



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN
VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA
SEDE DE LA PATAGONIA**

**ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO Y DETECCIÓN MEDIANTE REACCIÓN
EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL DE *Leptospira*
spp. y *Rhodococcus equi*, EN ÓRGANOS DE CABALLOS (*Equus ferus*
caballus), INGRESADOS A LA UNIDAD DE MORFOLOGÍA Y
DIAGNÓSTICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA

Profesor Guía: Dr. Frank Alexis Vera Otárola

Copatrocinador: Dr. Juan Pablo Pontigo Vásquez

Estudiante: Antonia Aguiari Mutis

Puerto Montt, Chile

2025

DERECHOS DE AUTOR

©ANTONIA AGUIARI MUTIS. Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

Puerto Montt, Chile

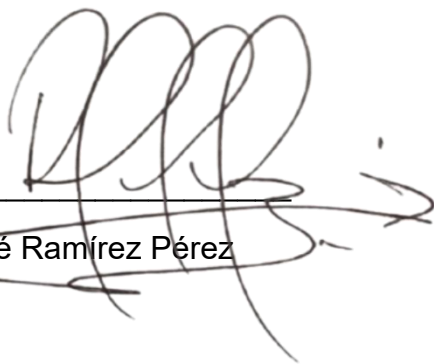
2025

HOJA DE CALIFICACIÓN

En Puerto Montt el 11 de Julio de 2025, los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante Antonia Aguiari Mutis de la carrera o programa de Medicina Veterinaria ha aprobado la tesis para optar al título o grado académico de Médico Veterinario con una nota de 6.8



Lucía Azocar Aedo



René Ramírez Pérez



Frank Vera Otárola

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mi mamá por ser un pilar fundamental en mi vida, quien me ha guiado a ser la persona que soy hoy. Por siempre recordarme que soy capaz de hacer lo que me proponga, por ser mi hombro para llorar cada vez que lo he necesitado, por apoyarme, por incentivarme a buscar lo mejor y lo que merezco. Quiero dedicárselo por eso, y muchas cosas más que hace una madre leona por su cachorra.

Además, quiero dedicar este trabajo a mi gato Lorek Fernando, quien, durante cada minuto de estudio ha estado conmigo mientras leo y escribo con su mano sobre la mía.

Y, se lo dedico también, a mi yegua Bombona, quien me motivó e inspiró para enfocar mi línea de estudio a los equinos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mi profesor guía, Frank Vera, por su apoyo incondicional, por todas las instancias en las que me ha empujado a sacar lo mejor de mí y demostrarme de lo que soy capaz. Por estar siempre ahí cuando lo necesito, por la dedicación y hacer siempre más de lo necesario con tal de ayudarme.

Gracias a mi copatrocinador, Juan Pablo Pontigo, por la paciencia, el apoyo y la preocupación. Por siempre motivarme a ser mejor, por estar siempre que lo necesito.

A la Jeraldine Poveda, por toda la ayuda y paciencia, y el apoyo día a día para permitirme alcanzar mis objetivos.

A mis amigas, quienes han estado desde el inicio a mi lado, recordándome de lo que soy capaz, ayudándome y apoyándome incondicionalmente. Gracias por hacer que este trayecto sea una aventura llena de emoción, y por el cariño entregado.

Agradezco a mi familia y a mi pareja por contribuir en mi crecimiento personal y por su apoyo emocional y motivación constante.

TABLA DE CONTENIDO

DERECHOS DE AUTOR.....	i
HOJA DE CALIFICACIÓN	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Aspectos históricos del caballo y su relación con los humanos	1
1.2. Relevancia de las zoonosis transmitidas por caballos en la salud pública.....	1
1.3. Enfermedades zoonóticas en caballos de etiología bacteriana	2
1.3.1. Leptospirosis	3
1.3.2. Rhodococcosis.....	5
1.4. Importancia de la detección de <i>Leptospira spp.</i> y <i>Rhodococcus equi</i>	7
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS.....	11
3.1. Objetivo general.....	11
3.2. Objetivos específicos	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1. Tipo de estudio	12
4.2. Recopilación de información	12
4.3. Criterio de inclusión y exclusión	12
4.4. Recolección de muestras y procesamiento de tejido	12
4.5. Procedimiento de tinciones	13
4.6. Análisis histopatológico.....	14
4.7. Detección de ADN de los agentes mediante qPCR	15
4.8. Cálculo de frecuencias	17
4.9. Prueba estadística	17
5. RESULTADOS	19

5.1 Objetivo 1: Identificar histopatológicamente lesiones sugerentes de <i>Leptospira spp.</i> mediante tinción de plata y Hematoxilina-Eosina, y para <i>Rhodococcus equi</i> mediante tinción Ziehl-Neelsen y Hematoxilina-Eosina, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.	19
5.2 Objetivo 2: Caracterizar histopatológicamente lesiones sugerentes de <i>Leptospira spp.</i> y <i>Rhodococcus equi</i> mediante un histoscore, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.	25
5.3 Objetivo 3: Detectar mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, la presencia de <i>Leptospira spp.</i> y <i>Rhodococcus equi</i> , en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.	30
5.4 Objetivo 4: Asociar la presencia o ausencia de lesiones sugerentes a <i>Leptospira spp.</i> y a <i>Rhodococcus equi</i> identificadas histopatológicamente, con la positividad o negatividad a la técnica qPCR, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.	31
6. DISCUSIÓN	35
6.1 Objetivo 1: Identificar histopatológicamente lesiones sugerentes de <i>Leptospira spp.</i> mediante tinción de plata y Hematoxilina-Eosina, y para <i>Rhodococcus equi</i> mediante tinción Ziehl-Neelsen y Hematoxilina-Eosina, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.	35
6.2 Objetivo 2: Caracterizar histopatológicamente lesiones sugerentes de <i>Leptospira spp.</i> y de <i>Rhodococcus equi</i> mediante un histoscore, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.	36
6.3 Objetivo 3: Detectar mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, la presencia de <i>Leptospira spp.</i> y <i>Rhodococcus equi</i> , en órganos de caballos. Y Objetivo 4: Asociar la presencia o ausencia de lesiones sugerentes a <i>Leptospira spp.</i> y a <i>Rhodococcus equi</i> identificadas histopatológicamente, con la positividad o negatividad a la técnica qPCR	37
7. CONCLUSIONES	40
8. BIBLIOGRAFÍA	42
9. ANEXOS	52
9.1 Anexo 1. Adaptación de “Instrucciones de uso de Steiner Stain Kit (For Spirochetes)”, ScyTek (2022).	52
9.2. Anexo 2. Adaptación de “Manual de laboratorio de técnica histológica”, por Jeraldine Poveda (2023).	53
9.3. Anexo 3. Guía de análisis tisular de la tecnóloga médico Jeraldine Poveda (2023).	57
9. 4. Anexo 4: Hallazgos macro y microscópicos de vaca con Paratuberculosis, se observan las bacterias ácido alcohol resistentes. Control positivo tinción Z-N.	58
9.5. Anexo 5. Intestino de cerdo con tinción S-S, diagnosticado con la espiroqueta <i>Lawsonia intracelularis</i> en la Unidad de Morfología y Diagnóstico de la Universidad San Sebastián, Sede de La Patagonia.	59

9.6. Anexo 6. Adaptación de “Histoscore”, adaptado por Gabriel Fernandez (2024), por Carla Barría (2023).	60
9.7. Anexo 7. Protocolo descrito para reactivo Brilliant II SYBRGreen qPCR por Stratagene (2007).	61
9.8. Anexo 8. Informe de Diagnóstico Serológico para <i>Leptospira spp.</i> con técnica de microMAT, del caso 133-24-N, por el Servicio Agrícola y Ganadero (2024). Control positivo de <i>Leptospira spp.</i>	63
9.9. Anexo 9. Adaptación de manual de “E.Z.N.A.® FFPE DNA Kit” por Omega Bio-Tek (2024).	64
9.10. Anexo 10. Tabla con resultados de cuantificación de ADN de muestras para qPCR (Elaboración propia, 2025).	66
9.11. Anexo 11. Decreto N°389 Exento, Ministerio de Agricultura (2019).	67
9.12. Anexo 12. P valores de Prueba Exacta de Fisher, calculados con GraphPad Prism 10, para trastornos inflamatorios. (Elaboración propia, 2025).	68
9.13. Anexo 13. P valores de Prueba Exacta de Fisher, calculados con GraphPad Prism 10, para asociación entre hallazgos histopatológicos de <i>Leptospira spp.</i> y resultado qPCR. (Elaboración propia, 2025).	69
9.14. Anexo 14. P valores de Prueba Exacta de Fisher, calculados con GraphPad Prism 10, para asociación entre hallazgos histopatológicos de <i>Rhodococcus equi</i> y resultado qPCR. (Elaboración propia, 2025).	70
9.15. Anexo 15. P valores de Prueba Exacta de Fisher, calculados con GraphPad Prism 10, para asociación entre tinción S-S y resultado qPCR. (Elaboración propia, 2025). ...	71
9.16. Anexo 16. P valores de Prueba Exacta de Fisher, calculados con GraphPad Prism 10, para asociación entre tinción Z-N y resultado qPCR. (Elaboración propia, 2025). ...	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tabla de contingencia para <i>Leptospira</i> spp. para la prueba Exacta de Fisher. Fuente: Elaboración propia, 2025.....	18
Tabla 2: Tabla de contingencia para <i>Rhodococcus equi</i> para prueba Exacta de Fisher. Fuente: Elaboración propia, 2025.....	18
Tabla 3: Tabla de contingencia para <i>Leptospira</i> spp. para prueba Exacta de Fisher, con H-E y qPCR. Fuente: Elaboración propia, 2025.	31
Tabla 4: Tabla de contingencia para <i>Rhodococcus equi</i> para prueba Exacta de Fisher, con H-E y qPCR. Fuente: Elaboración propia, 2025.	32
Tabla 5: Tabla de contingencia para <i>Leptospira</i> spp. para prueba Exacta de Fisher, con S-S y qPCR. Fuente: Elaboración propia, 2025.	33
Tabla 6: Tabla de contingencia para <i>Rhodococcus equi</i> para prueba Exacta de Fisher, con Z-N y qPCR. Fuente: Elaboración propia, 2025.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Hallazgos histopatológicos sugerentes a Leptospira spp. y Rhodococcus equi en órganos de caballo. Fuente: Elaboración propia, 2025.....	21
Figura 2: Frecuencias absolutas de lesiones identificadas mediante tinción H-E. Fuente: Elaboración propia, 2025.	22
Figura 3: Identificación de Leptospira spp. y Rhodococcus equi mediante tinción S-S y Z-N respectivamente. Fuente: Elaboración propia, 2025.	23
Figura 4: Frecuencias absolutas de Leptospira spp. y Rhodococcus equi identificados mediante tinciones especiales. Elaboración propia, 2025.....	24
Figura 5: Gráfico de frecuencias absolutas de órganos con trastornos inflamatorios. Elaboración propia, 2025.....	26
Figura 6: Gráfico de frecuencias absolutas de órganos con trastornos circulatorios. Elaboración propia, 2025.....	27
Figura 7: Gráfico de frecuencias absolutas de órganos con trastornos necróticos. Elaboración propia, 2025.	28
Figura 8: Gráfico de frecuencias absolutas de órganos con trastornos degenerativos. Elaboración propia, 2025.....	29
Figura 9: Frecuencias absolutas de órganos positivos y negativos a Leptospira spp. y a Rhodococcus equi mediante técnica qPCR.	30

RESUMEN

Leptospira spp. y *Rhodococcus equi*, son bacterias que afectan a los caballos, principalmente en forma subclínica, pero son relevantes de detectar debido al potencial zoonótico. Este estudio tuvo como objetivo analizar histopatológicamente y detectar mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) la presencia de *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi* en órganos de caballos. Se analizaron tejidos de riñón, hígado, pulmón e intestino, pertenecientes a 18 caballos, con tinciones Hematoxilina-Eosina (H-E), Stainer-Stain (S-S), y Ziehl-Neelsen (Z-N). Además, se utilizó qPCR para identificar a los agentes. Se observaron lesiones sugerentes a *Leptospira spp.* con H-E en 14 tejidos, y en 1 se observaron espiroquetas con S-S, sin embargo, ninguno presentó positividad al qPCR. Por otro lado, con H-E se observaron 19 tejidos con lesiones sugerentes a *Rhodococcus equi*, en 3 tejidos se observaron las bacterias intracelulares ácido alcohol resistentes con Z-N y 4 fueron positivos a qPCR. Se aplicó la prueba de exacta de Fisher para relacionar los resultados. No existe asociación entre las lesiones histopatológicas con tinción H-E, ni de *Leptospira spp.*, ni de *Rhodococcus equi*, con el qPCR. Tampoco existió asociación entre la positividad con tinción S-S y el qPCR, pero si lo hubo entre la tinción a Z-N y qPCR, con un p valor = 0,0351. Estos resultados permiten aceptar la hipótesis de forma parcial, ya que se pudo comprobar la presencia de *Rhodococcus equi* mediante histopatología y qPCR. Sin embargo, *Leptospira spp.* no fue detectada mediante qPCR, a pesar de la presencia de lesiones sugerentes en la histopatología.

Palabras clave: *Leptospira spp.*, *Rhodococcus equi*, caballos, histopatología, qPCR.

ABSTRACT

Leptospira spp. and *Rhodococcus equi* are bacteria that affect horses, mainly in a subclinical form, but are important to detect due to their zoonotic potential. This study aimed to perform histopathological analysis and detect the presence of *Leptospira spp.* and *Rhodococcus equi* in horse organs using real-time polymerase chain reaction (qPCR). Kidney, liver, lung, and intestinal tissues, from 18 horses, were analyzed using Hematoxylin-Eosin (H-E), Steiner-Stain (S-S), and Ziehl-Neelsen (Z-N) stains. Additionally, qPCR was used to identify the agents. Lesions suggestive of *Leptospira spp.* were observed with H-E in 14 tissues, and spirochetes were detected with S-S in 1 tissue; however, none tested positive by qPCR. On the other hand, 19 tissues showed lesions suggestive of *Rhodococcus equi* with H-E, intracellular acid-fast bacteria were observed with Z-N in 3 tissues, and 4 samples were positive by qPCR. Fisher's exact test was applied to correlate the results. No association was found between histopathological lesions detected with H-E staining, either for *Leptospira spp.* or *Rhodococcus equi*, and qPCR results. No association was found between S-S staining and qPCR either, but there was an association between Z-N staining and qPCR, with a p-value = 0.0351. These results allow partial acceptance of the hypothesis, since the presence of *Rhodococcus equi* could be confirmed by both histopathology and qPCR. However, *Leptospira spp.* was not detected by qPCR despite the presence of suggestive lesions in the histopathological analysis.

Key words: *Leptospira spp.*, *Rhodococcus equi*, horses, histopathology, qPCR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos históricos del caballo y su relación con los humanos

Los humanos y los caballos (*Equus ferus caballus*) han tenido una relación muy cercana desde hace miles de años, comenzando por su domesticación por parte de las tribus aledañas al Mar Caspio entre Europa y Asia, lo cual fue clave para la progresión humana. Posteriormente los conquistadores españoles introdujeron el caballo al continente americano, contribuyendo así, al desarrollo de sociedades más complejas (Hartley, 1985). Por otra parte, una serie de enfermedades infecciosas han estado presentes en la historia evolutiva de los caballos, tales como: Anemia Infecciosa Equina, Rabia, Influenza Equina, Tétano, Salmonelosis, Leptospirosis, entre muchas otras. Algunas de las mencionadas anteriormente, son enfermedades transmisibles al ser humano (Dominguez et al., 2016; Sack et al., 2020; Sing, 2015). Éstas se han convertido en el tiempo, en un problema importante de salud pública, dado que actualmente millones de personas tienen contacto con los caballos por diferentes motivos, ya sea recreativo, deporte, trabajo, transporte, alimento, entre otras razones. Se ha estimado que alrededor del 7% de la población realiza algún deporte a caballo al menos una vez al año, siendo estos deportes más populares que la pesca, el cricket o el rugby (Sing 2015).

1.2. Relevancia de las zoonosis transmitidas por caballos en la salud pública

Las zoonosis son enfermedades infecciosas originadas por microorganismos como bacterias, virus, hongos o protozoos, que son transmitidos desde los animales vertebrados hacia el ser humano (Chomel, 2009). La transmisión de estos patógenos se puede ver influenciada por diferentes factores como el cambio climático, la migración, vectores biológicos, entre otros (Rahman, 2020). Se han identificado 56 patógenos que pueden transmitirse desde los caballos hacia los humanos, siendo casi la mitad de éstos, un 46,4%, de origen bacteriano mientras que un 28,6% son de origen viral. Las principales formas de transmisión de éstos patógenos son por vía oral, vía respiratoria o por exposición cutánea (Sack et al., 2020). Estos microorganismos pueden causar

importantes cuadros gastrointestinales, nerviosos o sistémicos que pueden terminar incluso con la muerte del caballo o del humano (Muscatello, 2012; Sack et al., 2020; Sing, 2015). No obstante, muchos de los profesionales de la salud pública no están en conocimiento de las enfermedades zoonóticas transmitidas por los caballos. Es así como en el año 2013, en Canadá, se realizó una encuesta, en donde más de dos tercios de los encuestados respondió que los caballos no eran relevantes para la salud pública (Snedeker et al., 2013). Afortunadamente las enfermedades que pueden transmitirse de caballos a humanos son menos en comparación a las de otros vertebrados, sin embargo, debido a la cercanía que hay entre estas dos especies, por los motivos ya mencionados, la exposición a ciertas enfermedades de los caballos puede ser más probable que en el caso de otros animales (Sing, 2015).

1.3. Enfermedades zoonóticas en caballos de etiología bacteriana

Muchas enfermedades de los animales son causadas por bacterias debido a su amplia presencia en los organismos vivos, componiendo la denominada microbiota (Wang et al., 2024). Por ejemplo, *Salmonella spp.* es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*, que forma parte de la microbiota del caballo y de otros animales (Nachon y Bosisio, 2005). Tiene forma de bacilo y Gram negativa, lo que se debe a la presencia de lipopolisacáridos en su membrana externa. No forma esporas y es anaerobia facultativa, lo que significa que puede desarrollarse tanto en ambientes con oxígeno como en su ausencia (Majak et al., 2018). Esta bacteria es relevante para la salud humana ya que cuenta con una distribución a nivel mundial, y se transmite a las personas por ingesta de alimentos contaminados y por contacto con animales infectados, causando síntomas entéricos como diarrea. La facilidad de su transmisión y su amplia distribución la hace una de las enfermedades zoonóticas más reportadas (European Centre for Disease Prevention and Control, 2022).

Otro ejemplo es *Clostridium tetani*, agente etiológico del tétano, la cual, según Nachon y Bosisio (2005) “*C. tetani* es un habitante normal del tracto gastrointestinal del equino y se encuentra en los suelos y las heces.” (p. 21). Esta es una bacteria Gram positiva, con morfología de bacilo y anaeróbica, lo que significa que requiere de condiciones sin oxígeno. Se encuentra en animales infectados y comúnmente en la tierra, esto gracias a su capacidad para formar esporas, lo que le permite permanecer inactiva en el ambiente.

La mayoría de los animales pueden contraer tétano, incluyendo a los humanos (Popoff, 2020). Esta enfermedad es grave ya que puede causar la muerte al individuo debido a la parálisis de la musculatura respiratoria (Uzal et al., 2022).

Existen otras enfermedades zoonóticas en caballos originadas por bacterias que se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente como la leptospirosis y la rhodococcosis.

1.3.1. Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad que puede afectar a la gran mayoría de los vertebrados y es producida por la bacteria del género *Leptospira spp.*, espiroqueta, aerobia obligada. La bacteria está presente en cuerpos de agua superficiales y en sectores donde haya orinado un animal infectado (Nachon y Bosisio, 2005). El género de *Leptospira* se divide en tres grupos de acuerdo a su patogenicidad, de las cuales siete especies son saprófitas (*L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. yanagawae* y *L. idonii*), cinco especies son patógenas intermedias (*L. inadai*, *L. wolffii*, *L. licerasiae*, *L. fainei* y *L. broomii*) y nueve especies son patógenas (*L. kmetyi*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, *L. noguchii* y *L. alstoni*) (Torres et al., 2016). De este último grupo se describen hasta 250 serovares distintos capaces de infectar animales, incluyendo a humanos, ocasionando desde cuadros subclínicos hasta cuadros severos o incluso la muerte (Lehmann et al., 2014). Según Bonhomme y Werts (2022), *Leptospira interrogans* sería la especie responsable de los casos de leptospirosis más severos (p. 2).

