



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Asociación entre la presencia de anticuerpos contra
Leptospira interrogans y problemas reproductivos en
borregas de una SAIS en Junín durante la Campaña
2003**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Claudia Andrea FLORES MONTES

Lima, Perú

2007



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Flores, C. Asociación entre la presencia de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* y problemas reproductivos en borregas de una SAIS en Junín durante la Campaña 2003 [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2007.

CONTENIDO

CONTENIDO	iv
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
SUMMARY	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Características Pecuarías de la SAIS Tupac Amaru	3
2.2. La Leptospirosis	4
2.3. Taxonomía y Clasificación	5
2.3.1. Clasificación Serológica	5
2.3.2. Clasificación Genotípica	5
2.4. Biología de la Leptospira	6
2.4.1. Características Morfológicas y Bioquímicas	6
2.4.2. Características Moleculares	7
2.4.3. Características de Cultivo	8
2.5. Epidemiología y Epizootiología	9
2.5.1. Medio Ambiente	9
2.5.2. En el Hombre	10
2.5.3. Los Animales	11

2.6. Patogenia	13
2.7. Inmunología	14
2.8. Signos Clínicos	15
2.9. Lesiones	17
2.10. Impacto Económico	18
2.11. Diagnóstico	18
2.12. Tratamiento	20
2.13. Control	21
2.14. Vacunación	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Lugar de Estudio	24
3.2. Animales	24
3.3. Materiales	26
3.4. Diseño Estadístico	26
3.4.1. Tamaño Muestral	26
3.5. Toma de Muestras	27
3.6. Determinación de Anticuerpos	27
3.7. Análisis de Datos	28
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	34
VI. CONCLUSIONES	39
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	40

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Presencia de anticuerpos contra <i>Leptospira sp.</i> en borregas según grupo de estudio. 2003.	29
Cuadro 2. Presencia de anticuerpos contra <i>Leptospira sp.</i> en borregas con problemas reproductivos. 2003	30
Cuadro 3. Presencia de anticuerpos contra <i>Leptospira sp.</i> en borregas según lugar de procedencia. 2003.	30
Cuadro 4. Borregas seroreactoras a 8 serovares de <i>Leptospira sp.</i> (n =109). 2003.	31
Cuadro 5. Títulos de anticuerpos entre serovares de <i>Leptospira sp.</i> en borregas seroreactoras del grupo CASO (n =63). 2003.	32
Cuadro 6. Títulos de anticuerpos entre serovares de <i>Leptospira sp.</i> en borregas seroreactoras del grupo CONTROL (n =46). 2003.	32
Cuadro 7. Presencia de anticuerpos contra <i>Leptospira sp.</i> en borregas según edad. 2003	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa Conjunto de las Unidades de Producción y Comunidades Socias de la SAIS Tupac Amaru N° 1- Pachacayo. 25

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la asociación entre la presencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* y la presentación de problemas reproductivos en borregas de dos localidades de la SAIS Tupac Amaru, durante la campaña reproductiva del 2003. Con este propósito se colectaron muestras de suero de borregas entre 2 a 10 años de edad que tuvieran problemas reproductivos como abortos, vacías simples, vacías dobles (grupo Caso: n = 220) y de borregas sin problemas reproductivos (grupo Control: n = 220) durante la actividad del perneo, para determinar anticuerpos contra *Leptospira* serovar: *pomona*, *hardjo*, *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *wolfii*, *ballum* y *bratislava*, mediante la técnica de microaglutinación. La prevalencia de *Leptospira sp.* en la población estudiada fue de $24.8 \pm 4.56\%$, correspondiendo al grupo Caso $28.64 \pm 6.95\%$ y al grupo Control $20.91 \pm 5.90\%$. No se encontró asociación estadística significativa entre las variables presencia de anticuerpos y problemas reproductivos mediante el análisis de Chi cuadrado. Los serovares detectados con mayor frecuencia fueron *ballum* con 42.2% (46/109) e *icterohaemorrhagiae* con 31.19% (34/109). Se detectaron también animales con anticuerpos a más de un serovar de *Leptospira*. La ausencia de asociación estadística significativa entre las variables mencionadas podría deberse a varios factores como: corta vida de los anticuerpos contra los serovares de *Leptospira* estudiados, serovares utilizados distintos a los existentes en la zona, época de muestreo, etc.

Palabras clave: ovinos, *Leptospira sp.*, problemas reproductivos, anticuerpos, microaglutinación.

