra. Bibiana Brihuega del INTA Castelar; al Dr. Ricardo Caminoa (FCV.UNLP); a los Dres Calieri y Corbellini (Lab.de Mastitis INTA); a los señores E.Martínez y A. Beñez del mismo instituto; a la Srta. Nora Vázquez(FCM.UNLP); al Dr. Fonrouge (FCV.UNLP); al Lic.Luis Stanchi (UCA); a los Dres. J.Galán y A.Winter (Cornell Univer.USA), al Sr.R.Giménez (Lab. Roche) y a las autoridades del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

La Facultad no se hace solidaria de las opiniones vertidas
en una tesis