En cuanto a su estructura, las bacterias del género *Leptospira* presentan una composición atípica de la pared celular. Nombrando desde lo más interno hasta lo más externo, posee una membrana citoplasmática interna compuesta por fosfolípidos, seguido de una capa de peptidoglicano. Dichas capas están mucho más próximas entre sí que en otras bacterias, lo que genera debate entre los distintos autores, si es o no una bacteria Gram negativa, ya que algunos no la clasifican como tal, debido a su poca afinidad a la tinción Gram (Arent et al., 2022; Bonhomme y Werts, 2022; Haake, 2000). Sobre la capa de peptidoglicano presenta dos endoflagelos en el periplasma, los cuales proveen de movilidad a la bacteria. Sobre el periplasma cuenta con una membrana

externa con lipopolisacáridos (LPS), los cuales serán detectados como antígenos por el sistema inmune del hospedero (Bonhomme y Werts, 2022).

La bacteria ingresa a través de heridas o mucosas, al tener contacto con cuerpos de agua u orina infectada, ayudándose del movimiento de los endoflagelos y de la enzima hialuronidasa, la cual le permite degradar el ácido hialurónico presente en la matriz extracelular. En caso de potrillos, pueden infectarse a través de la madre vía transplacentaria (Lehmann et al., 2014). *Leptospira spp.* llega a circulación sanguínea, denominada como fase de bacteremia, la cual dura alrededor de una semana, periodo en donde pueden o no presentarse cuadros febriles. En esta fase se daña el endotelio vascular ocasionando isquemia en múltiples órganos, generando una vasculitis sistémica, y en casos más severos causa necrosis debido a la falta de irrigación sanguínea de los tejidos. Luego, se producen anticuerpos y el sistema inmune ataca a la bacteria presente en la sangre, y se aloja en tejidos varios como hígado, bazo, ojo, glándula mamaria y órganos génito-urinarios, pero, sobre todo en riñones. En riñones causa inflamación, necrosis tubular, nefritis y como consecuencia, hay hematuria (Adler y De la Peña, 2010; Lehmann et al., 2014; Sellon y Long, 2013).

La presentación de la enfermedad puede darse con signos inespecíficos como fiebre, letargia y anorexia, o también, en cuadros más severos hay uveítis recurrente, falla renal aguda, abortos, placentitis, ictericia, anemia hemolítica, hematuria intermitente, entre otros. Ya que la gravedad de la leptospirosis depende de varios factores, puede que no se evidencien signos agudos y que sólo se detecten las secuelas. Por ejemplo, la uveítis, que se suele detectar en caballos meses después de la fase de bacteremia (Fagre et al., 2020). La leptospirosis en humanos suele ser asintomática, sin embargo, existe la probabilidad de presentarse como forma icterica, la cual tiene un pronóstico más reservado (Romero y Falconar, 2016).

Los hallazgos de necropsia en caballos son principalmente ictericia generalizada y petequias en diferentes órganos. En histopatología se puede observar en hígado una disrupción de los cordones hepáticos, debido al daño ocasionado al tejido, colestasis intrahepática, hipertrofia e hiperplasia de las células de Kupffer. En riñones se observa glomerulonefritis y nefritis tubulointersticial con intenso infiltrado inflamatorio neutrofílico

y con presencia de monocitos. También se observa vasculitis generalizada con presencia de infiltrado inflamatorio monocítico, histiocítico y neutrofílico. Además se puede observar focos de hemorragia pulmonar y miocarditis. Se describe el uso de tinción de plata y Hematoxilina y Eosina (H-E) para detectar la presencia de la bacteria en tejido (Agudelo et al., 2013; Nachon y Bosisio, 2005; Naseema et al., 2017; Sellon y Long 2013, Yadeta et al., 2016; Yan et al., 2010). Otros métodos de diagnóstico son la prueba de MAT (Test de Macro Aglutinación), test de ELISA (Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas) y qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real). Para este último método mencionado se describe el uso de primers directo e inverso basado en la secuencia de la lipoproteína de membrana LipL32, esto debido a que es la proteína de mayor presencia en la superficie de la membrana y, además, es específica de la forma patógena de *Leptospira spp.* (Adler y De La Peña, 2010).

En cuanto al tratamiento, Wuthiekanun, et al. (2015) realizaron un estudio con antibiograma para ver la susceptibilidad de *Leptospira spp.* a diferentes antimicrobianos. Como resultado, se determinó que la bacteria es sensible a la doxiciclina, amoxicilina, ceftriaxona y azitromicina. Además de terapia antibiótica, se describe uso de fluidoterapia debido a la falla renal aguda en los caballos y puede ser acompañada con diuréticos como la furosemida (Divers et al., 2019).

Para prevenir la leptospirosis es de suma importancia la vacunación, ya que se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente al ser una bacteria presente en el agua y que, además es diseminada por la orina de animales reservorios como los ratones. También es importante evitar la ingesta de fuentes de agua estancada, debido a que es el ambiente ideal de *Leptospira spp.* En caso de haber un caballo positivo debe ser aislado ya que al eliminar la bacteria por la orina puede transmitirse fácilmente a otros animales (Nachon y Bosisio, 2005).

1.3.2. Rhodococcosis

Rhodococcosis es la enfermedad causada por la bacteria cocobacilo *Rhodococcus equi*, Gram positiva, es decir que se tiñe con la tinción de Gram dado a que no presenta una membrana externa. Es aerobia y se encuentra en el ambiente, generalmente en tierra enriquecida con restos de heces. Es intracelular facultativa (Madaramé et al., 1996), por

lo que si tiene la oportunidad se hospedará y replicará al interior de las células donde utiliza el plásmido virulento linear pVapN (Vap es una proteína altamente inmunogénica y lipomodificada asociada a la virulencia) (Lohse et al., 2019; Vázquez-Boland et al., 2013). Esta enfermedad puede presentarse en los animales y en humanos, pero principalmente se observa en potrillos de hasta 6 meses de edad aproximadamente. Los casos de rhodococcosis en humanos se han reportado en aquellos que cursan con enfermedades inmunodepresoras como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) o en aquellos que estén en tratamiento con fármacos que puedan causar un efecto similar, como los corticoides (Stranahan et al., 2018).

Rhodococcus equi puede transmitirse vía digestiva, ocasionando enteritis ulcerativa, sin embargo, esta no es la principal presentación clínica. La vía de transmisión en los potrillos más común es la inhalatoria, al aspirar partículas con el agente (Muscatello, 2012), ocasionando así la principal manifestación de esta enfermedad en potrillos, la neumonía piogranulomatosa (Sellon y Long, 2013). Al llegar la bacteria a la vía sanguínea se disemina a distintos órganos donde forma piogranulomas. En el tejido la bacteria es fagocitada por los macrófagos. En el interior, *Rhodococcus equi* evita la unión del fagosoma con el lisosoma, evitando así su degradación, causando posteriormente la muerte celular a causa de una necrosis licuefactiva, dando origen a la formación de abscesos. Además, en respuesta a la infección, muchas células inmunes llegan al lugar generando el característico piogranuloma (Lin et al., 2019). Debido a este mismo mecanismo se da origen a la malacoplaquia, la cual es una condición inflamatoria crónica que se caracteriza por la formación de placas de macrófagos con cuerpos de inclusión basofílicos, llamados cuerpos de Michaelis-Gutmann, que se observan comúnmente en pulmones y en intestino (Yamshchikov et al., 2010).

Los principales signos observados en los potrillos con rhodococcosis son fiebre, tos, taquicardia, y ruidos respiratorios tanto en tráquea como en pulmón. En la forma digestiva se presenta diarrea, cólico y disminución de la condición corporal debido a la falta de absorción de nutrientes (Pal et al., 2023).

En la necropsia de caballos infectados por *Rhodococcus equi* se describe presencia de abscesos en pulmones, hígado, en médula ósea y linfonódulos mesentéricos caseosos.

También se describen placas granulomatosas o llamadas malacoplaquia, en pulmones y en intestino. En la mucosa entérica se pueden observar úlceras circulares. En hallazgos histopatológicos se observan necrosis e infiltrado inflamatorio neutrofílico e histiocítico (Paredes et al., 2000). Para la tinción de la bacteria se utiliza Ziehl-Neelsen (Z-N), ya que es una bacteria levemente ácido alcohol resistente. Debido a esto, se recomienda el uso de la tinción modificada, donde se reemplaza el alcohol ácido por ácido sulfúrico en una concentración de 0,5 a 1% para una mayor decoloración de la bacteria (Garcia, 2013). Con esta tinción se observa la bacteria de un color rojizo o rosáceo. Otro método de diagnóstico es el PCR utilizando primers directo e inverso, basados en la secuencia del Vap (Lohse et al., 2019).

Con el paso de los años *Rhodococcus equi* ha presentado resistencia antimicrobiana a una gran variedad de fármacos. No obstante, actualmente se recomienda el uso de rifampicina acompañada de eritromicina o azitromicina como una de las terapias, y también doxiciclina sola o acompañada de azitromicina. El uso de tulatromicina también está descrito (Rakowska et al., 2020).

Como medida preventiva se recomienda la aplicación de vacunas como Rhodovac, la cual no se encuentra en Chile, pero puede ser importada desde Argentina con una solicitud especial por medio de la Federación de Criadores de Caballos FSC (Federación de Caballos de Raza Chilena, 2022).

1.4. Importancia de la detección de *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi*

Ambas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente y tienen la capacidad de causar enfermedad en caballos y en seres humanos (Nachon y Bosisio, 2005; Sellon y Long, 2013). Además, existe la posibilidad de coinfección de *Leptospira spp.* con *Rhodococcus equi*, en conjunto con otras bacterias, generando graves consecuencias en la salud como abortos, sepsis o muerte (Trevisan et al., 2014).

Es relevante el estudio de *Leptospira spp.* ya que los caballos pueden actuar como reservorios sin presentar signología, la cual es una de las razones por la que la enfermedad es poco diagnosticada en caballos (Díaz et al., 2023; Verma et al., 2013), haciendo que el potencial de transmisión entre especies y al ser humano sea mayor. La caracterización histopatológica de las lesiones posiblemente causadas por este agente y

además su detección mediante PCR son de utilidad, considerando que es subdiagnosticada y se encuentra presente en todo el mundo (Trimble et al., 2018). En Chile se han reportado caballos con una seroprevalencia, diagnosticada con técnica MAT, de entre 23% y 65% (Azócar-Aedo, 2023), y en la Región de Los Lagos se detectó una seroprevalencia de *Leptospira* patógena de 68% (Moreno et al., 2024). Esto indica que la bacteria está presente en el país, y es necesario establecer si además existe infección en estos animales para tomar medidas preventivas.

La detección de *Rhodococcus equi* es importante ya que afecta principalmente a potrillos causando la muerte en la mayoría de las ocasiones y puede estar presente en caballos adultos quienes eliminan el agente al ambiente, presentando o no signología clínica (Nachon y Bosisio, 2005; Sellon y Long, 2013), lo que se traduce a problemas reproductivos y pérdidas económicas. En Chile se han detectado casos de rhodococcosis en caballos (Lohse et al., 2019; Márquez, 2006; Miranda, 2003; Paredes et al., 2000; Zúñiga et al, 2023), por lo que es importante poder contribuir con información sobre las lesiones ocasionadas en los tejidos observadas mediante histopatología y además su confirmación mediante qPCR. Cabe mencionar, que según el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), es una Enfermedad de Denuncia Obligatoria (EDO) presente en Chile con presentación periódica (SAG, 2019; SAG, 2022).

La investigación de las enfermedades en caballos es de suma importancia, tanto para la salud animal como para la salud humana. Esto debido a que, como se ha mencionado anteriormente, muchas enfermedades pueden tener graves consecuencias para la salud de los caballos, y también son zoonóticas, causando cuadros clínicos en las personas (Levings, 2012; Sack, 2020). El estudio de los diferentes agentes etiológicos, su patogenia (o la forma en la que desarrollan la enfermedad en el organismo), cómo se transmiten, su prevención, entre otros factores, es fundamental para desarrollar nuevas estrategias preventivas y minimizar los riesgos de contagio (Skowron et al., 2023).

En esta oportunidad se ha decidido estudiar *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi*, con técnicas histopatológicas como tinciones y moleculares como qPCR, con el fin de enriquecer la información disponible, contribuyendo así a la protección de los caballos y, a su vez, se previene su propagación a las personas especialmente a aquellas que

trabajan estrechamente con estos animales. Todo lo anterior se relaciona con el actual enfoque de “One Health”, adoptado a nivel mundial por las ciencias de la salud animal y humana.

2. HIPÓTESIS

Los órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico de la Universidad San Sebastián Sede de La Patagonia, entre el año 2011 y mayo de 2025, analizados mediante histopatología y sometidos a detección con reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real, de *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi*, comprueban la presencia de estos patógenos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Analizar histopatológicamente y detectar mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real la presencia de *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi* en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico de la Universidad San Sebastián Sede de La Patagonia entre el año 2011 hasta mayo de 2025.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Identificar histopatológicamente lesiones sugerentes de *Leptospira spp.* mediante tinción de plata y Hematoxilina-Eosina, y para *Rhodococcus equi* mediante tinción Ziehl-Neelsen y Hematoxilina-Eosina, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.
- 2) Caracterizar histopatológicamente lesiones sugerentes de *Leptospira spp.* y de *Rhodococcus equi* mediante un histoscore, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.
- 3) Detectar mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, la presencia de *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi*, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.
- 4) Asociar la presencia o ausencia de lesiones sugerentes a *Leptospira spp.* y a *Rhodococcus equi* identificadas histopatológicamente, con la positividad o negatividad a la técnica qPCR, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Tipo de estudio

El estudio realizado fue de tipo descriptivo no experimental, ya que se realizó una observación y descripción sencilla de las lesiones mediante histopatología, y posible presencia de *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi*, en órganos de caballos sin intervención de éstas. Fue de tipo transversal cuantitativo, debido a que se analizaron muestras de un periodo establecido de tiempo, sin seguimiento de los casos y porque se determinó la prevalencia de los agentes etiológicos anteriormente mencionados (Fletcher, 2021; Hernández-Sampieri y Mendoza, 2018).

4.2. Recopilación de información

La información de los casos de caballos evaluados provino de libros de registros de histopatología y de necropsia, pertenecientes a la Unidad de Morfología y Diagnóstico de la Universidad San Sebastián, Sede de La Patagonia, los cuales contaban con información a partir del año 2011, hasta el año 2025. El tamaño poblacional que se utilizó en el presente estudio fue de 18 caballos, considerando todos los casos que estaban disponibles dentro del periodo establecido, que cumplieron con los criterios de inclusión.

4.3. Criterio de inclusión y exclusión

En el estudio se incluyeron los casos que presentaron al menos uno de los órganos de caballos (*Equus ferus caballus*) de interés, es decir, hígado, riñón, intestino y pulmón, ingresados hasta mayo de 2025. Se excluyeron todos aquellos casos que no fueron de interés en el análisis de las enfermedades estudiadas, que no incluían los órganos mencionados.

4.4. Recolección de muestras y procesamiento de tejido

Los materiales que se utilizaron para procesar el tejido fueron formalina al 10%, cuchillo para histología, tabla para cortar, cassettes de plástico, lápiz grafito para rotular, un procesador de tejidos STP 120 de Myr proveído por Biolmaging Chile, un dispensador de

parafina AISET YLD2000 proveído por Winkler, una estufa Binder proveída por Arquimed y portaobjetos (Poveda, 2023).

Se recolectaron los frascos con muestras de órganos, obtenidos en necropsias de caballos realizadas entre el año 2011 hasta el año 2025, disponibles en la Unidad de Morfología y Diagnóstico.

De las muestras en formalina al 10% se seleccionaron y realizaron cortes transversales y longitudinales, de hígado, pulmón, riñón e intestino, con un cuchillo para histología. Por cada órgano se seleccionaron 4 cortes, los cuales fueron dispuestos en cuatro cuadrantes en los *cassettes* rotulados. De cada uno de los cortes seleccionados se extrajo una muestra de 10 µm de grosor, representando los cuatro cuadrantes, para la detección con qPCR, las cuales fueron almacenadas en un tubo ependorf con formalina a 4°C hasta el momento de su análisis.

Para el procesamiento histológico de rutina, los tejidos formolados fueron lavados en agua y luego se deshidrataron e impregnaron con parafina con un procesador de tejidos STP 120. Luego con ayuda de moldes de metal se introdujo parafina desde un dispensador de parafina AISET YLD2000 y se dejó secar en estufa Binder. Una vez formado el taco con la muestra, se realizaron cortes de los tacos solidificados por medio de un micrótopo Leica RM2125. Los cortes fueron dispuestos en agua a 40° - 45°C para extenderlas y posteriormente fueron recogidos en un portaobjetos (Muenz y Vera, 2021; Poveda, 2023).

4.5. Procedimiento de tinciones

Los materiales que se requirieron para realizar la histopatología son las láminas obtenidas con los tejidos procesados anteriormente, y las tinciones especiales. Las tinciones utilizadas fueron hematoxilina y eosina para tinción H-E, fucsina y azul de metileno las cuales fueron marca Winkler, para tinción Z-N. Además, un kit de tinción de plata Steiner-Stain Kit de ScyTek.

La lámina obtenida en blanco, fue dispuesta en un portaobjetos, para realizar la tinción del tejido, con el fin de poder visualizar sus diferentes componentes. Se realizaron tinciones con Hematoxilina-Eosina (H-E) el cual se aplicó de rutina, Ziehl Neelsen (Z-N)

para la demostración de *Rhodococcus equi*, de acuerdo con la Guía de Análisis Tisular de la Unidad de Morfología y Diagnóstico y, tinción de plata Steiner-Stain Kit para demostración de *Leptospira spp.*, según las instrucciones del laboratorio ScyTek (Anexo 1).

Todas las muestras de órganos utilizadas fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina, pero solo se tiñeron con tinción de plata Steiner-Stain Kit aquellos órganos que presentaron lesiones histopatológicas sugerentes de *Leptospira spp.* y con Ziehl Neelsen aquellas con lesiones sugerentes a *Rhodococcus equi* en el análisis histopatológico.

La tinción de H-E sirve para diferenciar el citoplasma con el núcleo de las células que componen un tejido. Para la visualización de los núcleos se aplica la tinción de hematoxilina, la cual se observa de un color violáceo oscuro, mientras que para el citoplasma se aplica la eosina, la cual deja un tinte rosa. Esta tinción fue útil para detectar alteraciones en el tejido como inflamación, degeneración, necrosis, hemorragia. La tinción se realizó en base a la guía de análisis tisular de Jeraldine Poveda (Poveda, 2023) (Anexo 2).

Para la observación de *Rhodococcus equi* en los tejidos, se utilizó la tinción de Z-N, la cual es de elección para bacterias ácido alcohol resistentes, de acuerdo con la guía de análisis tisular de la tecnóloga médico Jeraldine Poveda (Poveda, 2023) (Anexo 3). Como control positivo para esta tinción, se utilizó un corte de submucosa intestinal con tinción Z-N de una vaca diagnosticada con paratuberculosis, donde se observan bacterias ácido alcohol resistentes (Zhu et al., 2020) (Anexo 4).

Para la observación de *Leptospira spp.* en los tejidos se utilizó Steiner-Stain Kit, la cual es una tinción de plata para la demostración de espiroquetas. Como control positivo para esta tinción, se utilizó un corte de intestino de cerdo con presencia de la bacteria de tipo espiroqueta *Lawsonia intracelullaris* (Campillo et al., 2021) (Anexo 5).

4.6. Análisis histopatológico

Para analizar las muestras de cada órgano mediante microscopía, se utilizó un Microscopio Leica DM500. Se visualizaron láminas ya teñidas de cada órgano, realizando inicialmente un barrido a aumento menor (4X) en la totalidad de la muestra,

para luego elegir 10 campos microscópicos aleatorios a aumentos medio y mayor (10X y 40X). Al momento de observar bacterias con tinciones especiales se utilizó objetivo 100X con aceite de inmersión. Los hallazgos fueron registrados en planillas, donde luego se aplicó un histoscore de inflamación, degeneración, necrosis y hemorragia.