SUMMARY

The objective of the present study was to determine the association between the presence of antibodies toward *Leptospira sp.* and the reproductive problems presentation in ewes of two places of the Tupac Amaru SAIS, during the reproductive campaign 2003. With that purpose serum samples were collected of ewes between 2 to 10 years old with reproductive problems like abortion, simple empty, double empty (CASE group: n= 220); and ewes without reproductive problems (CONTROL group: n=220) during the confirmation of pregnant ewes activity, to determine antibodies toward *Leptospira* serovar: pomona, hardjo, canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, wolfii, ballum y Bratislava, through microagglutination technique. The prevalence of *Leptospira sp.* in the population studied was $24.8 \pm 4.56\%$ corresponding to CASE group $28.64 \pm 6.95\%$ and the CONTROL group $20.91 \pm 5.90\%$. We not find significant statistic association between the variables antibodies presence and reproductive problems through the analysis CHI square test. The serovars detected more frequently was ballum with 42.2% (46/109) and icterohaemorrhagiae with 31.19% (34/109). We detected too animals with antibodies to more one serovar of *Leptospira*. The absence of significant statistic association between the variables mentioned are able to several factors like: short life of antibodies toward the serovars studied, distinct serovars to existents in the zone, time of serum collect, etc.

Key words: sheep, *Leptospira sp.*, reproductive problems, antibodies, microagglutination.

I. INTRODUCCIÓN

La población ovina en el Perú es de 12 085 683 cabezas (INEI, 1994), las que se distribuyen en mayor porcentaje en la región sierra, seguido de la costa y la selva (DGIA, 2002). El 70% de esta población se concentra a nivel de comunidades campesinas y son criados bajo sistemas extensivos y mixtos basados en la alimentación con pastos naturales con escasa o ninguna tecnología. Sin embargo existen un grupo de empresas campesinas, como la SAIS Tupac Amaru, o la SAIS Pachacutec, en la Sierra Central, que han logrado un aceptable nivel tecnológico y rebaños de mayor tamaño (120 000 y 80 000 cabezas de ovinos respectivamente), que les permite manejar una economía de escala (DGIA, 2002).

Los ovinos como los otros rumiantes pueden ser afectados por agentes parasitarios e infecciosos, aparte de los problemas de índole nutricional que disminuyen su capacidad productiva y reproductiva como son los abortos, mortalidad perinatal, etc. (Gamarra, comunicación personal).

Varios son los agentes bacterianos causantes de fallas reproductivas, siendo las clamidias, *Campylobacter* sp., *Listeria* y la *Leptospira* sp. los más importantes (Schoenian, 2000). Las leptospirosis son de distribución mundial, y su epidemiología es muy compleja (Liceras de Hidalgo, 1989). Estudios de prevalencia en los humanos, así como algunas especies de animales domésticos

y silvestres efectuados en el Perú, indican su amplia distribución pero se conoce poco sobre su epidemiología.

En la SAIS Tupac Amaru, el porcentaje de abortos es aproximadamente 6% (Gamarra, comunicación personal), tratándose de miles de animales que conforman el rebaño, significa pérdidas económicas importantes para la empresa. En toda empresa ganadera los problemas reproductivos tienen gran impacto económico por lo que es importante determinar las causas, siendo una de ellas las de origen infeccioso como la leptospirosis.

No existen informaciones sobre rol de las *Leptospiras* en la presentación de los abortos en las borregas de la SAIS Tupac Amaru, por lo que el presente estudio tuvo por objetivo determinar la asociación de los anticuerpos contra *Leptospira sp.* y los problemas reproductivos en borregas de la SAIS Tupac Amaru durante la campaña reproductiva del 2003.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Características Pecuarías de la SAIS Tupac Amaru

La crianza de ovinos en el Perú se inicia con la introducción del ovino “Churro” Español durante la conquista. Inicialmente se estableció en los valles de Lima, para posteriormente radicarse definitivamente en la Sierra, área donde prosperan el 96.2% de la población de 12 085 683 que hoy tiene el país. La mayor concentración de población ovina corresponde a los departamentos de Puno, Cusco, Junín y Huánuco. El ovino criollo constituye el genotipo de mayor población en el país; el Corriedale se encuentra muy difundida a nivel de las principales ganaderías ovinas de los departamentos de Junín, Pasco y Puno. El ovino Junín es la raza peruana formada en el departamento de Junín, a partir del año 1955 cuyo núcleo genético se encuentra en la SAIS Tupac Amaru, lugar de nuestro estudio. Estas tres son los principales genotipos ovinos del país (DGIA, 2002).

La SAIS Tupac Amaru (con 120 000 cabeza de ovinos) comprende las unidades de producción de Atocsaico, Casaracra, Cochás, Consac, Pachacayo, Pucara, Quiulla, en las jurisdicciones de las provincias de Jauja, Junín, Tarma y Yauli, del departamento de Junín. Los campos que son pastoreados se hallan

entre los 3500 y los 4700 msnm y exhiben un relieve topográfico relativamente suave y variado con pendientes de 2 a 50%; y, en un menor grado, el cuadro topográfico se completa con la presencia de montañas, áreas nivales, escarpes y riberas lacustres. La crianza masiva de esta raza Junín es exclusivamente a campo abierto, a base de pastos nativos, sin recurrir a la estabulación, ni a la alimentación suplementaria (Villaroel y Gamarra, 1978).