Se aplicó una escala o histoscore para caracterizar de forma objetiva y para clasificar, dependiendo del grado de las lesiones presentes (ausente, focal, multifocal o difusa) cada una de las lesiones observadas, asociadas a trastornos de diferentes tipos como circulatorios, necróticos, inflamatorios y degenerativos (Anexo 6).

Los resultados fueron presentados a través de descripciones e imágenes histopatológicas, tablas con puntaje de histoscore para cada órgano y gráficos con frecuencias.

4.7. Detección de ADN de los agentes mediante qPCR

La técnica de qPCR fue realizada en el Laboratorio Institucional de Investigación de la Universidad San Sebastián Sede de La Patagonia, bajo supervisión del bioquímico Juan Pablo Pontigo.

Se utilizaron muestras de hígado, riñón, pulmón e intestino con lesiones para la detección de *Rhodococcus equi*, y de *Leptospira spp.* También se utilizaron muestras de los órganos previamente mencionados pero que no presentaron lesiones a la histopatología, ya que, posteriormente se realizaron asociaciones entre las muestras con y sin lesiones, y qPCR positivo y negativo. Se utilizó el kit de extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) E.Z.N.A.® FFPE DNA Kit (Omega Biotek) para tejidos formolados y parafinados, incluyendo etanol, xilol. Para la cuantificación de ADN se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop. Como colorante para la cuantificación del material genético se utilizó el reactivo SybrGreen qPCR (Stratagene) (Anexo 7). Los partidores específicos para el gen LipL32 de *Leptospira spp.* patógena con secuencia Forward (5'-GGATCCGTGTAGAAAGAATGTCCG-3') y secuencia Reverse (5'-GTCACCATCATCATCATCGTCC-3') (Wu et al., 2014) y, para el gen de *Rhodococcus equi*, VapA, se utilizaron las secuencias Forward (5'-AACGGTCGAGCAAGCGATAC-3') y Reverse (5'-GGCCCGAATACGTGAAACCT-3') (Harrington et al., 2005). Ambos

partidores fueron diseñados por Integrated DNA Technologies®. Además, se utilizó un termociclador de tiempo real BioRad® CFX96 Touch Real-Time, micropipetas, puntas con filtro, tubos de microcentrífuga, alcohol 70°, y una campana de flujo laminar. Como bioseguridad, guantes de nitrilo y delantal.

Se utilizaron controles positivos. Para *Leptospira spp.* se utilizó una muestra fijada en formalina al 10% de un ternero abortado, cuya madre fue previamente confirmada con la presencia del agente por medio de técnica MAT (Prueba de Aglutinación Microscópica), número de caso 133-24-N (Levett, 2001) (Anexo 8). Para *Rhodococcus equi*, se utilizaron tejidos de riñón, pulmón, intestino e hígado, pertenecientes a un caballo previamente diagnosticado con el agente mediante técnica qPCR, el cual fue donado a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, por el doctor Matías Eduardo Belotti, académico e investigador del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET), Argentina. Como control negativo se utilizaron tubos de microcentrífuga con agua destilada, con ausencia de material genético de los agentes de interés.

Se extrajo el ADN total de los tejidos de órganos en formalina y parafinados mediante el kit de extracción E.Z.N.A.® FFPE DNA Kit, de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante (Anexo 9). Luego se cuantificó el material genético de las muestras mediante el espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop para establecer la pureza del ADN y evidenciar si existió contaminación en las muestras (Anexo 10).

Para el PCR en tiempo real, primero se prepararon los mix con el reactivo Brilliant II SYBRGreen qPCR (Stratagene), agua libre de ADNasas y LipL32 oligos o VapA oligos (partidores específicos especialmente diseñados para detección de *Leptospira spp.* LipL32, y VapA para detección de *Rhodococcus equi* respectivamente), de forma separada. Luego se añadió el ADN extraído con anterioridad a la mezcla. Posteriormente, se realizó la amplificación de los genes en un termociclador de tiempo real BioRad® CFX96 Touch Real-Time.

Finalmente, se procedió al análisis de datos para evaluar la diferencia de cambios de expresión, lo que reflejó la cantidad de ADN amplificado en tiempo real de *Leptospira spp.* y de *Rhodococcus equi* en los tejidos de caballo. Se consideraron como positivas

aquellas muestras que presentaron un valor de Ct entre 18 y 35, de acuerdo con literatura (Bustin et al., 2009; Caraguel et al., 2011; Kubista et al., 2006; Wu et al, 2014). Los resultados fueron estructurados en tablas indicando el órgano y si fue positivo o negativo con la técnica de qPCR para *Leptospira spp.* y/o *Rhodococcus equi* (Tabla 1). Los casos positivos a *Rhodococcus equi*, fueron reportados al Servicio Agrícola y Ganadero, según lo indicado en el Decreto 389 (Anexo 11) (SAG, 2019).

4.8. Cálculo de frecuencias

Se calcularon las frecuencias absolutas y frecuencias porcentuales de órganos con lesiones y sin lesiones concordantes con *Leptospira spp.* y, por separado, con *Rhodococcus equi*. De forma paralela se calcularon las frecuencias de los casos positivos y negativos a la técnica qPCR. Las frecuencias de las lesiones por órgano han sido presentadas en gráficos. Las frecuencias porcentuales se calcularon con la fórmula: $(\text{frecuencia absoluta} \times 100) / \text{total de muestras}$ (Hernández-Sampieri y Mendoza, 2018).

4.9. Prueba estadística

Para verificar si existió relación entre la presencia se trastornos (inflamatorios, circulatorios, necróticos y degenerativos) con los órganos, se realizó la prueba exacta de Fisher con el programa GraphPad Prism 10, utilizando las frecuencias absolutas de los histoscore. Se estableció un nivel de significancia de 0,05 lo que indicaría que si el p-valor es $< 0,05$ existe asociación entre las variables (Clifford y Taylor, 2008; Martínez et al., 2014; Milton, 2007; Moncho, 2015). Además, se ponderaron los puntajes de histoscore por órgano, donde el órgano con mayor puntaje es el más afectado por el trastorno evaluado, con la siguiente fórmula: $(\text{cantidad de trastornos} \times 0) + (\text{cantidad de trastornos} \times 1) + (\text{cantidad de trastornos} \times 2) + (\text{cantidad de trastornos} \times 3) = \text{puntaje ponderado}$ (Ramos-Vara, 2011).

Posteriormente, se realizó nuevamente la prueba exacta de Fisher, con el fin de establecer si existió o no relación entre la presencia o ausencia de lesiones en los tejidos identificados mediante histopatología, y la positividad o negatividad de la detección de *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi* mediante qPCR. Asimismo, se aplicó

esta prueba estadística para establecer asociación entre la identificación de los agentes y el resultado qPCR, de forma individual. La organización de los datos se realizó mediante tablas de contingencia de 2x2, elaboradas con Microsoft Excel® (**Tabla 1** y **Tabla 2**) y fueron analizadas mediante el programa GraphPad Prism 10. Cabe destacar, que al igual que para la estadística del histoscore, se estableció un nivel de significancia de 0,05; (Clifford y Taylor, 2008; Hernández-Sampieri y Mendoza, 2018; Martínez et al., 2014; Milton, 2007; Moncho, 2015).

Tabla 1: Tabla de contingencia para *Leptospira spp.* para la prueba Exacta de Fisher. Fuente: Elaboración propia, 2025.

		qPCR		Total
		Positivo	Negativo	
Histopatología	Lesiones presentes	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a + b</i>
	Lesiones ausentes	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>c + d</i>
	Total	<i>a + c</i>	<i>b + d</i>	<i>n</i>

Tabla 2: Tabla de contingencia para *Rhodococcus equi* para prueba Exacta de Fisher. Fuente: Elaboración propia, 2025.

		qPCR		Total
		Positivo	Negativo	
Histopatología	Lesiones presentes	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a + b</i>
	Lesiones ausentes	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>c + d</i>
	Total	<i>a + c</i>	<i>b + d</i>	<i>N</i>

5. RESULTADOS

5.1 Objetivo 1: Identificar histopatológicamente lesiones sugerentes de *Leptospira spp.* mediante tinción de plata y Hematoxilina-Eosina, y para *Rhodococcus equi* mediante tinción Ziehl-Neelsen y Hematoxilina-Eosina, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.

Luego de analizar un total de 44 órganos con tinción de Hematoxilina-Eosina, se identificaron lesiones en 33 de ellos. De estas, 14 mostraron hallazgos sugerentes de *Leptospira spp.* y 19 fueron compatibles con *Rhodococcus equi*.

De los 12 tejidos de riñón observados con tinción H-E, 10 presentaron lesiones sugerentes a *Leptospira spp.*, incluyendo congestión, hemorragia, esclerosis arterial, sustancia hialina intratubular, infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario peritubular, intersticial. Solo una de estas muestras renales presentó lesiones atribuibles a *Rhodococcus equi*, caracterizadas por congestión, tumefacción turbia, infiltrado linfoplasmocitario y émbolos bacterianos cocoides en glomérulos.

De las 14 muestras hepáticas analizadas con H-E, 4 presentaron lesiones compatibles con *Leptospira spp.*, tales como congestión sinusoidal, congestión centrolobulillar, hemorragia, tumefacción turbia, degeneración grasa, degeneración hidrópica, hiperplasia de conductos biliares. Otras 4 presentaron lesiones sugerentes de *Rhodococcus equi*, como pérdida de continuidad de sinusoides, tumefacción turbia, degeneración grasa, infiltrado linfoplasmocitario y émbolos bacterianos intravasculares, necrosis, piogranuloma con neutrófilos y macrófagos con bacterias cocoides en su interior, hiperemia, e hiperplasia de conductos biliares.

En pulmón, 10 de las 12 muestras presentaron lesiones compatibles con *Rhodococcus equi*. Entre los hallazgos más frecuentes se identificaron congestión, hiperemia, hemorragia, material hemático en el lumen bronquial, edema, esclerosis peribronquial, émbolos bacterianos intravasculares, acúmulos de cocos intraalveolares, intravasculares

e intersticiales, acúmulos hialinos en alveolos, enfisema con clavas enfisematosas, hiperplasia del epitelio bronquial, engrosamiento de tabiques alveolares y un marcado infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario, macrofágico y neutrofílico.

Respecto al intestino, 4 de las 6 muestras evaluadas presentaron lesiones asociadas a *Rhodococcus equi*, como enteritis linfoplasmocitaria, fusión y atrofia de vellosidades, congestión de la lámina propia, hemorragia, necrosis en ápex de vellosidades, desprendimiento de enterocitos, proliferación de células caliciformes y degeneración mucosa.

En relación con los resultados obtenidos mediante tinciones especiales, se evaluaron 14 muestras que presentaban lesiones histopatológicas sugerentes de *Leptospira spp.* mediante la técnica de Steiner-Stain. No obstante, solo en una de estas muestras fue posible identificar morfológicamente la bacteria, observándose estructuras compatibles con espiroquetas en diversos campos microscópicos, específicamente al interior de túbulos contorneados proximales.

En el caso de *Rhodococcus equi*, 19 muestras con lesiones compatibles fueron teñidas con Ziehl-Neelsen. De estas, se logró visualizar la bacteria en tres muestras, observándose como cocos intracelulares localizados en macrófagos pulmonares y en las lesiones piogranulomatosas hepáticas.

En la **Figura 1** se muestran imágenes de algunos de los hallazgos observados con tinción de H-E.

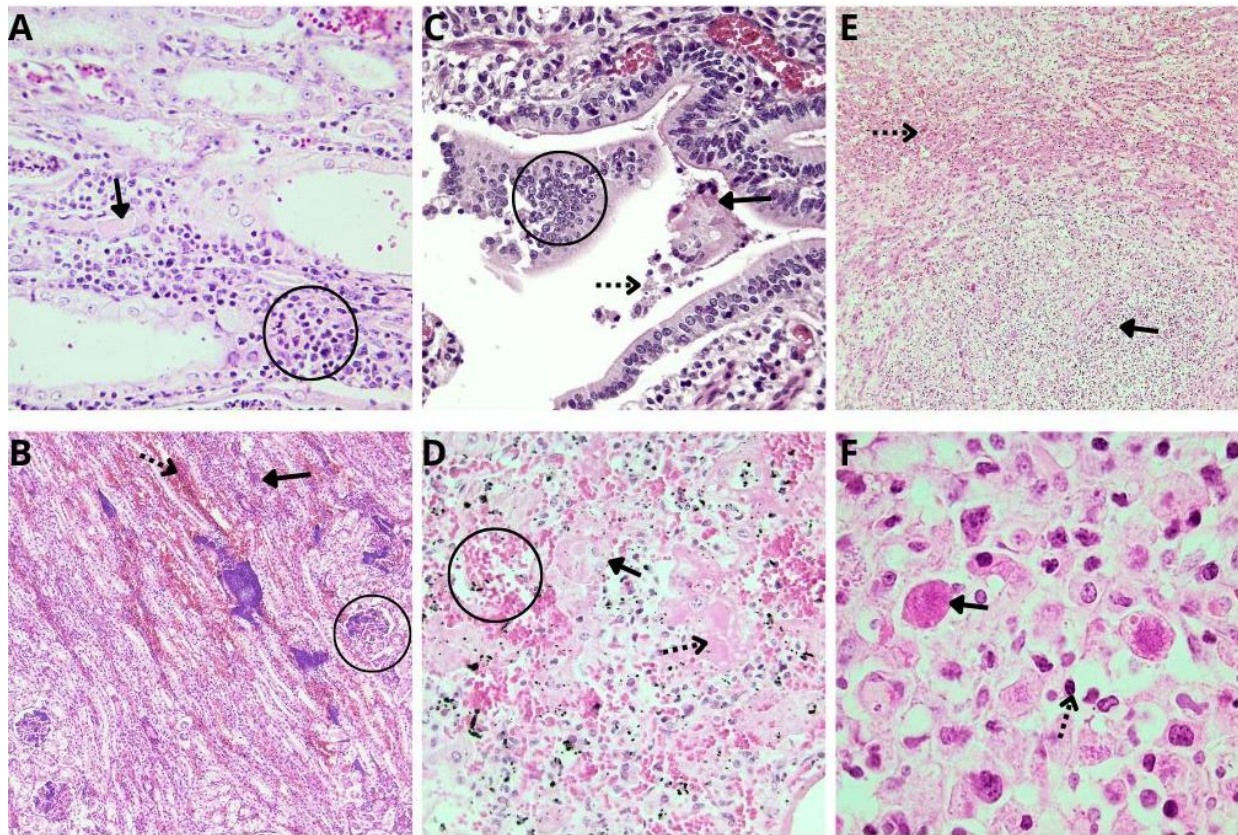


Figura 1: Hallazgos histopatológicos sugerentes a *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi* en órganos de caballo. Fuente: Elaboración propia, 2025.

(A) Riñón con infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario (círculo) y acúmulos hialinos intratubulares (flecha). H-E. 40X. **(B) Riñón** con émbolos bacterianos en glomérulo (círculo), congestión (flecha segmentada), infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario (flecha). H-E. 10X. **(C) Intestino** con necrosis de vellosidades (flecha), infiltrado inflamatorio (círculo) y desprendimiento de enterocitos (flecha segmentada). H-E. 40X. **(D) Pulmón** con edema alveolar (flecha segmentada), hemorragia (círculo) e infiltrado inflamatorio macrofágico (flecha). H-E. 40X. **(E) Hígado** con piogranuloma (flecha) y pérdida de la continuidad de sinusoides (flecha segmentada). H-E. 10X. **(F) Hígado** con piogranuloma, neutrófilos (flecha segmentada) y macrófagos con bacterias cocoides en su interior (flecha). H-E. 100X.

En la **Figura 2** se graficaron las frecuencias absolutas de la cantidad de órganos con presencia de lesiones asociadas a los agentes y las que no presentaron hallazgos compatibles mediante la tinción de H-E.

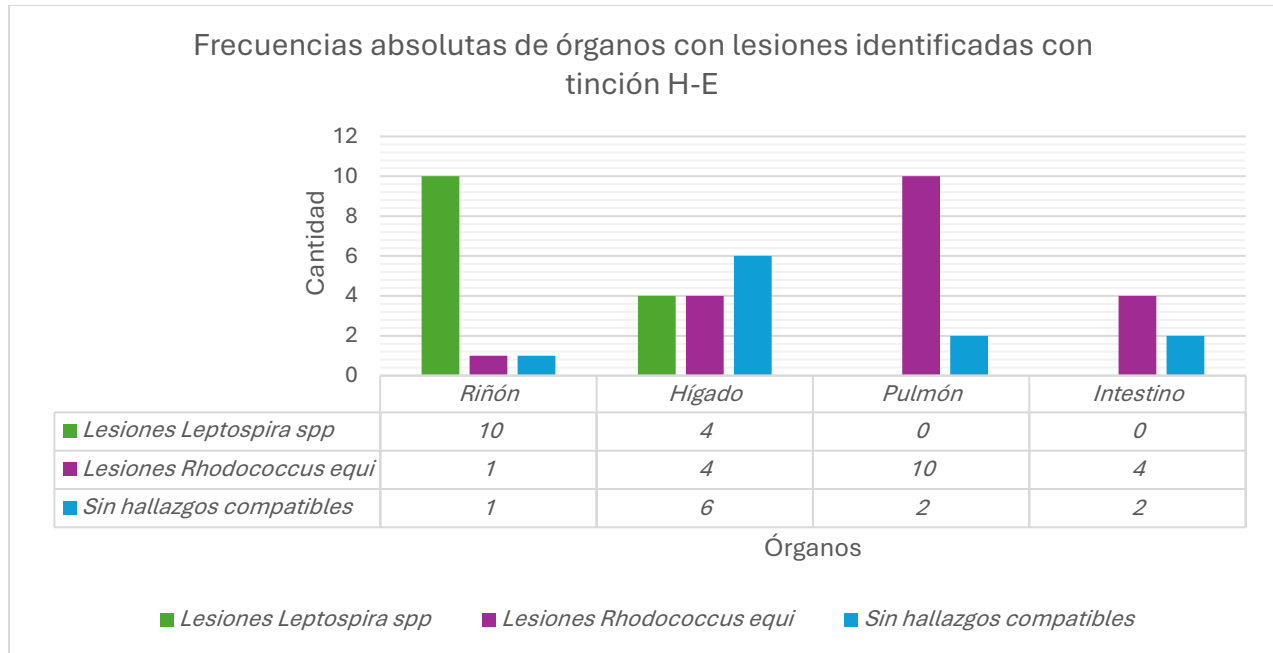


Figura 2: Frecuencias absolutas de lesiones identificadas mediante tinción H-E.
Fuente: Elaboración propia, 2025.

Según los datos obtenidos, el 75% (33) del total de las muestras presentaron lesiones, de los cuales 31,8% (14) se asociaron a *Leptospira spp.* y el 43,2% (19) se asoció a *Rhodococcus equi*. Los hallazgos asociados a la espiroqueta se presentaron principalmente en riñón con un 22,7% (10), mientras que, de *Rhodococcus equi*, un 22,7% (10) se observaron mayoritariamente en pulmón. Cabe destacar que en hígado se observó mismo porcentaje de lesiones asociadas a cada agente, 9,1% (4) a *Leptospira spp.* y 9,1% (4) a *Rhodococcus equi*.

En la **Figura 3** muestra imágenes histopatológicas con tinciones especiales en donde se logró identificar a las bacterias *Leptospira spp.* con tinción Steiner-Stain y a *Rhodococcus equi* con tinción Ziehl-Neelsen.