En el calendario de actividades de la SAIS Tupac Amaru, el empadre es realizado entre los meses de Mayo y Junio, en la época de sequía; la parición ocurre 5 meses después cuando las lluvias recién comienzan, ocurriendo el 85% de los partos en el mes de Octubre y el 15% restante en el mes de Noviembre, en este mes también se realiza el perneo que es el diagnóstico de gestación mediante el baloteo de las borregas y la marcación de los corderos. La esquila se realiza en época de lluvias, entre los meses de Febrero y Marzo, esta actividad es anual y se realiza preferentemente en el mismo mes para que el vellón tenga un crecimiento uniforme en toda la población; es en estos meses donde también se realiza el destete, cuando los corderos tienen una edad promedio de 5 meses. El programa de desparasitaciones consiste en dos dosificaciones antihelmínticas, una en época de lluvias y otra en época de sequía, una dosificación contra distomatosis y un baño de inmersión en Abril (Gamarra, comunicación personal).

2.2. La Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad emergente a nivel mundial. Afecta al ganado y al hombre. En los animales la infección puede ser de tipo subclínica, aguda o crónica. Los signos clínicos de la leptospirosis pueden variar dependiendo del serovar y del animal. Los animales infectados en forma crónica pueden presentar fallas reproductivas como infertilidad, abortos, nacidos muertos o débiles y baja producción de leche. En infecciones agudas los signos clínicos pueden variar según el serovar y la especie animal pero en general pueden presentar fiebre, anemia hemolítica, ictericia, congestión pulmonar, meningitis y muerte (Bolin, 1998; Ochoa et al., 2000). La infección en el hombre es mayormente de

tipo ocupacional y puede también ser de tipo subclínico o en forma ligera pero también aguda caracterizándose por fiebre, dolor de cabeza, dolor muscular, linfadenopatía, meningitis aséptica, hemorragias, ictericia en el 5% a 10% de los casos, etc., dependiendo del serovar involucrado (Levett, 2001).

2.3. Taxonomía y Clasificación

2.3.1. Clasificación serológica

Antes de 1989, el género *Leptospira* fue dividido en 2 especies: *Leptospira interrogans*, comprendiendo a todas las cepas patógenas y *Leptospira biflexa*, conteniendo a todas las cepas saprófitas aisladas del ambiente (Faine, 1982; Johnson, 1984). Ambas *Leptospiras*, *L. interrogans* y *L. biflexa* fueron divididas en numerosos serovares definidos por la aglutinación después de la absorción cruzada que tienen con un antígeno homólogo (Johnson, 1984; Kmety, 1993; Bharti, 2003).

Dentro de *Leptospira interrogans* y *Leptospira biflexa* hay un gran número de tipos serológicos designados como serovares. El serovar es la base taxonómica (Faine, 1982). Dentro de las especies de *Leptospira interrogans* se reconocen más de 200 serovares. Serovares que antigénicamente están relacionados se han agrupado tradicionalmente en serogrupos (Kmety, 1993). Los serovares de *Leptospira interrogans* por conveniencia se agrupan en 24 serogrupos sobre la base de los componentes aglutinantes que comparten (Faine, 1994). Aunque los serogrupos no tienen una taxonomía reconocida, ellos han demostrado ser útiles para la comprensión epidemiológica (Levett, 2001).

2.2.2. Clasificación genotípica

Recientes estudios moleculares han permitido demostrar que la taxonomía del género *Leptospira* es más compleja (Lomar, 2000). La clasificación de

especies del género *Leptospira* esta basado en la secuencia de su ADN. El género es dividido en 17 genomoespecies, y se define como que al menos el 70 % de la secuencia de ADN esté relacionado y que contengan a lo sumo 5% de bases no pareadas (Bharti, 2003).

Las genomoespecies de *Leptospira* no corresponden a las dos especies anteriores (*L. interrogans* y *L. biflexa*), y de hecho, serovares patógenos y no patógenos pueden estar dentro de la misma genomoespecie (Levett, 2001). Más allá, ni serovares ni serogrupos son indicativos de relación taxonómica entre las variedades, puesto que un serovar puede pertenecer a más de una especie y miembros del mismo grupo genético necesariamente no pertenecen al mismo serogrupo (Bharti, 2003). La reclasificación de las leptospiras basada en el genotipo es taxonómicamente correcta y posee un fundamento fuerte para las futuras clasificaciones. (Levett, 2001).