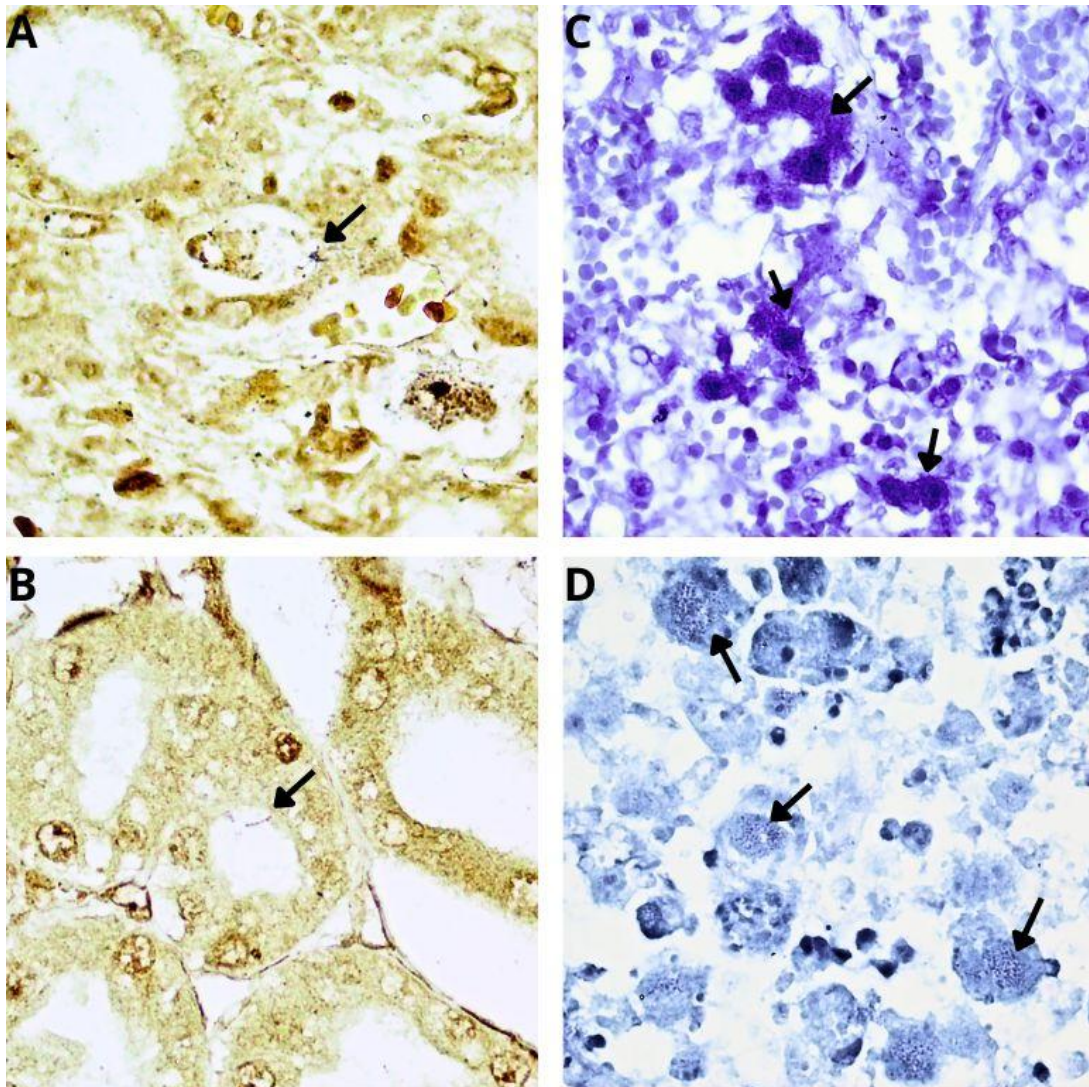


Figura 3: Identificación de *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi* mediante tinción S-S y Z-N respectivamente. Fuente: Elaboración propia, 2025.

(A) Riñón. Acúmulo de bacterias *Leptospira spp.* adheridas a microvellosidades junto con acúmulo hialino en lumen de túbulo contorneado proximal (flecha). S-S. 100X. **(B) Riñón.** *Leptospira spp.* adherida a microvellosidades de túbulo contorneado proximal (flecha). S-S. 100X. **(C) Pulmón.** *Rhodococcus equi* al interior de macrófagos (flechas). Z-N. 100X. **(D) Pulmón.** *Rhodococcus equi* al interior de macrófagos (flechas). Z-N. 100X.

En la **Figura 4** se graficó la frecuencia absoluta de muestras positivas a la identificación de los agentes mediante las tinciones especiales.

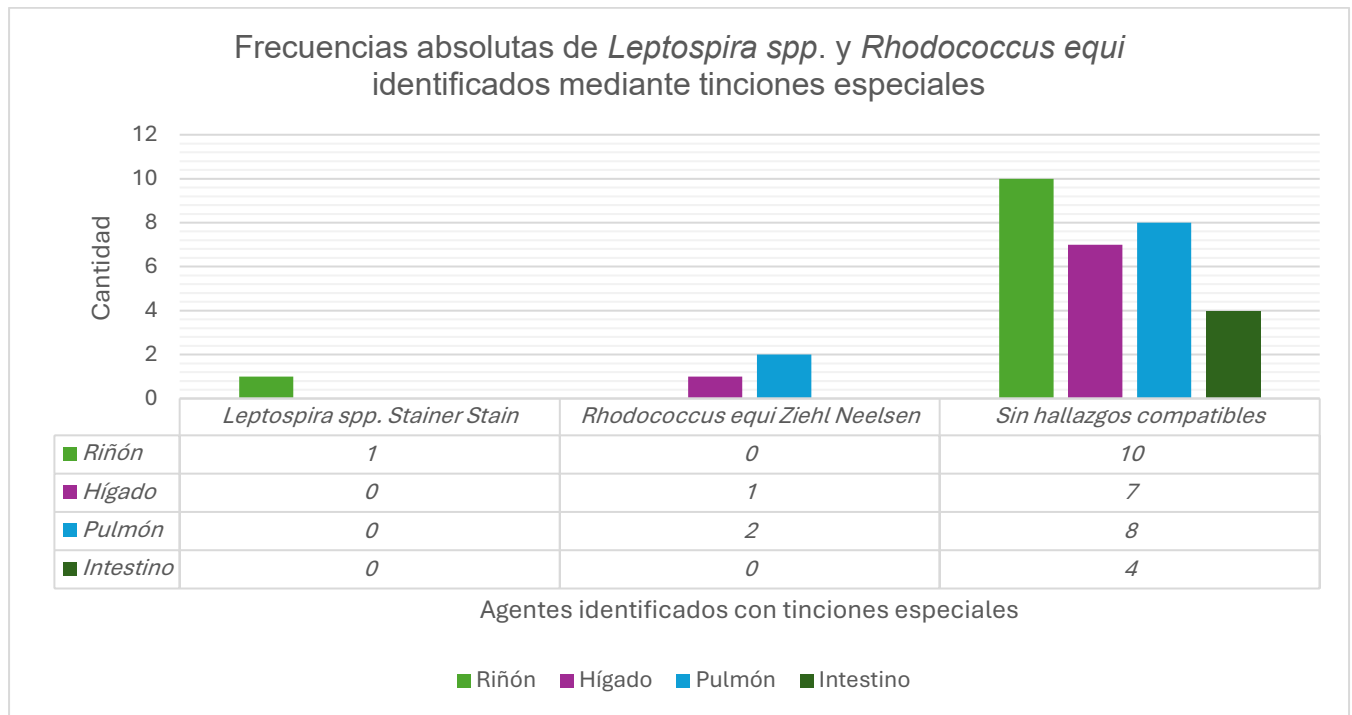


Figura 4: Frecuencias absolutas de *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi* identificados mediante tinciones especiales. Elaboración propia, 2025.

De las 33 (100%) muestras a las que se les aplicó tinciones especiales, en un 3% (1) se evidenció *Leptospira spp.*, correspondiente a una muestra de riñón. En un 9,1% (3) de las muestras se observó *Rhodococcus equi*, donde el 6,1% (2) correspondían a pulmón y el 3% (1) a hígado. En el 87,9% (29) no se identificaron hallazgos compatibles con los agentes descritos.

5.2 Objetivo 2: Caracterizar histopatológicamente lesiones sugerentes de *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi* mediante un histoscore, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.

A la observación de los tejidos teñidos con Hematoxilina-Eosina se encontraron trastornos circulatorios, necróticos, degenerativos e inflamatorios que sugieren lesiones causadas por los agentes bacterianos *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi*, los cuales fueron calificados con un histoscore, dependiendo de la distribución que presentó este en el tejido: 0 = ausente, 1 = focal, 2 = multifocal, 3 = difuso.

En la **Figura 5** se graficaron las frecuencias absolutas de órganos que presentaron hallazgos asociados a trastornos inflamatorios. Además, se indica el p valor obtenido mediante la prueba exacta de Fisher, con el fin de establecer si existe asociación entre el trastorno y el órgano observado (Anexo 12).

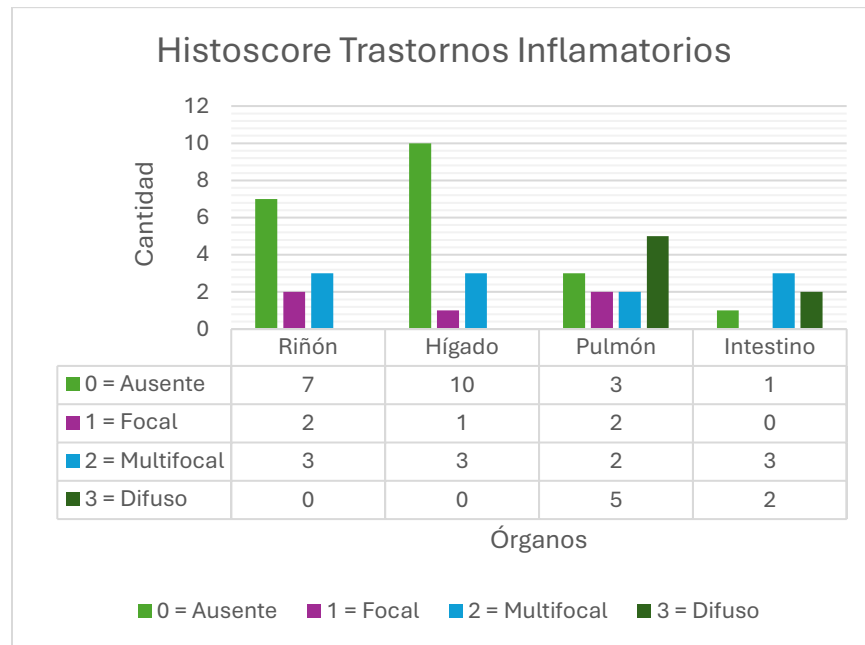


Figura 5: Gráfico de frecuencias absolutas de órganos con trastornos inflamatorios. Elaboración propia, 2025.

Un 11,4% (5) de las lesiones inflamatorias tuvieron distribución focal, donde un 4,5% (2) se identificaron en riñón, 2,3% (1) en hígado y 4,5% (2) en pulmón. Un 25% (11) fueron multifocales, donde riñón, hígado e intestino presentaron mismo porcentaje de 6,8% (3), y pulmón de 4,5% (2). El 15,9% (7) tuvo distribución difusa, donde un 11,4% (5) se presentó en pulmón y 4,5% (2) en intestino. El 47,7% (21) no presentó trastornos inflamatorios.

El p valor fue de 0,0204; lo que indica que existe una asociación significativa entre los órganos y la severidad de las lesiones. Los puntajes ponderados de histoscore fueron de: riñón 8, hígado 8, pulmón 21 e intestino 12. Esto indica que el órgano más afectado por inflamación fue el pulmón.

En la **Figura 6** se graficaron las frecuencias absolutas de órganos que presentaron hallazgos asociados a trastornos circulatorios. Además, se indica el p valor obtenido mediante la prueba exacta de Fisher, con el fin de establecer si existe asociación entre el trastorno y el órgano observado (Anexo 12).

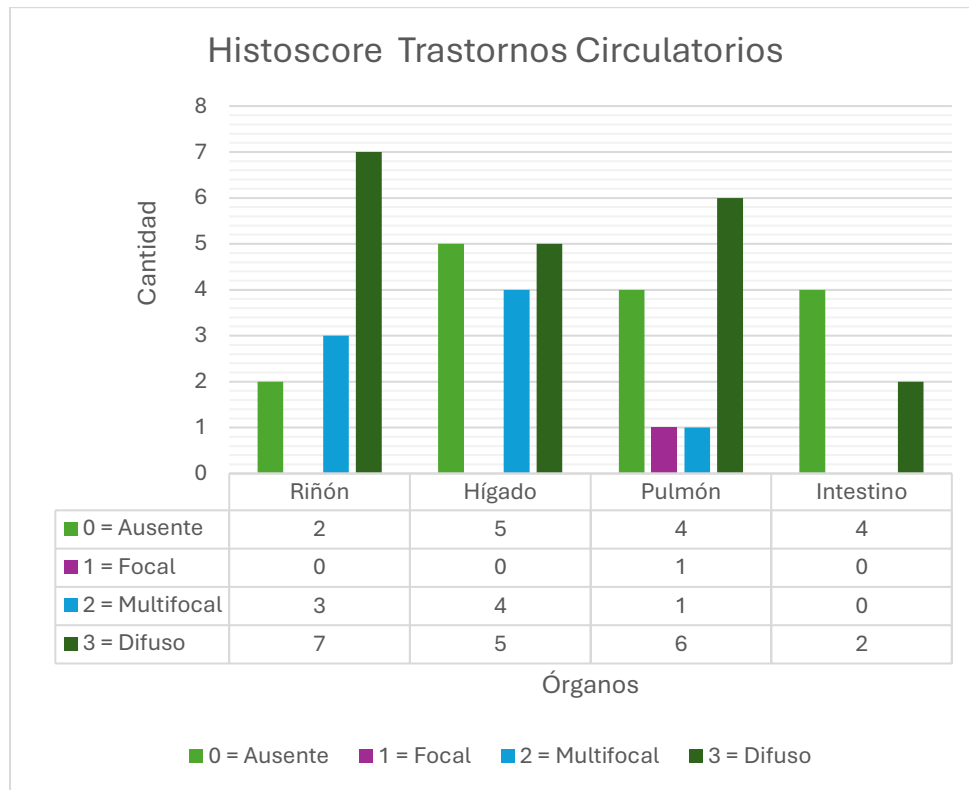


Figura 6: Gráfico de frecuencias absolutas de órganos con trastornos circulatorios. Elaboración propia, 2025.

Un 2,3% (1) de los trastornos circulatorios tuvo distribución focal, el cual solo se observó en pulmón. Un 18,2% (8) fue multifocal, donde 6,8% (3) fue en riñón, 9,1% (4) en hígado y 2,3% (1) en pulmón. Con distribución difusa hubo un 45,5% (20), donde 15,9% (7) se observó en riñón, 11,4% (5) en hígado, 13,6% (6) en pulmón y 4,5% (2) se observó en intestino. Un 34,1% (15) no presentó trastornos circulatorios.

El p valor fue de 0,4461; lo que significa que no existe una asociación significativa entre el órgano afectado y las lesiones de origen circulatorio.

En la **Figura 7** se graficaron las frecuencias absolutas de órganos que presentaron hallazgos asociados a trastornos necróticos. Además, se indica el p valor obtenido mediante la prueba exacta de Fisher, con el fin de establecer si existe asociación entre el trastorno y el órgano observado (Anexo 12).

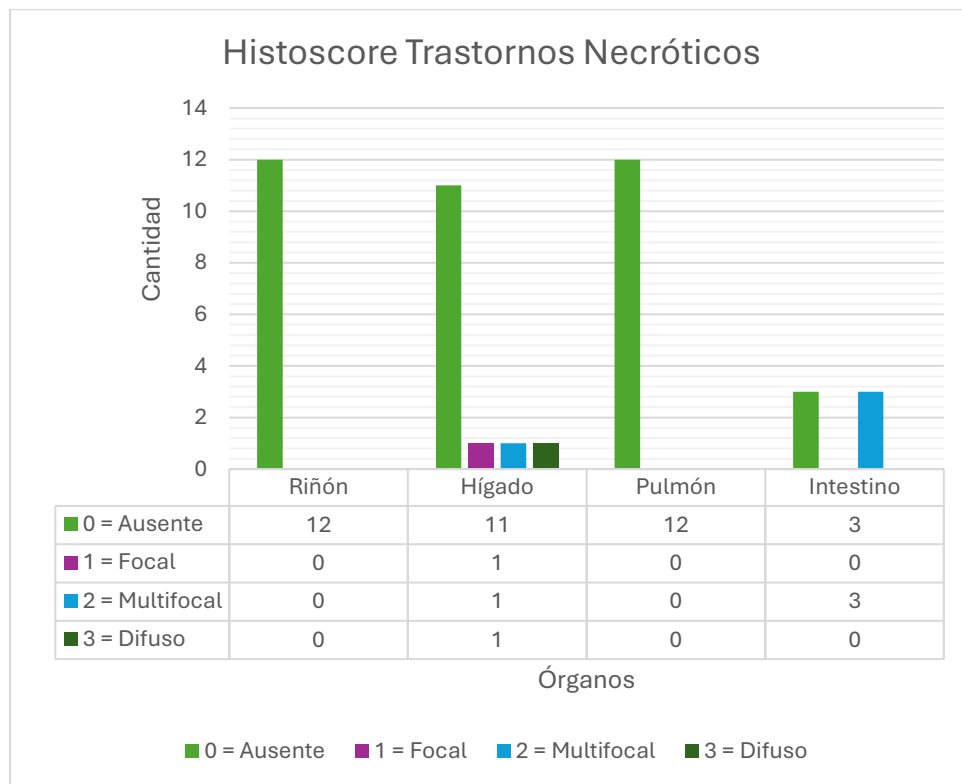


Figura 7: Gráfico de frecuencias absolutas de órganos con trastornos necróticos. Elaboración propia, 2025.

Un 13,6% (6) presentó trastornos necróticos. Riñón y pulmón no presentaron lesiones necróticas. El órgano más afectado fue el hígado con 2,3% (1) de lesiones focales, 2,3% (1) de lesiones multifocales y 2,3% (1) difusas. Intestino tuvo 6,8% (3) de lesiones multifocales. El 86,4% (38) no presentó necrosis.

El p valor fue de 0,01; lo que indica que existe una asociación significativa entre los órganos y la severidad de las lesiones. Los puntajes ponderados fueron de: riñón 0, hígado 6, pulmón 0 e intestino 6. Estos valores indican que los órganos más afectados por necrosis fueron hígado e intestino.

En la **Figura 8** se graficaron las frecuencias absolutas de órganos que presentaron hallazgos asociados a trastornos degenerativos. Además, se indica el p valor obtenido mediante la prueba exacta de Fisher, con el fin de establecer si existe asociación entre el trastorno y el órgano observado (Anexo 12).

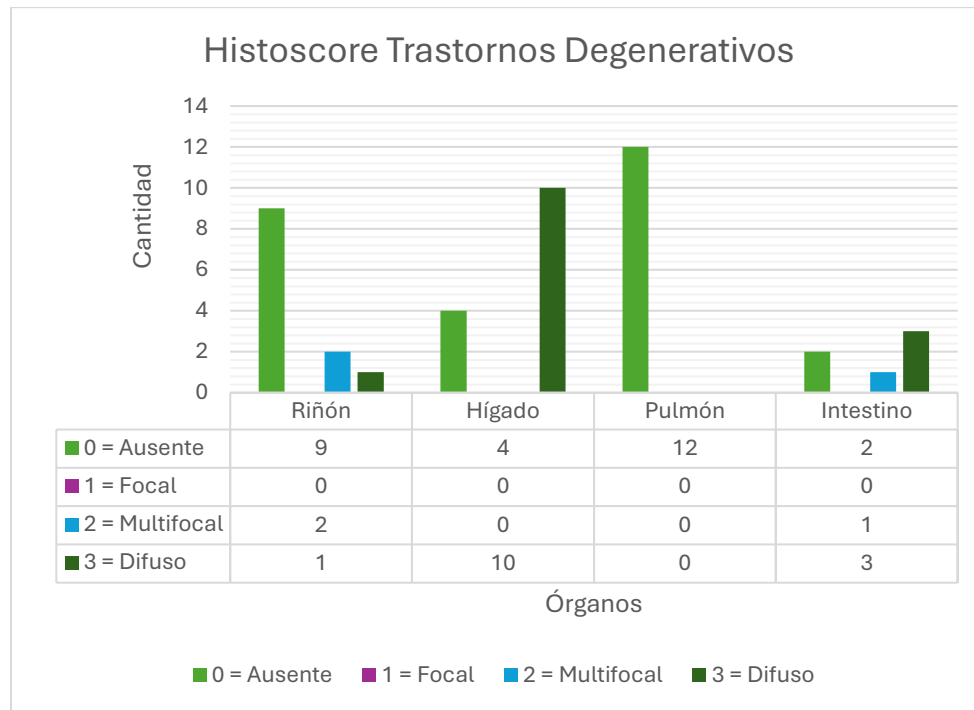


Figura 8: Gráfico de frecuencias absolutas de órganos con trastornos degenerativos. Elaboración propia, 2025.

Un 38,6% (17) presentaron trastornos degenerativos. Ninguno tuvo distribución focal. Riñón tuvo un 4,5% (2) con distribución multifocal e intestino tuvo un 2,3% (1). El 31,8% (14) tuvieron distribución difusa, donde 2,3% (1) se observó en riñón, 22,7% (10) en hígado y 6,8% (3) en intestino. Un 61,4% (27) no presentaron lesiones asociadas a trastornos degenerativos.

El p valor fue de 0,0001; por lo que existe una asociación significativa entre los órganos y la severidad de las lesiones degenerativas. Los puntajes ponderados fueron de: riñón 7, hígado 30, pulmón 0 e intestino 11. Estos valores indican que el órgano más afectado por trastornos degenerativos fue el hígado.

5.3 Objetivo 3: Detectar mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, la presencia de *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi*, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.

De las 44 muestras sometidas a qPCR, ninguna presentó amplificación esperada para detectar el gen LipL32. Esto quiere decir que no se detectó *Leptospira spp.* en los tejidos evaluados. Por otro lado, de las 44 muestras totales, 4 amplificaron el gen VapA, siendo consideradas positivas a *Rhodococcus equi*.

En la **Figura 9** se muestra en forma de gráfico la distribución de muestras que fueron positivas y negativas para ambos agentes según los resultados obtenidos mediante qPCR.

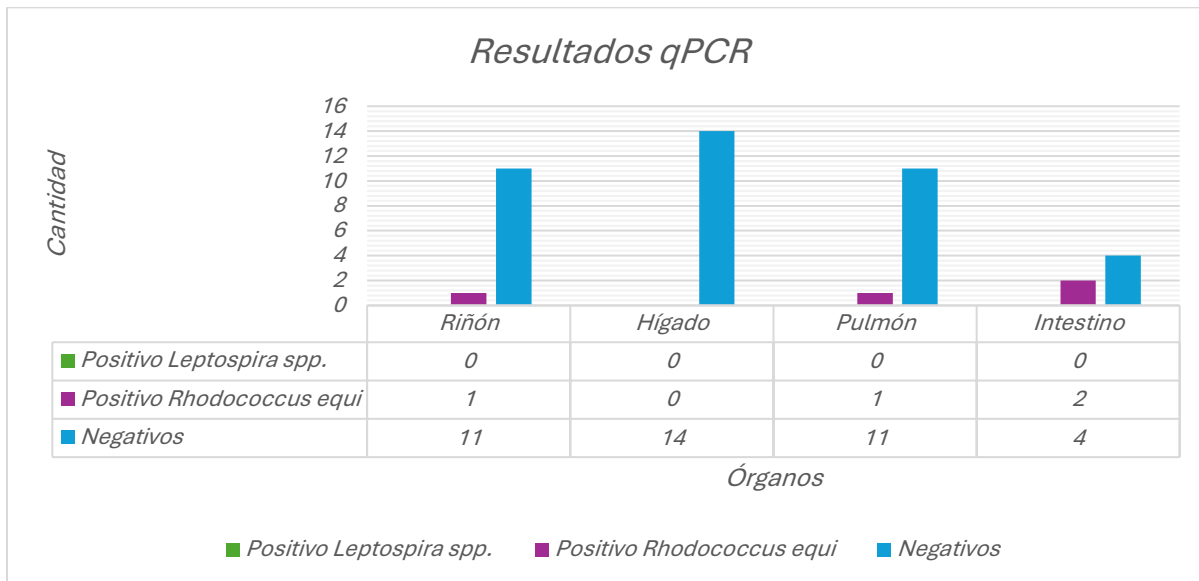


Figura 9: Frecuencias absolutas de órganos positivos y negativos a *Leptospira spp.* y a *Rhodococcus equi* mediante técnica qPCR.

Los resultados indicaron que un 0% fue positivo a *Leptospira spp.* Por otro lado, un 9,1% (4) de las muestras fueron positivas a la detección de *Rhodococcus equi*. Cabe destacar que, un 90,9% (40) fue negativa a ambos agentes.

5.4 Objetivo 4: Asociar la presencia o ausencia de lesiones sugerentes a *Leptospira spp* y a *Rhodococcus equi* identificadas histopatológicamente, con la positividad o negatividad a la técnica qPCR, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.

Se aplicó la prueba exacta de Fisher para evaluar si es que están asociadas la presencia o ausencia de lesiones sugerentes de *Leptospira spp.* y la detección del agente mediante qPCR. El análisis arrojó un valor de $p > 0,9999$ (Anexo 13), lo que significa que no existe una asociación estadísticamente significativa entre las lesiones observadas en los tejidos y el resultado del qPCR. Todas las muestras fueron negativas a la técnica molecular, a pesar de haber 14 órganos con lesiones sugerentes a *Leptospira spp.* Esto indica que, es este estudio, la presencia de lesiones compatibles no estuvo acompañada de la detección del material genético del agente. La **Tabla 3** presenta la tabla de contingencia de este análisis.

Tabla 3: Tabla de contingencia para *Leptospira spp.* para prueba Exacta de Fisher, con H-E y qPCR. Fuente: Elaboración propia, 2025.

		qPCR		Total
		Positivo	Negativo	
Histopatología	Lesiones presentes	0	14	14
	Lesiones ausentes	0	30	30
	Total	0	44	44

Según los resultados, un 31,8% (14) del total de órganos presentó lesiones sugerentes a *Leptospira spp.* a la histopatología, pero dio negativo a la prueba de qPCR. Por otro lado, un 68,2% (30) no presentó lesiones sugerentes, y dio negativo a qPCR. Ninguna muestra resultó positiva al qPCR.

Tampoco se evidenció una asociación significativa entre la presencia de lesiones histopatológicas compatibles con *Rhodococcus equi* y los resultados del qPCR. De los 18 órganos con lesiones sugerentes, solo 3 resultaron positivos a la técnica molecular; además, 1 órgano sin lesiones aparentes a la histopatología también presentó positividad al qPCR. Se realizó la misma Prueba Exacta de Fisher para *Rhodococcus equi*, obteniéndose un valor de $p = 0,289$ (Anexo 14) indicando que, en este estudio, no hubo asociación entre ambas pruebas diagnósticas. La **Tabla 4** muestra la tabla de contingencia utilizada para esta prueba.

Tabla 4: Tabla de contingencia para *Rhodococcus equi* para prueba Exacta de Fisher, con H-E y qPCR. Fuente: Elaboración propia, 2025.

		qPCR		Total
		Positivo	Negativo	
Histopatología	Lesiones presentes	3	15	18
	Lesiones ausentes	1	25	26
	Total	4	40	44

Según los resultados, un 6,8% (3) del total de órganos presentó lesiones sugerentes a *Rhodococcus equi* a la histopatología y dio positivo a la prueba de qPCR. Un 34,1% (15) presentó lesiones, pero dio negativo al qPCR. Por otro lado, un 2,3% (1) no presentó lesiones sugerentes, y dio positivo a qPCR. Un 56,8% (25) no tenía lesiones sugerentes y dio negativo a qPCR.

Por otra parte, se realizó la Prueba exacta de Fisher para determinar asociación entre positividad o negatividad a la tinción Steiner-Stein y el qPCR. El p valor obtenido fue >0,9999 (Anexo 15), por lo que tampoco existe una asociación entre la identificación de *Leptospira spp.* mediante la tinción especial con el resultado de la técnica molecular. En la **Tabla 5** se muestra la tabla de contingencia de esta prueba.

Tabla 5: Tabla de contingencia para *Leptospira spp.* para prueba Exacta de Fisher, con S-S y qPCR. Fuente: Elaboración propia, 2025.

		qPCR		Total
		Positivo	Negativo	
Steiner-Stain	Positivo	0	1	1
	Negativo	0	13	13
	Total	0	14	14

Los resultados indican que un 7,1% (1) del total de muestras teñidas con S-S fueron positivas a la tinción, pero fueron negativas al qPCR. Asimismo, un 92,9% (13) fueron negativas a ambas pruebas diagnósticas.

De igual forma se aplicó la Prueba Exacta de Fisher para las muestras con tinción Ziehl-Neelsen asociadas a *Rhodococcus equi* y el qPCR, obteniéndose un p valor = 0,0351 (Anexo 16), indicando que si existe una relación estadísticamente significativa. Cuando se observó la bacteria intracelularmente con Z-N, existió mayor probabilidad de detectar también su material genético por qPCR, reforzando el valor complementario de ambas técnicas. La **Tabla 6** muestra la tabla de contingencia utilizada para esta prueba.

Tabla 6: Tabla de contingencia para *Rhodococcus equi* para prueba Exacta de Fisher, con Z-N y qPCR. Fuente: Elaboración propia, 2025.

		qPCR		Total
		Positivo	Negativo	
Ziehl-Neelsen	Positivo	2	0	2
	Negativo	2	15	17
	Total	4	15	19

El 10,5% (2) de las muestras fueron positivas tanto a la tinción con Z-N y al qPCR. Por otro lado, otro 10,5% (2) solo fue positiva al qPCR. De las 19 muestras, el 78,9% (15) fueron negativas a ambos análisis.

6. DISCUSIÓN

6.1 Objetivo 1: Identificar histopatológicamente lesiones sugerentes de *Leptospira spp.* mediante tinción de plata y Hematoxilina-Eosina, y para *Rhodococcus equi* mediante tinción Ziehl-Neelsen y Hematoxilina-Eosina, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.

Los hallazgos histopatológicos con tinción H-E para *Leptospira spp.* evidenciaron una alta frecuencia de lesiones renales, tales como glomerulonefritis, infiltrado linfoplasmocitario y hemorragias, lo cual coincide con lo descrito por Agudelo et al. (2013) y Naseema et al. (2017), quienes observaron lesiones renales por *Leptospira spp.* en ratas y caballos, respectivamente. De igual forma, Yan et al. (2010) reportaron lesiones compatibles en riñón e hígado, lo que coincide con los hallazgos observados en este estudio. En cuanto a los resultados con la tinción S-S especial para espiroquetas en la muestra de riñón positiva, se observaron espiroquetas de color negruzco en los lúmenes de los túbulos contorneados proximales en la corteza renal, adosados a la pared, al igual como lo reportado por Agudelo et al. (2013). Sin embargo, estudios como los de Trimble et al. (2018) y Fagre et al. (2020), pese a detectar seropositividad o leptospiuria en caballos, no reportaron hallazgos histopatológicos compatibles, lo cual podría deberse a una presentación subclínica o de eliminación intermitente del agente sin expresión de lesiones en tejidos. Además, Verma et al. (2013) señalan que *Leptospira spp.* puede presentarse de forma subclínica y transitoria en algunos equinos, lo cual explicaría la discordancia entre lesiones y detección directa del agente.

Respecto a *Rhodococcus equi*, los hallazgos con tinción de H-E permitieron identificar lesiones sugerentes al agente principalmente en pulmón e intestino, donde se observó la presencia de piogranulomas, infiltrado linfoplasmocitario y macrofágico, émbolos bacterianos intravasculares y acúmulos de cocos intracelulares. Estas lesiones coinciden con lo descrito por Muscatello (2012) y Lin et al. (2019), quienes documentaron que la

neumonía piogranulomatosa es la forma más común de presentación de la enfermedad en potrillos, caracterizada por inflamación severa y formación de piogranulomas. Cabe señalar que, si bien se observaron cocos intracelulares en macrófagos mediante la tinción Ziehl-Neelsen, estos no presentaron la coloración rojiza característica de las bacterias ácido-alcohol resistentes. Esto se debe a que *Rhodococcus equi* es considerado una bacteria levemente ácido-alcohol resistente, por lo que puede perder la tinción durante el proceso de decoloración con ácido. Por otro lado, existen estudios que difieren de los hallazgos obtenidos en este estudio. Márquez (2006) y Zúñiga et al. (2023), reportaron una alta frecuencia de *Rhodococcus equi* en potrillos, pero sin observar lesiones intestinales en sus análisis histopatológicos. Estas diferencias podrían explicarse por variaciones en la presentación clínica según la edad del animal o su estado inmunológico.

6.2 Objetivo 2: Caracterizar histopatológicamente lesiones sugerentes de *Leptospira spp.* y de *Rhodococcus equi* mediante un histoscore, en órganos de caballos ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico.

El análisis con histoscore mostró una relación entre los órganos y los tipos de lesiones. El pulmón fue el más afectado por inflamación, concordando con lo descrito por Sellon y Long (2013) y Lohse et al. (2019), quienes reportan inflamación linfoplasmocitaria y piogranulomatosa severa en casos de *Rhodococcus equi*.

En cuanto a los trastornos circulatorios, no hubo una asociación estadísticamente significativa entre los órganos y las lesiones. Esto sugiere que las alteraciones circulatorias podrían estar relacionadas a causas inespecíficas, como procesos sistémicos, y no necesariamente atribuibles a un agente específico. No obstante, resulta destacable que la única muestra con identificación positiva de *Leptospira spp.*, mediante tinción especial S-S, también presentó lesiones inflamatorias y circulatorias en el riñón, lo cual es compatible con la patogenia descrita para este agente, que incluye nefritis intersticial (Adler y De la Peña, 2010; Agudelo et al., 2013).

En lo que respecta a los trastornos necróticos, se observó una asociación significativa entre los órganos y la presencia de necrosis ($p = 0,01$), siendo el hígado e intestino los órganos más afectados. En el caso del hígado, se evidenciaron focos de necrosis centrolobulillar y en zonas portales, mientras que en intestino se observó necrosis de las

vellosidades, hallazgos compatibles con procesos infecciosos como los causados por *Rhodococcus equi* en su forma entérica (Pal et al., 2023; Yamshchikov et al., 2010).

Finalmente, los trastornos degenerativos presentaron una fuerte asociación con el hígado ($p < 0,0001$), donde se observaron con mayor frecuencia lesiones como tumefacción turbia, degeneración hidrópica y degeneración grasa. Este tipo de daño se considera común en procesos crónicos o tóxicos, pero también puede ser secundario a hipoxia o daño inflamatorio persistente, y ha sido descrito en cuadros infecciosos por *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi* (Lehmann et al., 2014; Paredes et al., 2000).

6.3 Objetivo 3: Detectar mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, la presencia de *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi*, en órganos de caballos. Y Objetivo 4: Asociar la presencia o ausencia de lesiones sugerentes a *Leptospira spp.* y a *Rhodococcus equi* identificadas histopatológicamente, con la positividad o negatividad a la técnica qPCR

La bacteria *Leptospira spp.* puede afectar a los caballos de forma clínica o subclínica, dependiendo de factores como, por ejemplo, la carga bacteriana o el estado inmunológico del animal. Se divide en 3 grupos: saprófitas, patógenas intermedias y patógenas (Torres et al., 2016). De este último, es característico la presencia del gen LipL32, por lo que el uso de primers específicos de este pueden discriminar entre la presencia de la forma saprófita y patógena de *Leptospira spp.* (Adler y De La Peña, 2010).

En este estudio, se logró visualizar lesiones sugerentes de *Leptospira spp.*, y se observó la espiroqueta mediante tinción de plata, lo que se contradice con los resultados negativos del qPCR. Sin embargo, autores como Zilch et al. (2020) no lograron observar lesiones en tejidos, y tampoco obtuvieron qPCR positivos en caballos que fueron experimentalmente infectados, lo cual es acorde a lo observado en este estudio, en donde, incluido el control positivo de *Leptospira spp.*, fue negativo a ambas técnicas. Cabe destacar que, la negatividad del control positivo limita la interpretación del qPCR en este estudio, por lo que reduce la sensibilidad en este ensayo. Sin embargo, autores como Divers et al. (2019), de igual forma señalaron una baja concordancia entre tinción de plata y qPCR en caballos. El resultado negativo del qPCR, pese a la existencia de lesiones sugerentes y una muestra positiva con tinción de plata, podría explicarse por la

baja carga bacteriana, la posible degradación del ADN debido al almacenamiento prolongado en formol y parafina, o a limitaciones del partidador utilizado (Wu et al., 2014; Vitošević et al., 2018).

Por otro lado, estudios como los de Naseema et al. (2017) y Moreno et al. (2024) lograron detectar seropositividad de *Leptospira spp.* en equinos, confirmando que han estado expuestos a la bacteria. Además, Azizi et al. (2014) y Agudelo et al. (2013) observaron tanto, lesiones histopatológicas, como la presencia de la espiroqueta mediante tinción de plata en conjunto con qPCR positivo; lo cual difiere de este estudio. Cabe destacar, que en los estudios mencionados se utilizaron muestras frescas o con fijación reciente, lo cual probablemente aumentó la sensibilidad del método.

En cuanto al análisis estadístico, no se encontró asociación significativa entre las lesiones histopatológicas compatibles con *Leptospira spp.* y la positividad al qPCR, ni entre la tinción de plata y la técnica molecular ($p > 0,9999$). Esta falta de asociación ha sido documentada también por Verma et al. (2013) y Fagre et al. (2020), quienes describen que la presencia de anticuerpos o lesiones histológicas no asegura la detección molecular del agente.

Sobre la bacteria *Rhodococcus equi*, se utiliza el gen VapA como marcador específico para detectar la bacteria en tejidos infectados, respaldando el uso de qPCR como técnica sensible para detección del agente en diversos estudios (Byrne et al., 2001; Harrington et al., 2005; Lohse et al., 2019; Silveira et al., 2020). Sin embargo, en este estudio, en algunas muestras se observó la presencia de lesiones sugerentes y de la bacteria dentro de macrófagos en tejido pulmonar con qPCR negativo, y viceversa.

Mediante el análisis estadístico no se evidenció asociación significativa entre la presencia de lesiones histopatológicas observadas con H-E y la positividad al qPCR para *Rhodococcus equi* ($p = 0,289$). Esta falta de asociación se ha descrito por Márquez (2006), quien reportó positividad molecular en tejidos sin lesiones claras, probablemente por infecciones en etapa inicial. Por otro lado, estudios como los de Madarame et al. (1996) y Yamshchikov et al. (2010) sí encontraron correlación directa entre hallazgos histopatológicos y resultados moleculares, lo que sugiere que la etapa de la enfermedad y la carga bacteriana son factores determinantes en esta relación.

Por el contrario, se observó una asociación significativa entre la positividad con la tinción Ziehl-Neelsen y la técnica qPCR ($p = 0,0351$), lo cual respalda el uso conjunto de ambas técnicas como herramientas diagnósticas complementarias. Este hallazgo coincide con lo reportado por Lin et al. (2019), quienes demostraron alta especificidad de la tinción Z-N cuando se identifican cocos intracelulares en macrófagos.

7. CONCLUSIONES

Este estudio tuvo como objetivo principal analizar mediante histopatología y detectar mediante qPCR la presencia de *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi* en los órganos, riñón, hígado, pulmón e intestino, de caballos que ingresaron a la Unidad de Morfología y Diagnóstico de la Universidad San Sebastián, Sede de La Patagonia, entre el año 2011 hasta mayo de 2025. De este se ha podido concluir:

1. El análisis histopatológico de los tejidos de riñón, hígado, pulmón e intestino de caballos, permitió identificar lesiones compatibles con *Leptospira spp.* y *Rhodococcus equi*. En el caso de *Leptospira spp.*, se observó nefritis intersticial mediante tinción H-E, junto con la visualización de espiroquetas en el lumen de túbulos contorneados proximales utilizando tinción de plata (S-S). Por otra parte, las lesiones sugerentes de *Rhodococcus equi* correspondieron a inflamación piogranulomatosa con infiltrado macrofágico, identificándose bacterias cocoides intracelulares mediante tinciones H-E y Ziehl-Neelsen.
2. La caracterización de las lesiones histopatológicas mediante histoscore, evidenció una distribución significativa de trastornos inflamatorios, circulatorios y degenerativos en los distintos órganos evaluados. El pulmón presentó mayor compromiso inflamatorio y el hígado fue el principal órgano afectado por lesiones degenerativas, lo cual permite inferir una posible relación con los agentes estudiados.
3. La técnica de qPCR permitió detectar *Rhodococcus equi* en varias muestras de tejidos de caballos, confirmando su presencia activa. No obstante, *Leptospira spp.* no fue detectada mediante esta técnica, a pesar de la identificación de lesiones compatibles e incluso de la visualización directa del agente en una muestra, lo que podría atribuirse a una baja carga bacteriana o a la degradación del ADN en tejidos fijados.