2.4. Biología de la Leptospira

2.4.1. Características morfológicas y bioquímicas

Las Leptospiras son bacterias espiradas (Murray, 1999) o de forma helicoidal flexible (Prescott, 1999), son espiroquetas muy finas fuertemente enrolladas, usualmente de 1 µm por 6 µm (ancho) hasta 0.1 por 20 µm (largo) (Faine, 1999; Lomar, 2000), pero ocasionalmente pueden ser mas largas. La bacteria tiene ganchos en uno o ambos extremos (Murray, 1999) característicos semicirculares (Madigan, 2003), formando un signo de interrogación (Murray, 1999). Las Leptospiras se mueven por medio de dos flagelos periplásmicos anclados en los extremos opuestos de la bacteria (Murray, 1999). Las leptospiras saprófitas (*L. biflexa*) y las leptospiras patógenas (*L. interrogans*) son morfológicamente indistinguibles (Faine, 1982). El lipopolisacárido de las Leptospiras tiene una composición similar al de otras bacterias Gram negativas

(Vinh, 1986; Prescott, 1999), aunque Bharti (2003) dice que posee características tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas.

Las leptospiras tienen una típica estructura de doble membrana, cosa común con otras espiroquetas en que la membrana citoplasmática y el peptidoglicano de la pared celular están estrechamente asociados y están debajo de una membrana externa celular (Prescott, 1999; Haake, 2000) o vaina flexible que contiene lípidos, proteínas e hidratos de carbono (Prescott, 1999). El citoplasma de las *Leptospiras* contiene material nuclear, ribosomas, mesosomas y cuerpos de inclusión (Faine, 1982).

La apariencia y motilidad de las leptospiras varía con la naturaleza del medio en el cual se desarrollan. Su patrón único de motilidad se debe a una estructura morfológica inusual denominada filamento axial (Prescott, 1999). Tres tipos de movimiento son posibles: rotación alrededor de un eje central, movimiento progresivo en dirección recta y movimientos circulares (Bharti, 2003). Cuando establecen contacto con una superficie sólida, presentan movimientos reptantes o de arrastre (Prescott, 1999).

Las leptospiras son demasiado delgadas para ser vistas por un microscopio ordinario; un microscopio de campo oscuro es el usualmente utilizado para observarlas (Faine, 1982; Prescott, 1999).

2.4.2. Características moleculares

Las leptospiras están filogenéticamente relacionadas a otras espiroquetas (Paster *et al.*, 1991). El genoma de las leptospiras consiste en 2 cromosomas circulares cuya secuencia entera ha sido recientemente establecida (Bharti, 2003). Dicho genoma pesa aproximadamente 5 000-kb, el mayor con 4 400-kb, y el más pequeño con 350-kb (Levett, 2001). El genoma es largo comparado con otras espiroquetas tal como el *Treponema sp* y *Borrelia sp*, lo cual indica la habilidad de *Leptospira sp* para vivir en diversos ambientes: hospederos animales y libremente en el ambiente. (Bharti, 2003).

La membrana externa de las leptospiras contiene LPS (lipopolisacárido) (Haake, 2000). Solo unas pocas proteínas de membrana externa leptospirales han sido caracterizadas en detalle, incluyendo una porina OmppL1 y dos lipoproteínas, LipL36 y LipL41. El LPS es altamente inmunogénico y es responsable de la especificidad del serovar (Levett, 2001). La clasificación de *Leptospira sp* basado en el serovar depende de la diversidad en la estructura de los componentes de superficie expuestos del lipopolisacárido LPS; además el LPS leptospiral explica la capacidad de aglutinarse, opsonizarse con los anticuerpos protectivos en ratones y hámsters (Peña-Monctezuma, 1999).

2.4.3. Características de cultivo

Las Leptospiras son aerobios estrictos, con un crecimiento óptimo a temperatura de 28° a 30° C (Levett, 2001), catalasa y oxidasa positivas y requieren un pH de 6.8 a 7.4 (Bharti, 2003). Utilizan ácidos grasos de cadena larga (como por ejemplo el ácido oleico) como fuente de carbono y son metabolizados por β -oxidación (Levett, 2001; Madigan, 2003); así mismo utilizan vitaminas B2 y B12 como factores de crecimiento (Jhonson, 1984). Las sales de amonio son una fuente efectiva de nitrógeno para la bacteria (Faine, 1982).

Los tipos de medios de cultivo usados para el aislamiento de *Leptospira sp* son medios enriquecidos con suero de conejo o albúmina sérica de bovino y libre de otras proteínas (Faine, 1982). Varios medios conteniendo suero de conejo han sido descritos por Fletcher, Korthoff, Noguchi y Stuart (Levett, 2001). El medio más ampliamente usado en la práctica actual es el basado en el medio ácido-albúmina oleico (EMJH: Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) que contiene 1% de seroalbúmina bovina y Tween 80 que es una fuente de ácidos graso de cadena larga (Levett, 2001, Bharti, 2003). El crecimiento de contaminantes puede ser inhibido con la adición de 5-fluoracilo (Johnson, 1984) que es el antibiótico más comúnmente usado, aunque algún reporte demuestra que altas concentraciones de este inhibidor podría afectar el crecimiento de *Leptospira shermani* (Cisneros, 1994). Así mismo se reporta también el uso de neomicina,

polimixina B, rifampicina y vancomicina como inhibidores de crecimiento de contaminantes (Bharti, 2003).

El crecimiento de las leptospiras generalmente es lento en el aislamiento primario (Faine, 1999), pero cuando son cultivadas en un medio convenientemente aireado y a 30°C, su tiempo de generación varía entre 7 y 12 horas y rendimientos de 6 a 8 x 10⁹ células por mililitro pueden ser obtenidos (Faine, 1982). El cultivo de las leptospiras puede ser mantenido por subcultivo repetido o preferentemente por almacenamiento en agar semisólido que contenga hemoglobina; y se retienen hasta 13 semanas antes de ser descartados. Sin embargo las leptospiras pueden sobrevivir ininterrumpidamente en medio líquido por meses, algunas veces por años (Faine, 1999).

2.5. Epidemiología y epizootiología

Se presume que la leptospirosis es la zoonosis más diseminada en el mundo (WHO, 1999). Se considera una enfermedad reemergente de distribución mundial, con comportamiento endémico y con brotes en varios continentes (Ochoa *et al.*, 2000). El hombre y los animales domésticos son las especies mayormente envueltas en leptospirosis, pero la mayoría de los animales (tanto domésticos como salvajes) son reservorios y generalmente pertenecen al grupo de los roedores (Michel, 2002). La distribución mundial de la leptospirosis se ve reflejada en la habilidad del organismo para infectar a la mayoría de animales de sangre caliente. La distribución regional de serovares específicos y prevalencia de infección refleja los patrones migratorios de los mamíferos salvajes transportadores y las condiciones ambientales (Wohl, 1996).

2.5.1. Medio ambiente

La leptospirosis es noticia en todas partes del mundo, pero la incidencia más alta se tiene en países tropicales (Michel, 2002; Acha, 2003), como en

Latinoamérica, India, el Sur de Asia Oriental; donde hay grandes precipitaciones pluviales y el suelo es neutro o alcalino (Acha, 2003); pero incluso existe en áreas templadas como la Unión Europea y Japón, con una menor extensión (Michel, 2002). La infección humana también puede ocurrir en países desarrollados e industrializados (Bharti, 2003). La enfermedad es estacional, con picos de incidencia en verano y otoño en áreas templadas, donde la temperatura es el factor limitante para la supervivencia de las leptospiras; y durante la estación lluviosa en regiones de clima caluroso (Faine, 1982; Levett, 2001). Fenómenos ambientales como el fenómeno del Niño pueden modificar las condiciones epidemiológicas de la transmisión de la leptospirosis (Michel, 2002).

Hay serovares universales como por ejemplo *L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* y serovar *canicola*; y también hay serovares que se presentan sólo en determinadas regiones. Cada región se caracteriza por los serotipos que contiene, determinados por su ecología (Acha, 2003). Es probable que la gran distribución de la especie *Leptospira* refleje su habilidad para sobrevivir en diversas condiciones ambientales y se deba a su adaptación genética, la cual es reflejada en la plasticidad del genoma leptospiral (Haake *et al.*, 2000).

2.5.2. En el hombre

Los hombres son huéspedes accidentales de la infección leptospiral (Ochoa *et al.*, 2000). La infección de los humanos con leptospiras resulta primariamente de la exposición directa o indirecta con la orina de animales infectados. Otro modo de contagio: el manejo de tejido de animales infectados, mordeduras de animales e ingestión de comida o agua contaminada, son de menor importancia. Un paciente con leptospirosis representa un riesgo menor para otra persona. La transmisión de leptospirosis de persona a persona es extremadamente rara (Faine, 1982). El contagio durante el contacto sexual ha sido reportado (Levett, 2001). Un caso de transmisión por la leche materna se describió en los Estados Unidos (Acha, 2003).

Las leptospiras pueden ser transmitidas a través de cortes en la piel, incluso arañazos pequeños y a través de membranas mucosas de boca, nariz y ojos. Los organismos también pueden penetrar la piel cuando está inmersa en agua por largo tiempo (Faine, 1982). La inhalación de agua o aerosoles también puede resultar en infección vía la membrana mucosa del tracto respiratorio (Levett, 2001).