4. Mediante las técnicas diagnósticas utilizadas fue posible confirmar que de los 18 caballos estudiados, 4 presentaron infección de *Rhodococcus equi* y 1 de *Leptospira spp.*

5. No se observó una asociación significativa entre la presencia de lesiones histopatológicas y los resultados de qPCR para *Leptospira spp.*, lo cual limita su confirmación diagnóstica por esta vía. En contraste, sí se evidenció una asociación estadísticamente significativa entre los hallazgos con tinción Ziehl-Neelsen y la detección molecular de *Rhodococcus equi*, lo que valida el uso complementario de ambas técnicas en el diagnóstico de esta enfermedad.

Estos resultados permiten aceptar la hipótesis de forma parcial, ya que se pudo comprobar la presencia de *Rhodococcus equi* mediante histopatología y qPCR. Sin embargo, *Leptospira spp.* no fue detectada mediante qPCR, a pesar de la presencia de lesiones sugerentes en la histopatología y de espiroquetas mediante tinción S-S.

La identificación de *Leptospira spp.* y de *Rhodococcus equi* en caballos, mediante diferentes técnicas, es relevante, ya que, estos agentes son zoonóticos y suelen causar enfermedades muchas veces subdiagnosticadas en estos animales. Estas bacterias pueden llegar a causar cuadros clínicos importantes para la salud pública, desde la perspectiva zoonótica, sobre todo, en aquellos profesionales y técnicos que trabajan en contacto directo con caballos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adler, B. y De La Peña, A. (2010). *Leptospira and leptospirosis*. Veterinary Microbiology, 140(3-4), 287-296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Agudelo, P., Murillo, V., Londoño, A. y Rodas, J. (2013). *Histopathological kidney alterations in rats naturally infected with Leptospira*. Biomédica, 33(1), 82-88. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.686>
- Arent, Z., Pardyak, L., Dubniewicz, K., Plachno, B. y Kotula-Balak, M. (2022). *Leptospirataxonomy: then and now*. Medycyna Weterynaryjna, 78(10), 489-496. doi.org/10.21521/mw.6694
- Azizi, S., Kheirandish, R. y Rahimi, E. (2014). *Comparison of polymerase chain reaction and Warthin-Starry techniques to detect Leptospira spp. In kidneys of slaughtered cattle*. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 81(1), 1-6. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v81i1.821>
- Azócar-Aedo, L. (2023). *Basic Aspects and Epidemiological Studies on Leptospirosis Carried Out in Animals in Chile: A Bibliographic Review*. Tropical Medicine and Infectious Disease, 8(2), 97. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8020097>
- Bonhomme, D. y Werts, C. (2022). *Host and Species-Specificities of Pattern Recognition Receptors Upon Infection With Leptospira interrogans*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.932137>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. y Wittwer, C. T. (2009). *The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clinical Chemistry, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

- Byrne, B. A., Prescott, J. F., Palmer, G. H., Takai, S., Nicholson, V. M., Alperin, D. C. y Hines, S. A. (2001). *Virulence plasmid of Rhodococcus equi contains inducible gene family encoding secreted proteins*. Infection and Immunity, 69(2), 650–656. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.650-656.2001>
- Campillo, M., Smith, S., Gally, D. y Opriessnig, T. (2021). *Review of methods for detection of Lawsonia intracellularis infection in pigs*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 33(4), 621-631. <https://doi.org/10.1177/10406387211003551>
- Caraguel, C., Stryhn, H., Gagné, N., Dohoo, I., y Hammell, K. (2011). *Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: Analytical and epidemiologic approaches*. Journal of Clinical Microbiology, 49(1), 326–331. <https://doi.org/10.1128/JCM.01362-10>
- Chomel, B (2009). Zoonoses. Encyclopedia of Microbiology, 820-829. [10.1016/B978-012373944-5.00213-3](https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00213-3)
- Clifford, B. y Taylor, R. (2008). *Bioestadística*. (1ª ed.). Pearson Educación.
- Díaz, E., Arroyo, G., Sáenz, C., Mena, L. y Barragán, V. (2023) *Leptospirosis in horses: Sentinels for a neglected zoonosis? A systematic review*. Veterinary World, 16(10), 2110-2119. [www.doi.org/10.14202/vetworld.2023.2110-2119](https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.2110-2119)
- Divers, T., Chang, Y., Irby, N., Smith, J y Carter, C. (2019). *Leptospirosis: An important infectious disease in North American horses*. Equine Veterinary Journal, 51(3), 287-292. DOI: 10.1111/evj.13069
- Dominguez, M., Münstermann, S., de Guindos, I. y Timoney, P. (2016). *Equine disease events resulting from international horse movements: Systematic review and lessons learned*. Equine Veterinary Journal, 48(5), 641-653. [10.1111/evj.12523](https://doi.org/10.1111/evj.12523)
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2022). *The European Union One Health 2021 Zoonoses Report*. European Food Safety Authority, 20(12), 7666. DOI: 10.2903/j.efsa.2022.7666

- Fagre, A., Mayo, C., Pabilonia, K. y Landolt, G. (2020). *Seroprevalence of Leptospira spp. Colorado equids and association with clinical disease*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 32(5), 718-721. <https://doi.org/10.1177/1040638720943155>
- Federación de Criadores de Caballos Raza Chilena. (2022). *MANUAL DE BUENAS PRÁCTICAS CRIANZA DEL CABALLO RAZA CHILENA*. https://veterinaria.uach.cl/wp-content/uploads/2022/06/ManualBP_FedCriadores_PDF.pdf
- Fletcher, G. (2021). *Epidemiología clínica*. (6ª ed.). Wolters Kluwer. https://ldigital-uss-cl.bdigitaluss.remotexs.co/ebooks/52789-Epidemiologia_clinica/2/
- Garcia, I. (2013). *Rhodococcus equi: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS Y CLÍNICOS*. <https://n9.cl/cnwqr>
- Haake, D. (2000). *Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis*. Microbiology, 146(7), 1491-1504. DOI: 10.1099/00221287-146-7-1491
- Harrington, J. R., Golding, M. C., Martens, R. J., Halbert, N. D., y Cohen, N. D. (2005). *Evaluation of a real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and quantitation of virulent Rhodococcus equi*. American Journal of Veterinary Research, 66(5), 755–761. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.755>
- Hartley, E. (1985). *Encyclopedia Of the Horse*. Crescent Books.
- Hernández-Sampieri, R. y Mendoza, C. (2018). *Metodología de la Investigación Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta*. (1ª ed.). McGraw-Hill Education. https://ldigital-uss-cl.bdigitaluss.remotexs.co/ebooks/51695-Metodologia_de_la_investigacion/
- Khan, A., Mushtaq, M., Muhammad, J., Ahmed, B., Khan, E., Khan, A., Zakki, A., Altaf, E., Haq, I., Saleem, A., Warraich, M., Ahmed, N. y Rabaan, A. (2021). *Global epidemiology of Equine Influenza viruses; “A possible emerging zoonotic threat in future” an extensive systematic review with evidence*. Brazilian Journal of Biology, vol. 83. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.246591>

- Krebs, J., Mandel, E., Swerdlow, D. y Rupprecht, C. (2004). *Rabies surveillance in the United States during 2003*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 225(12), 1837–1849. <https://doi.org/10.2460/javma.2004.225.1837>
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). *The real-time polymerase chain reaction*. Molecular Aspects of Medicine, 27(2–3), 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Levett, P. (2001). *Leptospirosis*. Clinical Microbiology Reviews, 14(2), 296-326. DOI: 10.1128/CMR.14.2.296–326.2001
- Levings, R. (2012). *Emerging and Exotic Zoonotic Disease Preparedness and Response in the United States – Coordination of the Animal Health Component*. Zoonoses and Public Health, 59(2), 80-94. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01495.x>
- Lin, W., Kruse, R., Yang, K. y Musher, D. (2019). *Diagnosis and management of pulmonary infection due to Rhodococcus equi*. Clinical Microbiology and Infection, 25(3), 310-315. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.033>
- Lohse, J., Paredes, E., Vargas, D. y Takai, S. (2019). *Rhodococcus equi virulento aislado de potrillos Fina Sangre de Carrera en Chile*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 30(3), 1314- 1323. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i3.15361>
- Madarambe, H., Takai, S., Morisawa, N., Fujii, M., Hidaka, D., Tsubaki, S. y Hasegawa, Y. (1996). *BRIEF COMMUNICATIONS and CASE REPORTS Immunohistochemical Detection of Virulence-associated Antigens of Rhodococcus equi in Pulmonary Lesions of Foals*. Veterinary Pathology, 33(3), 341-342. [10.1177/030098589603300312](https://doi.org/10.1177/030098589603300312)
- Majak, A., Vasiljevic, T., Yeager, T. y Donkor, O. (2018). *Salmonella infection – prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review*. Microbiology, 164(11), 1327-1344. DOI: 10.1099/mic.0.000709

- Márquez, K. (2006). *Estudio de la incidencia de Rhodococosis equine y su relación con variantes genéticas virulentas del agente etiológico en potrillos FSC en haras de la zona central de Chile*. Tesis de Médico Veterinario. Santiago: Univ. Mayor. 60 p.
- Martínez, M., Sánchez-Villegas, A., Toledo, E. y Faulin, J. (2014). *Bioestadística amigable* (3a ed.). Elsevier. https://ldigital-uss-cl.bdigitaluss.remotexs.co/ebooks/46919-Bioestadistica_amigable/
- Milton, S. (2007). *Estadística para Biología y Ciencias de la Salud* (3a ed.). McGraw Hill. <https://cssdelasalud.wordpress.com/wp-content/uploads/2018/09/est-5-estadistica-para-biologia-y-ciencias-de-la-salud-3a-ed.pdf>
- Miranda, D. (2003). *Identificación genómica de Rhodococcus equi a partir de muestras biológicas procedentes de equinos FSC de la zona central de Chile*. Tesis de Médico Veterinario. Santiago: Univ. Mayor. 68 p.
- Moncho, J. (2015). *ESTADÍSTICA APLICADA A LAS CIENCIAS DE LA SALUD*. Elsevier España.
- Moreno, T., Ramírez, R. y Azócar-Aedo, L. (2024). *SEROPREVALENCIA DE Leptospira PATÓGENA, SEROGRUPOS INFECTANTES Y TÍTULOS DE ANTICUERPOS DETECTADOS EN EQUINOS DE LA REGIÓN DE LOS LAGOS, SUR DE CHILE*. Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences, 40(2), 341-352. <https://doi.org/10.29393/CHJAAS40-29SCTA30029>
- Muena, J. y Vera, F. (2021). *MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE HISTOPATOLOGÍA VETERINARIA*. Universidad San Sebastián, Facultad de Medicina Veterinaria.
- Muscatello, G. (2012). *Rhodococcus equi pneumonia in the foal – Part 1: Pathogenesis and epidemiology*. The Veterinary Journal, 192(1), 20-26. www.doi.org/10.14202/vetworld.2023.2110-2119
- Nachon, H. y Bosisio, C. (2005). *Enfermedades Infecciosas de los Equinos*. Universidad de Buenos Aires. <https://usam.siabcloud.com/backendsiab/viewer/viewer.php?idobra=11390&urlindex=0>

- Naseema, U., Vairamuthu, S., Balachandran, C. y Ravikumar, G. (2017). *Seroprevalence, diagnosis and histopathological studies on leptospirosis in horses*. Indian Journal of Veterinary Pathology, 41(4), 308-313. DOI: 10.5958/0973- 970X.2017.00074.8
- Pal, M., Gutama, K., Dingh, S. y Bottom, S. (2023). *Rhodococcus equi: An emerging bacterial pathogen of public health significance*. Journal of Advances in Microbiology Research, 4(1), 32-35. <https://www.microbiojournal.com/archives/2023.v4.i1.A.63>
- Paredes, E., Gallego, R., Canal, A., Araya, O., Chahuán, E., Thomas, P. y Zamora, J. (2000). *Primer caso descrito en Chile de neumonía y colitis por Rhodococcus equi en un potrillo*. Archivos de Medicina Veterinaria, 32(1). <http://dx.doi.org/10.4067/S0301- 732X2000000100013>
- Paredes, E., Moroni, M. y Navarrete, MJ. (2018). *Manual de Necropsia en Animales Domésticos*. Instituto de Patología Animal. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. <https://www.studocu.com/cl/document/universidad-austral-de-chile/patologia-general/manual-necropsia-2018/55492540>
- Popoff, M. (2020). *Tetanus in animals*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 32(2), 184-191. DOI: 10.1177/1040638720906814
- Poveda, J. (2023). *MANUAL DE LABORATORIO DE TÉCNICA HISTOLÓGICA*. Universidad San Sebastián, Facultad de Ciencias de la Salud.
- Rahman T., Sobur, A., Islam, S., Ivey, S., Hossain, J., Zowalaty, M., Rahman, T y Ashour, H. (2020). *Zoonotic Diseases: Etiology, Impact and Control*. Microorganisms, 8(9), 1405. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>
- Rakowska, A., Cywinska, A. y Witkowski, L. (2020). *Current Trends in Understanding and Managing Equine Rhodococcosis*. Animals, 10(10), 1910. DOI: 10.3390/ani10101910
- Ramos-Vara, (2011). *Principles and methods of immunohistochemistry*. Methods in Molecular Biology, 691, 83–96. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2_5

- Sack A, Oladunni, F., Gonchigoo, B., Chambers, T. y Gray, G. (2020). *Zoonotic Diseases from Horses: A Systematic Review*. Vector Borne Zoonotic Diseases, 20(7), 484-495. DOI: 10.1089/vbz.2019.2541
- Sellon, D. y Long, M. (2013) *Equine Infectious Diseases* (2a ed.). Elsevier.
- Servicio Agrícola y Ganadero. (2019). *LISTA DE ENFERMEDADES DE DENUNCIA OBLIGATORIA (EDO) AL SAG*.
https://sag.gob.cl/sites/default/files/enfermedades_denuncia_obligatoria_sag_9-10-2019.pdf
- Servicio Agrícola Ganadero. (2022). *INFORME SANITARIO ANIMAL 2022*.
<https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/Informe%20Sanitario%20Chile%202022%20ver%20final%2015%2011%2023%20mvp.pdf>
- Silveira, B., Gressler, L., Cargnelutti, J., Bordin, A. y Vargas, A. (2020). *GAPDH, rhhC, and vapA gene expression in Rhodococcus equi cultured under different iron concentrations*. Microbial Pathogenesis, 139, 622-631. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103885>
- Sing, A. (2015). *Zoonoses – Infections Affecting Humans and Animals*. Springer. DOI: 10.1007/978-94-017-9457-2
- Skowron, K., Grudlewska-Buda, K. y Khamesipour, F. (2023). *Zoonoses and emerging pathogens*. BMC Microbiology, 23, 232.
<https://doi.org/10.1186/s12866-023-02984-w>
- Snedeker, K., Anderson, M., Sargeant, J. y Weese, J. (2013) *A Survey of Canadian Public Health Personnel Regarding Knowledge, Practice and Education of Zoonotic Diseases*. Zoonoses and Public Health, 60 (7), 519-525. DOI: 10.1111/zph.12029
- Stimson, A. (1907). *Note on an Organism Found in Yellow-Fever Tissue*. Public Health Reports, 22(18), 541. <https://doi.org/10.2307/4559008>
- Straffus, A. (1988). *NECROPSY Procedures and Basic Diagnostic Methods For Practicing Veterinarians*. Charles C Thomas Publisher.

- Tyrosh-Levy S, Shaiman, L., Novak, S., Eyngor, M., Schvartz, G., Yakobson, B y Steinman, A. (2024). *Persistence of Anti-Rabies Antibody Response in Horses Following Vaccination*. Pathogens, 13(2), 125. DOI: 10.3390/pathogens13020125
- Trevisan, L., Kowalski, A., Balzan, C., Tochetto, C., Avila, S., Garcia, M. y Castagna, A. (2014). *Coinfection by avirulent Rhodococcus equi and Klebsiella oxytoca as a cause of atypical abortion in a thoroughbred mare*. JMM Case Reports, 1(3), 1-4. DOI: 10.1099/jmmcr.0.001768
- Trimble, A., Blevins, C., Beard, L. Deforno, A. y Davis, E. (2018). Seroprevalence, frequency of leptospiuria, and associated risk factors in horses in Kansas, Missouri, and Nebraska from 2016- 2017. PLOS One, 13(10), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206639>
- Uzal, F., Navarro, M., Asin, J. y Henderson, E. (2022). *Clostridial Diseases of Horses: A Review*. Vaccines, 10(2), 318. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020318>
- Vargas, O. y González, C. (2004). *Amplificación por PCR de tejidos de archivo: efecto de los fijadores*. Salud UIS, 6(2). <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/636>
- Vázquez-Boland, J., Guiguère, S., Hapeshi, A. y MacArthur, I. (2013). *Rhodococcus equi: the many facets of a pathogenic actinomycete*. Veterinary Microbiology, 167(1-2), 9-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.016>
- Verma, A., Stevenson, B. y Adler, B. (2013). *Leptospirosis in horses*. Veterinary Microbiology, 167(1-2), 61-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.012>
- Vitoševića, K., Todorović, M., Varljenb, T., Slovića, Z., Matić, S. y Todorovićd, D. (2018). *Effect of formalin fixation on pcr amplification of DNA isolated from healthy autopsy tissues*. Elsevier, 120(8), 780-788. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.09.005>

- Wang, D., Zeng, J., Ma, H., Fouad, D. y Su, Z. (2024). *Comparative Analysis of the GutMicrobiota between Two Horse Species*. Pakistan Veterinary Journal, 44(2), 449-457. <http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2024.151>
- Wu, Q., Prager, K., Goldstein, T., Alt, D., Galloway, R., Zuerner, R., Lloyd, J. y Schwacke, L. (2014). *Development of a real-time PCR for the detection of pathogenic Leptospira spp. in California sea lions*. Diseases of Aquatic Organisms, 110(3), 165-172. DOI:10.3354/dao02752
- Wuthiekanun, V., Amornchai, P., Langla, S., White, N., Day, N., Limmathurotsakul, D. y Peacock, S. (2015). *Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Leptospira spp. Using Leptospira Vanaporn Wuthiekanun (LVW) Agar*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 93(2), 241-243. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0180
- Yadeta, W., Bashahun, G y Abdela, N. (2016). *Leptospirosis in Animal and its Public Health Implications: A Review*. World Applied Sciences Journal, 34(6), 845-853. DOI: 10.5829/idosi.wasj.2016.34.6.103113
- Yamshchikov, A., Schuetz, A. y Marshall, G. (2010). Rhodococcus equi infection. The Lancet Infectious Diseases, 10(5), 350-359. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70068-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70068-2)
- Yan, W., Faisal, S., Divers, T., McDonough, S., Akey, B. y Chang, Y. (2010). *Experimental Leptospira interrogans Serovar Kennewicki Infection of Horses*. Journal of Veterinary Internal Medicine, 24(4), 912-917. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.00507.x>
- Zhu, D., Chen, H., Ou, X., Liu, M., Wang, M., Zhao, X., Jia, R., Chen, S., Sun, K., Yang, Q., Wu, Y., Chen, X. y Cheng, A. (2020). *Comparison of immunohistochemistry and Ziehl-Neelsen staining for detecting the distribution of Mycobacterium avium subsp avium in naturally infected domestic Pekin ducks (Anas platyrhynchos domestica)*. Veterinary Medicine and Science, 6, 242-247. DOI: 10.1002/vms3.223

Zilch, T., Lee, J., Saleem, M., Zhang, H., Cortese, V., Voris, N., McDonough, S., Divers, T. y Chang, Y. (2020). *Equine leptospirosis: Experimental challenge of Leptospira interrogans serovar Bratislava fails to establish infection in naive horses*. Equine Veterinary Journal, 1-10. DOI: 10.1111/evj.13442

Zúñiga, M., Badillo, E., Abalos, P., Valencia, E., Marín, P., Escudero, E. y Galecio, S. (2023). *Antimicrobial susceptibility of Rhodococcus equi strains isolated from foals in Chile*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 39, 231. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03677-2>

9. ANEXOS

9.1 Anexo 1. Adaptación de “Instrucciones de uso de Steiner Stain Kit (For Spirochetes)”, ScyTek (2022).



205 South 600 West Logan, Utah 84323, U.S.A. – Tel: (800) 729-8350 – Tel: (435) 755-9848 – Fax: (435) 755-0015 – www.scytex.com Rev. 4, 7/26/2022

Steiner Stain Kit (For Spirochetes)

Description and Principle

The Steiner Stain Kit (For Spirochetes) is designed for demonstrating Fungi, *Helicobacter Pylori*, *Legionella pneumophila*, and Spirochete infected tissue. Kit may be used on formalin fixed, paraffin-embedded tissue.