La leptospirosis es un riesgo ocupacional para cultivadores de arroz, pescadores, camaleros (Michel, 2002; Acha, 2003). La crianza de ganado es uno de los principales factores de riesgo ocupacionales en todo el mundo. Agricultores que trabajan manualmente presentan mas casos de leptospirosis que cualquier otro grupo ocupacional especialmente los cultivadores de arroz que pasan largo tiempo en campos inmersos en agua (Faine, 1982). Actividades como la pesca, la natación, la caza también son un factor de riesgo. El factor de riesgo para los humanos en el hogar lo constituyen los roedores e incluso los perros (Michel, 2002). Mineros, veterinarios, laboratoristas, albañiles, militares son también ocupaciones riesgosas para la leptospirosis (Faine, 1982; Acha, 2003). Los ovinos infectados son un riesgo potencial zoonótico para trabajadores de mataderos, pastores de ovejas y los esquiladores que no se habían considerado anteriormente (Acha, 2003). La relativa importancia del riesgo ocupacional ha decrecido desde que medidas de protección han sido implementadas (Bharti, 2003).

Personas de todas las edades y sexos son susceptibles de infección; hombres adultos, sin embargo, son más frecuentemente infectados porque ellos tienden a tener trabajos de alto riesgo (Faine, 1982). La mortalidad es alrededor del 10% de los pacientes, pero pueden presentarse 23.6% en países como Barbados, una isla caribeña (WHO, 1999).

2.5.3. Los animales

La infección es común en roedores y otros mamíferos silvestres y domésticos; se presenta en al menos 160 especies de mamíferos (Acha, 2003).

Los mamíferos pequeños son el principal reservorio de leptospiras patógenas (Tremi, 2002). Los roedores representan un riesgo de infección tanto para humanos como para animales (Vanasco, 2001). Varias asociaciones hospedador-serovar parecen ser ubicuos, por ejemplo la especie *Rattus* y el serovar *icterohaemorrhagiae*, los ratones con el serogrupo *ballum* (Bharti, 2003); los ratones del campo y *grippotyphosa* (Faine, 1982). Estos reservorios animales son responsables de la formación y persistencia de focos endémicos de leptospirosis en áreas específicas (Tremi, 2002).

Los animales pueden ser divididos en hospederos de mantenimiento y hospederos accidentales (incluso el hombre), la enfermedad se mantiene en la naturaleza por infección crónica de los túbulos renales en los hospederos de mantenimiento (Levett, 2001).

Un hospedador de mantenimiento se define como una especie en que la infección es endémica y normalmente se transfiere de un animal a otro por contacto directo. La infección se adquiere normalmente a una edad temprana, y el predominio de excreción crónica en la orina aumenta con la edad del animal. Otros animales (como los humanos) puede infectarse por contacto indirecto con el hospedador de mantenimiento. Los animales pueden ser hospedadores de mantenimiento de algunos serovares pero hospedadores accidentales de otros, infección que puede causar enfermedad severa o fatal. (Bolin, 2000). Cada serovariedad está adaptada a un huésped de mantenimiento en particular, aunque pueden causar enfermedad en cualquier especie de mamíferos (Acha, 2003).

La leptospirosis en los animales silvestres no es peligrosa tanto por el riesgo de transmisión directa al hombre o las especies domésticas, sino porque esos animales actúan como portadores y diseminan en el ambiente leptospiras virulentas. Estos diseminadores pueden ser huéspedes temporarios o fortuitos, o reservorios portadores crónicos y persistentes (Argento, 1994).

Reptiles y anfibios (tortugas, serpientes, sapos y ranas) pueden ser infectados, pero ellos (junto a aves e insectos) generalmente no se reconocen de ser de importancia directa en la epidemiología de la leptospirosis humana, aunque se cree que los sapos son importantes en el Caribe (Faine, 1999).

2.6. Patogenia

El entendimiento de los mecanismos de patogénesis de leptospirosis es limitado (Levett, 2001; Bharti, 2003). La entrada de la bacteria en el organismo animal se produce a través de las abrasiones cutáneas o de las mucosas del revestimiento de boca, nariz y ojos después de que el hospedador es expuesto a agua contaminada, a orina o a la carcasa de un animal infectado (Faine, 1982; Acha, 2003). Wohl (1996) indica que la transmisión venérea y transplacentaria también puede ocurrir.

Las leptospiras virulentas han demostrado tener quimiotaxis contra la hemoglobina. Yuri en 1993, demuestra que las leptospiras virulentas reconocen la hemoglobina en la superficie del agua, el cual es el hábitat más común de las leptospiras, alcanzando los cortes y abrasiones de la piel (quizás ascendiendo un gradiente de hemoglobina) e invaden el cuerpo de los humanos y animales.

Las leptospiras se diseminan inmediatamente vía el torrente sanguíneo. Las leptospiras avirulentas no se multiplican en el cuerpo y son removidas dentro de uno o dos días de la infección, mientras que los organismos virulentos se multiplican hasta que son opsonizados y fagocitados, es en esta fase cuando se aglutinan con los anticuerpos y sólo es perceptible por las pruebas de aglutinación microscópicas, entonces ellos son removidos rápidamente por el sistema retículo endotelial. Si un animal está gestando, el feto o fetos puede ser infectados (Faine, 1982).

Un mecanismo de virulencia es la motilidad y la habilidad de *Leptospira* para nadar a través de medios viscosos. La motilidad es importante probablemente en la infección inicial y en la diseminación del organismo desde el sitio de entrada hasta los sitios de daño de órganos tal como el pulmón, hígado, riñón, ojo y cerebro (Bharti, 2003). En concordancia con la habilidad de migrar hacia los tejidos de los hospedadores, las leptospiras tienen un rango de factores de virulencia potenciales que pueden facilitar este proceso (Bharti, 2003).

Las leptospiras han demostrado adherirse a las células epiteliales. Las leptospiras virulentas se adhieren a células epiteliales renales *in vitro*, y la adhesión se refuerza por concentraciones subaglutinantes de anticuerpos homólogos. Las leptospiras son fagocitadas por macrófagos en la presencia de anticuerpos específicos. La inhibición de actividad del macrófago aumenta la sensibilidad a la infección. Se asocian las leptospiras virulentas a los neutrófilos, pero no son muertas. La fagocitosis ocurre sólo en presencia de suero y complemento, sugiriendo que la envoltura externa de las leptospiras posee un componente antifagocítico. El LPS leptospiral estimula la adherencia de neutrófilos a las células endoteliales y plaquetas, causando agregación y sugiriendo un rol en el desarrollo de trombocitopenia (Mitchinson, 1991).

2.7. Inmunología

El mecanismo de defensa inmune del hospedero en leptospirosis es principalmente humoral con producción de anticuerpos específicos, primariamente para los antígenos de cubierta exterior (Levett, 2001). Los antígenos de cubierta exterior de las leptospiras son probablemente la superficie expuesta y pueden llegar a jugar un papel importante en la estimulación y respuesta inmune (Alves, 1999). Los estudios de Anderson *et al.* en 1968 proporcionaron evidencia que componentes de superficie son el objetivo primario de la vía clásica de activación de complemento. *In vitro*, investigaciones han mostrado que los anticuerpos tienen actividad bactericida directa sobre las leptospiras en presencia de complemento

(Levett, 2001), y *in vivo* este mecanismo es facilitado por el reclutamiento de células fagocíticas (Vinh, 1982).

Las leptospiras virulentas pueden sobrevivir evadiendo la fagocitosis y son aisladas de sangre durante la primera semana de la enfermedad, en contraparte las leptospiras avirulentas son rápidamente limpiadas; las leptospiras virulentas inducen apoptosis *in vivo* y *in vitro*. En ratones la apoptosis de linfocitos es iniciada por LPS vía la inducción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Merien *et al*, 1995).

2.8. Signos clínicos

La mayoría de las leptospirosis son subclínicas y la infección es más común que la enfermedad clínica. Los signos clínicos asociados con leptospirosis varían y dependen del serovar y del hospedador. En hospederos de mantenimiento, la leptospirosis es generalmente caracterizada por una pobre respuesta serológica, signos clínicos agudos relativamente leves y un prolongado estado de portador renal el cual puede ser asociado con enfermedad renal crónica (Bolin, 1998).

Son muy pocos los estudios que relacionan signos clínicos de la leptospirosis ovina. La gran mayoría de veces los signos clínicos pueden pasar desapercibidos o requerir la ejecución de exámenes de laboratorio para esclarecer la sospecha de infección (Barbudo, 1999). Herrmann *et al.* (2004), considera que los ovinos son los animales domésticos menos susceptibles, no obstante, sufren la infección por leptospiras patógenas y en muchos casos la evolución es asintomática, pudiendo a veces ocurrir brotes de enfermedad con aborto y muerte de corderos.

Como en otras especies de rumiantes, en los ovinos la leptospirosis se caracteriza por fiebre, anorexia y en algunos animales por ictericia, hemoglobinuria, anemia, abortos, nacimientos de animales muertos o débiles e

infertilidad (Acha, 2003). También existen informes que relacionan a *Leptospira hardjo* con agalactia en ovejas (Sánchez Mejorada, 1988; Faine, 1982).

En la fase aguda de leptospirosis de ovejas y cabras, hay anorexia, depresión, elevación de la temperatura en 0.5 – 2°C, y polipnea. La respuesta febril aparece entre 4 a 6 días después de la exposición y dura por 4 a 5 días. La leptospiremia es detectable durante 5 a 8 días después de la exposición, cuando el organismo puede ser encontrado en varios tejidos. Una marcada reducción en la concentración de hemoglobina y en el valor del hematocrito puede ser notado. El suero profundamente rojo indica anemia hemolítica. La orina puede estar color vino. El máximo de destrucción de células rojas es observado durante 7 a 12 días después de la exposición (Faine, 1982).