Bacteria are sensitized with Zinc Formalin making the organisms receptive to uptake silver from a silver nitrate solution. Silver is then chemically reduced to a visible metallic form with a reducing solution containing hydroquinone. Pretreatment with Oxidizer Solution improves homogenous staining of bacteria and reduces background silver staining.

Expected Results

Spirochetes:	Black to Brown
<i>Helicobacter Pylori</i> :	Black to Brown
Fungi:	Black to Brown
<i>Legionella pneumophila</i> :	Black to Brown
Background:	Yellow to Tan

Kit Contents

1. Oxidizer Solution
2. Zinc Formalin Solution
3. Gum Mastic Solution
4. Hydroquinone
5. Silver Nitrate Solution (0.2%)
6. Silver Nitrate Solution (1%)

Storage

- | | |
|-----------------------------------|---------|
| 1. Oxidizer Solution | 18-25°C |
| 2. Zinc Formalin Solution | 18-25°C |
| 3. Gum Mastic Solution | 2-8°C |
| 4. Hydroquinone | 18-25°C |
| 5. Silver Nitrate Solution (0.2%) | 2-8°C |
| 6. Silver Nitrate Solution (1%) | 2-8°C |

Suggested Controls (not provided)

Helicobacter Pylori infected stomach.

Uses/Limitations

For In-Vitro Diagnostic use only.

Do not use if reagents become cloudy or precipitate.

Do not use past expiration date.

Use caution when handling reagents.

Non-Sterile

Intended for FFPE sections cut at 5-10µm.

This procedure has not been optimized for frozen sections.

Frozen sections may require protocol modification.

Storage

Mixed storage conditions. Store according to individual label instructions.

Safety and Precautions

Please see current Safety Data Sheets (SDS) for this product and components GHS classification, pictograms, and full hazard/precautionary statements.

Important Notes:

1. All glassware/containers used in this procedure should be chemically cleaned (bleach or acid) and rinsed thoroughly in distilled water.

2. Do not use metal forceps to remove slides from reagents. Use plastic forceps only.

3. Equilibrate all reagents to room temperature prior to use.

13. Rinse slide quickly in distilled water.

14. Dehydrate quickly in 3 changes of absolute alcohol.

15. Clear, and mount in synthetic resin.

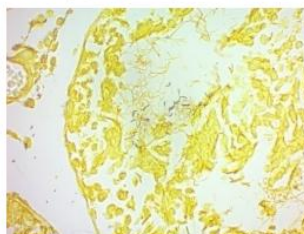
References

1. Carson, F.L., (2009), Histotechnology, A Self-Instructional Text, 3rd Edition. ASCP Press, Chicago, IL. Pages 249-250
2. Margeson, L.S., & Chapman, C.M., (1996) Use of Zinc Formalin as a Sensitizer in Silver Stains for Spirochetes, *Journal of Histotechnology*, 19, 132-138, DOI: 10.1179/jht.1996.19.2.135
3. Swisher, B.L., (1967) Modified Steiner Procedure for Microwave Staining of Spirochetes and Non-flammarious Bacteria, *Journal of Histotechnology*, 10, 4, 241-243, DOI: 10.1179/jht.1987.10.4.241

ScyTek Laboratories, Inc.
205 South 600 West
Logan, UT 84321
435-755-9848
U.S.A.

CE
10C1902
Emergo Europe
Prinsengedijk 20
2514 AP The Hague, The Netherlands

Instructions For Use SSK-IFU



Treponema pallidum spirochetes in Rabbit testes stained with the Steiner Stain Kit (For Spirochetes)

Procedure:

Prepare Reducing Solution at Step #10 of this Procedure:

Combine:

- 25ml 1% Hydroquinone (0.25gm Hydroquinone in 25ml Distilled Water)
- 15ml Gum Mastic Solution (2.5%)

Mix thoroughly and filter through medium filter paper.

Then Add: 6 Drops (240µl) Silver Nitrate Solution (1%). Mix thoroughly.

1. Preheat Water Bath to 70° Centigrade.

2. Deparaffinize sections if necessary and hydrate to distilled water.

3. Incubate slide in Oxidizer Solution for 20 minutes.

4. Rinse thoroughly in distilled water.

Note: Place 20 ml of Silver Nitrate Solution (0.2%) in water bath to preheat.

5. Incubate slide in Zinc Formalin Solution for 5 minutes.

6. Rinse thoroughly in distilled water.

7. Incubate slide in preheated Silver Nitrate Solution (0.2%) for 5 minutes at 70° Centigrade. (Note: Discard solution after this step)

8. Rinse slide thoroughly in distilled water.

9. Dehydrate slide in 2 changes of Absolute Alcohol.

Note: Prepare Reducing Solution (above) and place in water bath to preheat.

10. Incubate slide in Gum Mastic Solution for 3 minutes.

11. Air dry slide for 1 minute or until gum mastic is completely dry.

12. Incubate slide in preheated Reducing Solution for 10-15 minutes or until section is tan to brown at 70° Centigrade. (Note: Discard solution after this step)

9.2. Anexo 2. Adaptación de “Manual de laboratorio de técnica histológica”, por Jeraldine Poveda (2023).

ACTIVIDADES DE LABORATORIO

Objetivo General:

Conocer y preparar la tinción de rutina utilizada para el estudio de tejidos y luego teñir algunas muestras identificando basofilia y acidofilia.

Coloración Núcleo-Citoplasmática

La Hematoxilina –Eosina (HE) Se considera de rutina. Se hace actuar sucesivamente un colorante nuclear (catiónico) y un colorante citoplasmático (aniónico).

Procedimiento:

Desparafrinar los cortes e hidratar hasta el agua mediante los siguientes pasos:

Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Xilol III	5 minutos
Alcohol 100 % I	1 - 5 minutos
Alcohol 100% II	1 - 5 minutos
Alcohol 95% I	1 - 5 minutos
Alcohol 95% II	1 - 5 minutos
Alcohol 70%	1 - 5 minutos
Alcohol 50%	1 - 5 minutos

Nota: Después de cada paso dejar escurrir el exceso de líquido.

Lavar en agua destilada 5 minutos.

Tinción nuclear:

Se puede utilizar diversos tipos de Hematoxilina. (Hemalumbre de Mayer, de Lillie, de Harris, etc.)

- | | |
|----------------------------------|--------|
| • Hematoxilina | 5g |
| • Alcohol 100% | 50ml |
| • Alumbre de Potasio y de Amonio | 100g |
| • Agua destilada | 1000ml |
| • Oxido de rojo de Mercurio | 2,5g |

Procedimiento:

- Disolver la Hematoxilina en Alcohol absoluto.
- Calentar el agua en platina caliente y agregar el alumbre. Una vez que haya soltado el hervor retirar del fuego. Una vez que el alumbre este bien disuelto, agregar suavemente la hematoxilina. Agitar con cuidado (recuerde que el contenedor de la solución está caliente)
- Colocar en platina caliente nuevamente, una vez que hierva retirar y dejar enfriar un poco, agregar **con precaución**, en pequeñas cantidades, el Óxido de Mercurio. Agitar con precaución y dejar que se entibie. Cambiar a envase definitivo la solución.
- Una vez que están hidratados los cortes, colocar las láminas en la solución de hematoxilina, la solución se debe filtrar, siempre que se observe en la superficie una delgada "nata", dependiendo del método que use para realizar la tinción, será el tiempo que las láminas permanezcan dentro de la cubeta de hematoxilina.
 - Regresivo, en este caso se realiza una sobretinción nuclear, donde las láminas permanecen alrededor de 5 minutos en la cubeta de tinción, para luego ser lavadas con agua corriente y diferenciadas en alcohol ácido (OH-HCl 0,5%), esta solución permitirá extraer el

Deshidratación	
Alcohol de 70%	10 segundos
Alcohol de 95%	2 minutos
Alcohol de 95%	2 minutos
Alcohol de 100%	2 minutos
Alcohol de 100%	2 minutos
Aclarar	
Xilol I	2 minutos
Xilol II	2 minutos
Xilol III	2 minutos
Montar en resina sintética.	

Resultados:

- ✓ Núcleos azules
- ✓ Citoplasma y otros elementos acidófilos rosa a rojo

Nota: La Hematoxilina es un colorante versátil y ampliamente usado en técnicas histológicas. Se emplean para demostrar núcleo celular, mielina, fibras elásticas, fibrina, neuroglia, estriaciones musculares, etc.

Entre las Hematoxilinas o Hemateina posibles de ser utilizadas con este propósito se recomienda la Hematoxilina de Harris, como técnica de rutina, que contrasta bien los núcleos, dando un fondo totalmente incoloro cuando se halla bien acetificada la solución.

En relación a la coloración con Eosina hay autores que prefieren utilizar soluciones alcohólicas o acuosas. Este colorante da diversas tonalidades a la coloración citoplasmática, así por ej. La Eosina B y Eritrosina B dan un tinte rosa- azulado a la coloración, mientras que la Floxina B da un tono rojo más profundo y la Eosina Y rosa Amarillento.

Colorante, lo que se debe controlar al microscopio, vigilando que solo los núcleos estén teñidos.

- Progresivo, en este método, el tiempo de tinción es relativo, puede ir desde los 15 segundos a 1 minuto el tiempo de tinción óptimo (si la hematoxilina está recientemente preparada). De esta forma primero se deja 15 segundos, se lava y se observa al microscopio, buscando que los núcleos tengan una tinción adecuada.
- Lavado abundante en agua corriente. (este paso se hace para azular los tejidos)
- Pasar los cortes por agua destilada.
- Lavado en agua corriente (10 minutos)
- Lavado en agua destilada. (solo una pasada)

Nota:

Si se desea apresurar el viraje o azulamiento se deberá hacer inmersiones en Amoniaco 3% hasta que las muestras se tornen azules. Luego lavar abundantemente en agua para que no queden restos de amoníaco.

2.- Tinción citoplasmática

Esta se realiza generalmente con eosina al 1%, o bien una mezcla de eosina-floxina al 0.5%, en proporciones de 1:1

Preparación de la eosina:

Disolver 1g de **Eosina Y** alcohólica.

Procedimiento:

- Una vez realizada la tinción nuclear, se procede a la tinción del citoplasma:
- Colocar los cortes en la solución de eosina por 30 seg. a 3 minutos
- Lavado rápido en agua destilada, sólo para retirar exceso de colorante
- Pasar por alcoholes ascendentes para deshidratar el corte.

9.3. Anexo 3. Guía de análisis tisular de la tecnóloga médico Jeraldine Poveda (2023).

BACILOS ALCOHOL – ACIDO RESISTENTES

A.- Método Ziehl Neelsen:

Fijación: Formalina o cualquier tejido bien fijado.

Soluciones.

a) **Solución de Carbol Fucsina:**

- | | |
|----------------------|-------|
| ▪ Fucsina básica | 1g. |
| ▪ Alcohol absoluto | 10ml. |
| ▪ H2O Fenicada al 5% | 90ml |

La solución dura años (filtrar antes de usar)

- b) **Alcohol Clorhídrico al 1 %:** 1cc de Ac. Clorhídrico, hasta completar un volumen de 100ml con alcohol absoluto
- c) Coloración nuclear: Azul de metileno al 1 % o hematoxilina de Harris .(ver colorantes nucleares).

Procedimiento:

- 1) Desparafinar e Hidratar hasta el H2O destilada.
- 2) La tinción con Carbol Fucsina (sol. (a) puede realizarse tiñendo sobre la lámina por 30 min a RT, o colocando un trozo de papel filtro húmedo sobre tejido, agregar el colorante y calentar la lámina en el mechero hasta que se desprendan vapores.
- 3) Lavar en H2O corriente.
- 4) Diferenciar en alcohol clorhídrico (sol (b) hasta que no se desprenda colorante. (20 seg. a varios minutos).
- 5) Lavar en H2O corriente 2-3minutos.
- 6) Tinción de contraste con azul de metileno al 1% por 30 seg a RT.
- 7) Lavar en H2O Corriente., secar el corte.
- 8) Dejar secar al aire y montar en resina.

92

Resultados:

- | | |
|------------------------------------|---------|
| ✓ Bacilos Alcohol-Acido Resistente | rojos |
| ✓ Núcleos | azules. |

9. 4. Anexo 4: Hallazgos macro y microscópicos de vaca con Paratuberculosis, se observan las bacterias ácido alcohol resistentes. Control positivo tinción Z-N.

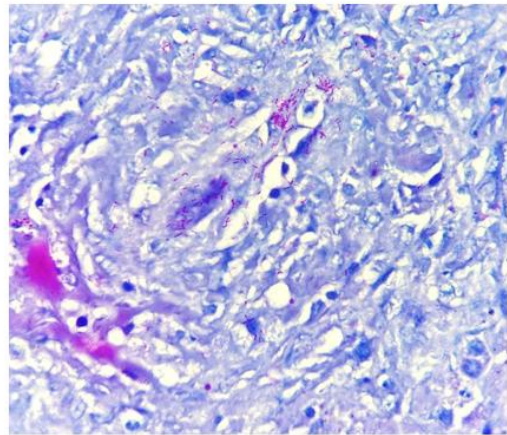
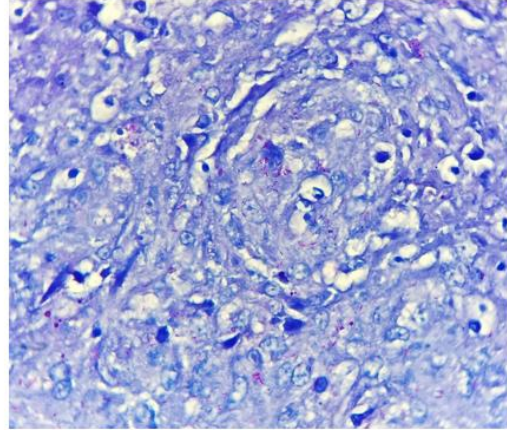
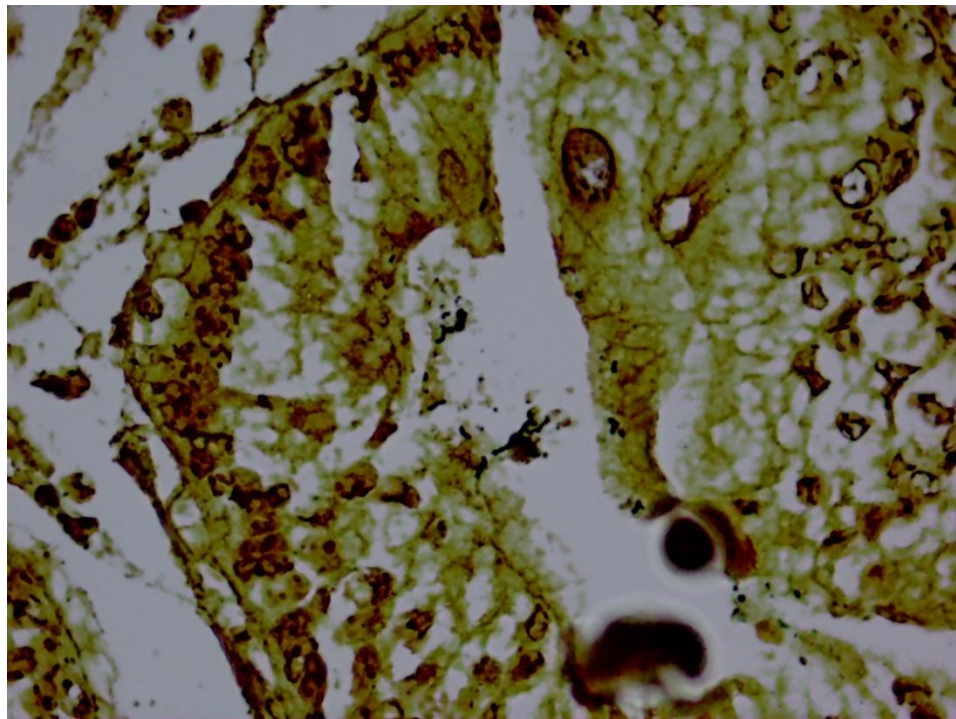
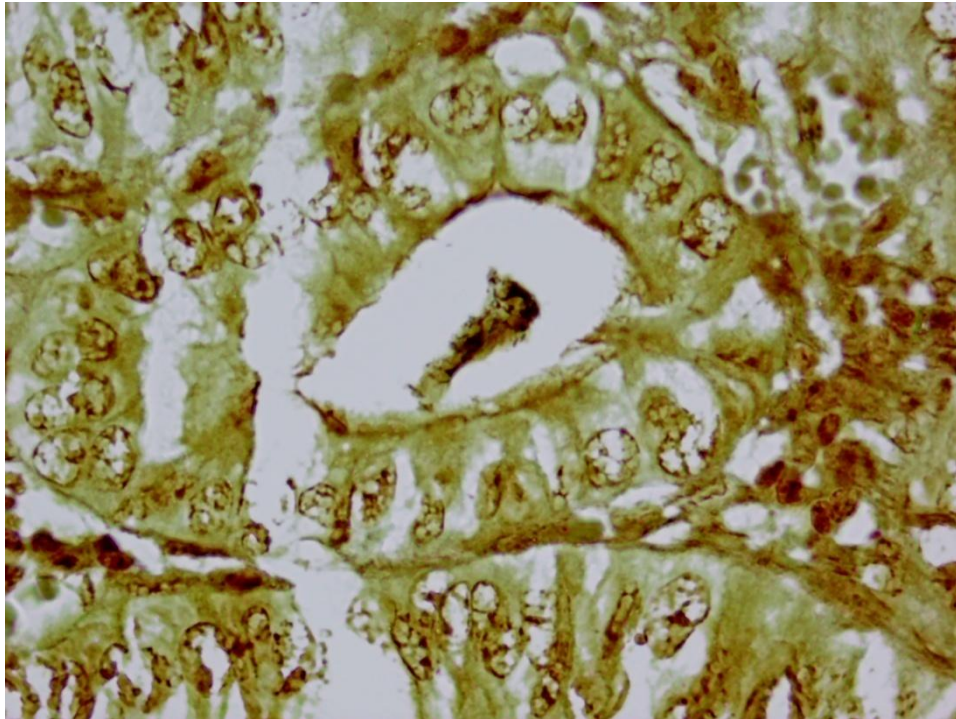


Imagen superior izquierda: enteritis granulomatosa. **Imagen inferior izquierda:** linfangitis. **Imágenes superior e inferior derecha:** bacterias ácido alcohol resistentes.

9.5. Anexo 5. Intestino de cerdo con tinción S-S, diagnosticado con la espiroqueta *Lawsonia intracelularis* en la Unidad de Morfología y Diagnóstico de la Universidad San Sebastián, Sede de La Patagonia.



9.6. Anexo 6. Adaptación de “Histoscore”, adaptado por Gabriel Fernandez (2024), por Carla Barría (2023).

Tabla 2. Graduación de Histoscore para Inflamación.

INFLAMACIÓN		
Ausente	0	Sin presencia de células inflamatorias
Leve	1	Presencia de foco de infiltración de células inflamatorias.
Moderada	2	Presencia de infiltrado de células inflamatorias multifocal.
Severa	3	Infiltración de células inflamatorias difusa que abarca gran parte del tejido afectando la estructura normal.

Fuente: Adaptado de Hallazgos Histopatológicos En Órganos De Ejemplares De Visón (*Neovison Visón*) De Las Regiones De Los Ríos Y Los Lagos, por C. Barría, 2023. Derechos Reservados 2023 para Universidad San Sebastián.

Tabla 3. Graduación de Histoscore para Necrosis.

NECRÓTICOS		
Ausente	0	Sin presencia de núcleos picnóticos.
Leve	1	Picnosis focal.
Moderada	2	Picnosis multifocal.
Severa	3	Picnosis difusa, abarca gran parte del tejido.

Fuente: Adaptado de Hallazgos Histopatológicos En Órganos De Ejemplares De Visón (*Neovison Visón*) De Las Regiones De Los Ríos Y Los Lagos, por C. Barría, 2023. Derechos Reservados 2023 para Universidad San Sebastián.

Tabla 4. Graduación de Histoscore para Trastornos Circulatorios.

CIRCULATORIOS		
Ausente	0	Sin presencia de lesiones circulatorias.
Leve	1	Lesión circulatoria focal.
Moderada	2	Lesiones circulatorias multifocales o de distinto origen.
Severa	3	Lesiones circulatorias de distinto origen y que abarcan gran parte del tejido.

Fuente: Adaptado de Hallazgos Histopatológicos En Órganos De Ejemplares De Visón (*Neovison Visón*) De Las Regiones De Los Ríos Y Los Lagos, por C. Barría, 2023. Derechos Reservados 2023 para Universidad San Sebastián.

Tabla 5. Graduación de Histoscore para Trastornos Degenerativos.

DEGENERATIVOS		
Ausente	0	Sin cambios degenerativos.
Leve	1	Lesión degenerativa focal.
Moderada	2	Degeneración multifocal con grado de infiltración moderada.
Severa	3	Degeneración severa, ocupando gran parte del tejido, de carácter irreversible.

Fuente: Modificado de Hallazgos Histopatológicos En Órganos De Ejemplares De Visón (*Neovison Visón*) De Las Regiones De Los Ríos Y Los Lagos, por C. Barría, 2023. Derechos Reservados 2023 para Universidad San Sebastián.

Tabla 6. Graduación de Histoscore para Trastornos del Crecimiento Celular.

DEL CRECIMIENTO CELULAR		
Ausente	0	Tejido sin anormalidad.
Leve	1	Cambios estructurales a nivel celular, de distribución focal en el tejido.
Moderada	2	Zonas multifocales con cambios en aspecto funcional y estructural a nivel celular.
Severa	3	Trastorno en estructura celular generalizado, abarcando gran parte del tejido.

Fuente: Modificado de Hallazgos Histopatológicos En Órganos De Ejemplares De Visón (*Neovison Visón*) De Las Regiones De Los Ríos Y Los Lagos, por C. Barría, 2023. Derechos Reservados 2023 para Universidad San Sebastián.

9.7. Anexo 7. Protocolo descrito para reactivo Brilliant II SYBRGreen qPCR por Stratagene (2007).

PROTOCOL

Preparing the Reactions

Notes *Once the tube containing the Brilliant II SYBR Green QPCR master mix is thawed, store it on ice while setting up the reactions. Following initial thawing of the master mix, store the unused portion at 4°C. Multiple freeze-thaw cycles should be avoided. SYBR Green I dye (present in the master mix) is light-sensitive; solutions containing the master mix should be protected from light whenever possible.*

It is prudent to set up a no-template control reaction to screen for contamination of reagents or false amplification.

1. If the reference dye will be included in the reaction, (optional), dilute the dye solution provided **1:500 (Mx3000P, Mx3005P, and Mx4000 instruments)** or **1:50 (ABI PRISM 7700 and ABI 7900HT instruments)** using nuclease-free PCR-grade H₂O. For other instruments, use the guidelines in the *Reference Dye* section under *Preprotocol Considerations*. **Keep all solutions containing the reference dye protected from light.**

Note *If using a system other than the Mx3000P, Mx3005P or Mx4000 instruments, the use of the reference dye may be required for optimal results.*

2. Prepare the experimental reactions by combining the following components *in order*. Stratagene recommends preparing a single reagent mixture for duplicate experimental reactions and duplicate no-template-controls (plus at least one reaction volume excess), using multiples of each component listed below.

Experimental Reaction

Nuclease-free PCR-grade water to adjust the final volume to 25 µl (including experimental DNA)

12.5 µl of 2× Brilliant II SYBR Green QPCR master mix

x µl of upstream primer (200–600 nM final concentration)

x µl of downstream primer (200–600 nM final concentration)

0.375 µl of diluted reference dye (optional)

Note *A total reaction volume of 50 µl may also be used.*

3. Gently mix without creating bubbles (do not vortex), then distribute the mixture to the individual experimental reaction tubes.
4. Add *x* µl of experimental gDNA, cDNA, or plasmid DNA to each reaction.

- Gently mix the reactions without creating bubbles (do not vortex).

Note Bubbles interfere with fluorescence detection.

- Centrifuge the reactions briefly.

PCR Cycling Programs

- Place the reactions in the instrument and run one of the PCR programs listed below. Stratagene recommends a two-step cycling protocol for most primer/template systems. For targets <150 bp in length, the fast protocol with two-step cycling may be used to decrease run times without compromising amplification efficiency. For primers with low melting temperatures, the three-step cycling protocol may be optimal.

Recommended Protocol with Two-Step Cycling (All Targets)

Cycles	Duration of cycle	Temperature
1	10 minutes ^a	95°C
40	30 seconds	95°C
	1.0 minute ^b	60°C

^a Initial 10 minute incubation is required to activate the DNA polymerase.

^b Set the temperature cycler to detect and report fluorescence during the annealing/extension step of each cycle.

Fast Protocol with Two-Step Cycling (Targets <150 bp)

Cycles	Duration of cycle	Temperature
1	15 minutes ^a	95°C
40	10 seconds	95°C
	30 seconds ^b	60°C

^a Initial 15 minute incubation is required to activate the DNA polymerase.

^b Set the temperature cycler to detect and report fluorescence during the annealing/extension step of each cycle.

Alternative Protocol with Three-Step Cycling (All Targets)

Cycles	Duration of cycle	Temperature
1	10 minutes ^a	95°C
40	30 seconds	95°C
	1.0 minute ^b	50–60°C ^c
	30 seconds ^b	72°C

^a Initial 10 minute incubation is required to activate the DNA polymerase.

^b Set the temperature cycler to detect and report fluorescence during the annealing and extension step of each cycle.

^c Choose an appropriate annealing temperature for the primer set used.

9.8. Anexo 8. Informe de Diagnóstico Serológico para *Leptospira spp.* con técnica de microMAT, del caso 133-24-N, por el Servicio Agrícola y Ganadero (2024). Control positivo de *Leptospira spp.*



REGISTRO DE PROTOCOLO ANIMAL

Servicio Agrícola y Ganadero

Protocolo N°	Fecha Toma Muestra	Fecha Recepción	Fecha Cierre
331885	13-11-2024	27-11-2024	06-12-2024

1. IDENTIFICACIÓN DEL LUGAR DE MUESTREO

RUP	NOMBRE DE ESTABLECIMIENTO
10.1.05.0155	LAS JUNTAS DEL LOPEZ

2. INFORMACIÓN DEL PROTOCOLO

CANTIDAD ANIMALES / COLMENA	CANTIDAD MUESTRAS
1	1
OBJETIVO MUESTREO	NÚMERO DE DENUNCIA
Muestreo interno/Autocontrol	
LABORATORIO	ESPECIE
Laboratorio Lavet	Bovinos

3. IDENTIFICACIÓN DEL MEDICO VETERINARIO

NOMBRE

4. RESUMEN DE MUESTRAS

ENFERMEDAD	TECNICA	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD ANALISIS
Brucelosis (B. abortus)	Aglutinación (Rosa de Bengala)	Suero	1
Diarrea Viral Bovina	ELISA - Indirecto	Suero	1
Diarrea Viral Bovina	ELISA Antígeno	Suero	1
Fiebre Q (Coxiella burnetti)	ELISA - Indirecto	Suero	1
Leptospirosis	MAT	Suero	1
Neosporosis (N. caninum)	ELISA - Indirecto	Suero	1
Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)	ELISA - Indirecto	Suero	1

5. DETALLE DE ANALISIS

Análisis Oficial	Nombre Muestra	Rup Origen	Id Animal	Id Análisis	Categoría	Enfermedad	Técnica	Tipo Muestra	Resultado	Valor Resultado	Fecha Emisión Resultado
SI	1	10.1.05.0155	15600542	18001583	Vaca	Brucelosis (B. abortus)	Aglutinación (Rosa de Bengala)	Suero	No reaccionante	0	29-11-2024
NO	1	10.1.05.0155	15600542	18001584	Vaca	Diarrea Viral Bovina	ELISA - Indirecto	Suero	No reaccionante	76	06-12-2024
NO	1	10.1.05.0155	15600542	18001585	Vaca	Fiebre Q (Coxiella burnetti)	ELISA - Indirecto	Suero	No reaccionante	4	04-12-2024
NO	1	10.1.05.0155	15600542	18001586	Vaca	Leptospirosis	MAT	Suero	Reaccionante	Hardjo:3200 Pomona:100 Tarassovi:100 Autumnalis:6400	28-11-2024

BIND	<p>Protocol for Column Equilibration:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Add 100 µL 3M NaOH to the MicroElute® LE DNA Column. 2. Centrifuge at 10,000 x g for 30 seconds. 3. Add 500 µL sterile deionized water to the MicroElute® LE DNA Column. 4. Centrifuge at 10,000 x g for 30 seconds. 5. Discard the filtrate and reuse the collection tube. <ol style="list-style-type: none"> 14. Transfer the entire sample from Step 12 (including any precipitates) to the MicroElute® LE DNA Column. 15. Centrifuge at 10,00 g for 1 minute. Discard the filtrate and the collection tube.
WASH	<ol style="list-style-type: none"> 16. Transfer the MicroElute® LE DNA Column to a new 2 mL Collection Tube. 17. Add 500 µL HBC Buffer diluted with 100% isopropanol (see the bottle for instructions). Centrifuge at 10,000g for 1 minute. Discard the filtrate and the collection tube. 18. Transfer the MicroElute® LE DNA Column to a new 2 mL Collection Tube. 19. Add 700 µL DNA Wash Buffer diluted with 100% ethanol (see the bottle for instructions). Centrifuge at 10,000g for 1 minute. Discard the filtrate and reuse the collection tube. 20. Repeat Step 19 for a second DNA Wash step.
ELUTE	<ol style="list-style-type: none"> 21. Centrifuge the empty MicroElute® LE DNA Column at maximum speed for 2 minutes to dry the column. This step is critical for removal of trace ethanol that may interfere with downstream applications. 22. Place the MicroElute® LE DNA Column into a new 1.5 mL microcentrifuge tube. 23. Add 50-75 µL Elution Buffer heated to 70°C. Let sit for 3 minutes at room temperature. Centrifuge at maximum speed for 1 minute. 24. Repeat Step 23 for a second elution step. 25. Store eluted DNA at -20°C.

9.10. Anexo 10. Tabla con resultados de cuantificación de ADN de muestras para qPCR (Elaboración propia, 2025).

		Cuantificación ADN	260/280
101-11-N	Hígado	1,425	0,83
	Riñón	1,652	0,87
214-24-N	Intestino	43,637	1,76
328-24	Hígado	231,223	1,86
	Pulmón	140,296	1,79
444-14-N	Riñón	1,079	0,81
	Pulmón	0,96	0,83
788-16-N	Hígado	1,421	1,16
	Riñón	1,363	1,15
	Pulmón	1,217	1,08
862-23 (Control positivo R)	Hígado	149,33	1,83
	Riñón	394,026	1,87
	Pulmón	149,83	1,93
	Intestino	101,816	1,84
891-17-E	Riñón	0,796	0,89
	Pulmón	0,7	0,8
894-17-N	Hígado	14,022	0,8
	Pulmón	12,339	0,79
921-17-E	Hígado	1,256	1,07
	Riñón	13,16	0,8
1063-18-N	Hígado	16,044	0,75
	Riñón	15,549	0,75
	Pulmón	16,405	0,76
	Intestino	15,402	0,75
1167-18-N	Hígado	15,523	0,75
	Riñón	14,551	0,75
	Pulmón	15,611	0,76
1314-19-H	Hígado	1,238	1,03
1320-19-H	Intestino	2,357	1,22
1417-20-H	Hígado	13,02	0,79
	Riñón	12,828	0,78
	Pulmón	15,32	0,8
1473-21-N	Hígado	18,114	0,82
2188-24-H	Hígado	15,87	0,77
	Riñón	15,249	0,77
	Pulmón	15,83	0,79
	Intestino	14,383	0,78
2203-24-H	Hígado	1,101	1,08
	Riñón	2,328	1,28
	Pulmón	2,188	1,32
2245-24-H	Hígado	5,601	1,48
	Riñón	14,722	0,86
	Pulmón	14,117	0,85
	Intestino	14,581	0,85
133-25-H (control positivo L.)	Riñón	6,644	1,29

9.11. Anexo 11. Decreto N°389 Exento, Ministerio de Agricultura (2019).

23/7/24, 17:04

Ley Chile - Decreto 389 EXENTO 21-NOV-2014 MINISTERIO DE AGRICULTURA - Biblioteca del Congreso Nacional



DECRETO 389 EXENTO | ESTABLECE ENFERMEDADES DE DECLARACIÓN OBLIGATORIA PARA LA APLICACIÓN DE MEDIDAS SANITARIAS Y DEROGA DECRETOS QUE INDICA

MINISTERIO DE AGRICULTURA

Promulgación: 14-NOV-2014 Publicación: 21-NOV-2014

Versión: Última Versión - 02-JUL-2019

Última modificación: 02-JUL-2019 - Decreto 65 EXENTO

Url: <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?i=1070774&f=2019-07-02>

Url Corta: <https://bcn.cl/3lr99>

ESTABLECE ENFERMEDADES DE DECLARACIÓN OBLIGATORIA PARA LA APLICACIÓN DE MEDIDAS SANITARIAS Y DEROGA DECRETOS QUE INDICA

Núm. 389 exento.- Santiago, 14 de noviembre de 2014.- Vistos: Lo establecido en el artículo 32, N° 8, de la Constitución Política del Estado; lo dispuesto en el DFL RRA N° 16 de 1963, que establece normas sobre Sanidad y Protección Animal; DFL N° 294 de 1960, del Ministerio de Hacienda, que establece funciones y estructura del Ministerio de Agricultura; lo establecido en la Ley N° 18.755, Orgánica del Servicio Agrícola y Ganadero; el decreto N° 186 de 1994, del Ministerio de Agricultura; los decretos N° 644 de 1951; 390 de 1965; 10 de 1975; 525 de 1977; 299 de 1979; 356 de 1980; 5 de 1984; 20 de 1986; 3 de 1992; 1.192 de 1992; 249 de 1996; 55 de 1998; 144 de 1998; 157 de 2000; 191 de 2000; 216 de 2000; 199 de 2001; 307 de 2002; 300 de 2006; 321 de 2006; 244 de 2007 y 736 de 2012, todos del Ministerio de Agricultura, y la resolución N° 1.600 de 2008, de la Contraloría General de la República.

9.12. Anexo 12. P valores de Prueba Exacta de Fisher, calculados con GraphPad Prism 10, para trastornos inflamatorios. (Elaboración propia, 2025).

Table Analyzed	Trastornos Inflamatorios
P value and statistical significance	
Test	Fisher's exact test
P value	0.0204
P value summary	*
One- or two-sided	NA
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Number of rows	4
Number of columns	4
Table Analyzed	Trastornos Circulatorios
P value and statistical significance	
Test	Fisher's exact test
P value	0.4461
P value summary	ns
One- or two-sided	NA
Statistically significant (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Number of rows	4
Number of columns	4
Table Analyzed	Trastornos Necróticos
P value and statistical significance	
Test	Fisher's exact test
P value	0.0100
P value summary	**
One- or two-sided	NA
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Number of rows	4
Number of columns	4
Table Analyzed	Trastornos Degenerativos
P value and statistical significance	
Test	Fisher's exact test
P value	<0.0001
P value summary	****
One- or two-sided	NA
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Number of rows	4
Number of columns	4

9.13. Anexo 13. P valores de Prueba Exacta de Fisher, calculados con GraphPad Prism 10, para asociación entre hallazgos histopatológicos de *Leptospira spp.* y resultado qPCR. (Elaboración propia, 2025).

Table Analyzed	Relación histopatología y qPCR Rhodococcus		
P value and statistical significance			
Test	Fisher's exact test		
P value	0.2890		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant (P < 0.05)?	No		
Data analyzed	qPCR positivo	qPCR negativo	Total
Lesiones presentes	3	15	18
Lesiones ausentes	1	25	26
Total	4	40	44
Percentage of row total	qPCR positivo	qPCR negativo	
Lesiones presentes	16.67%	83.33%	
Lesiones ausentes	3.85%	96.15%	
Percentage of column total	qPCR positivo	qPCR negativo	
Lesiones presentes	75.00%	37.50%	
Lesiones ausentes	25.00%	62.50%	
Percentage of grand total	qPCR positivo	qPCR negativo	
Lesiones presentes	6.82%	34.09%	
Lesiones ausentes	2.27%	56.82%	

9.14. Anexo 14. P valores de Prueba Exacta de Fisher, calculados con GraphPad Prism 10, para asociación entre hallazgos histopatológicos de *Rhodococcus equi* y resultado qPCR. (Elaboración propia, 2025).

Table Analyzed	Relación histopatología y qPCR Rhodococcus		
P value and statistical significance			
Test	Fisher's exact test		
P value	0.2890		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant (P < 0.05)?	No		
Data analyzed	qPCR positivo	qPCR negativo	Total
Lesiones presentes	3	15	18
Lesiones ausentes	1	25	26
Total	4	40	44
Percentage of row total	qPCR positivo	qPCR negativo	
Lesiones presentes	16.67%	83.33%	
Lesiones ausentes	3.85%	96.15%	
Percentage of column total	qPCR positivo	qPCR negativo	
Lesiones presentes	75.00%	37.50%	
Lesiones ausentes	25.00%	62.50%	
Percentage of grand total	qPCR positivo	qPCR negativo	
Lesiones presentes	6.82%	34.09%	
Lesiones ausentes	2.27%	56.82%	

9.15. Anexo 15. P valores de Prueba Exacta de Fisher, calculados con GraphPad Prism 10, para asociación entre tinción S-S y resultado qPCR. (Elaboración propia, 2025).

Table Analyzed	relación SS qPCR		
P value and statistical significance			
Test	Fisher's exact test		
P value	>0.9999		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant (P < 0.05)?	No		
Data analyzed	qPCR positivo	qPCR negativo	Total
SS positivo	0	1	1
SS negativo	0	13	13
Total	0	14	14
Percentage of row total	qPCR positivo	qPCR negativo	
SS positivo	0.00%	100.00%	
SS negativo	0.00%	100.00%	
Percentage of column total	qPCR positivo	qPCR negativo	
SS positivo		7.14%	
SS negativo		92.86%	
Percentage of grand total	qPCR positivo	qPCR negativo	
SS positivo	0.00%	7.14%	
SS negativo	0.00%	92.86%	

9.16. Anexo 16. P valores de Prueba Exacta de Fisher, calculados con GraphPad Prism 10, para asociación entre tinción Z-N y resultado qPCR. (Elaboración propia, 2025).

Table Analyzed	relación ZN y qPCR		
P value and statistical significance			
Test	Fisher's exact test		
P value	0.0351		
P value summary	*		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes		
Data analyzed	qPCR positivo	qPCR negativo	Total
ZN positivo	2	0	2
ZN negativo	2	15	17
Total	4	15	19
Percentage of row total	qPCR positivo	qPCR negativo	
ZN positivo	100.00%	0.00%	
ZN negativo	11.76%	88.24%	
Percentage of column total	qPCR positivo	qPCR negativo	
ZN positivo	50.00%	0.00%	
ZN negativo	50.00%	100.00%	
Percentage of grand total	qPCR positivo	qPCR negativo	
ZN positivo	10.53%	0.00%	
ZN negativo	10.53%	78.95%	