La ictericia puede ocurrir debido a la combinación de hemólisis intravascular y daño hepático. En bovinos, ovinos y equinos, la ictericia se debe sobre todo a hemólisis intravascular por hemolisinas de origen bacteriano (Faine, 1982). La deshidratación resulta de la falta de consumo oral de agua y el incremento de pérdidas a través de túbulos renales dañados, incremento de la permeabilidad vascular, vómitos y diarrea (Wohl, 1996).

El aborto, los nacidos muertos y mastitis en animales en lactación ocurre tarde en el estadio agudo. La localización del agente en el útero gestante da lugar a abortos que constituyen el signo más prominente en rumiantes y cerdos (Faine, 1982). La infección crónica esta esencialmente localizada en los riñones y puede ocurrir en animales que han pasado por el estado agudo con o sin evidencia clínica detectable; sólo pueden ser detectados por pruebas de laboratorio (Faine, 1982).

En un estudio experimental en el cual se evaluó la patogénesis del serovar *pomona* y el serovar *hardjo* en 14 ovejas en lactación, los signos clínicos de infección leptospiral fueron moderados, caracterizados por fiebre y disminución de la producción láctea en algunos animales (Tripathy *et al.*, 1985).

2.9. Lesiones

Según el serovar de leptospira y el huésped afectado las lesiones pueden variar en intensidad y extensión (Figuroa, 1984). Los animales que murieron durante la fase aguda de la enfermedad están usualmente en buena condición pero muestran un variable grado de ictericia (notable especialmente en la esclerótica, en las partes visibles de las membranas mucosas y en la grasa corporal). En los casos subagudos y crónicos, la totalidad de los cambios son confinados a los riñones y es característico el desarrollo de manchas blancas (1 a 5 mm de diámetro) (Faine, 1982).

El hígado puede estar aumentado de tamaño y friable, con pequeñas áreas de necrosis focal. En la mucosa del abomaso pueden encontrarse úlceras y hemorragias. En los pulmones puede haber edema y enfisema. Los riñones están aumentados de tamaño y se observa un moteado marrón rojizo de la corteza (Figuroa, 1984), el color rojizo es debido a la hemoglobina que los tiñe. En los casos crónicos la corteza renal presenta gran cantidad de focos fibróticos blancos (Figuroa, 1984). Dentro de los hallazgos más frecuentes e importantes en ruminantes están el edema pulmonar, tumefacción hepática y colestasis (Faine, 1982).

Dentro de las lesiones a nivel histopatológico, en los riñones es frecuente encontrar una inflamación local con ligera cicatrización y algunas células linfocitares. Las leptospiras en el riñón causa nefritis intersticial, habiendo hiperemia, edema, tumefacción endotelial e infiltración por linfocitos y células plasmáticas (Faine, 1982). Esta nefritis puede ser aguda o crónica y multifocal o generalizada, dependiendo de la intensidad del daño y de la eficacia de respuesta del huésped (Acha, 2003). La vasculitis y la inflamación de los túbulos renales son atribuidas a la replicación de los organismos (Wohl, 1996).

En vacas las lesiones asociadas con abortos y nacidos muertos consisten predominantemente en edema del tejido placentario con algunos focos de necrosis del cotiledón; en ovejas infectadas experimentalmente, los cambios endometriales

están caracterizados por vacuolización moderada de la superficie del epitelio (Faine, 1982).

2.10. Impacto económico

La infección por *Leptospira* en bovinos es importante por las pérdidas económicas que generan los problemas reproductivos (Alves, 1999; Ochoa *et al.*, 2000) y la bajada de la producción de leche (Alves, 1999). En Venezuela, en 1980, se verificó que 40.8% de 1526 abortos bovinos eran atribuibles a la leptospirosis, y en Irlanda, en 1982 el serotipo *hardjo* se asoció con 49.7% de 348 abortos bovinos (Ochoa *et al.*, 2000). El índice de mortalidad en los terneros es mucho mayor que en el ganado adulto. Un porcentaje elevado de abortos (hasta el 30% y una pérdida de la producción de leche son las causas principales de pérdida (Acha, 2003).

2.11. Diagnóstico

El diagnóstico de leptospirosis, basado sólo en signos clínicos, es difícil porque estos signos no son patognomónicos en el hombre y varían grandemente en todos los animales domésticos, por consiguiente, un diagnóstico es dependiente de una evaluación individual e historial del rebaño, signos clínicos, lesiones y hallazgos de laboratorio (Faine, 1982).

La serología ha sido por mucho tiempo el método más aceptado para diagnosticar la leptospirosis (LeFebvre, 1987). Existe un gran número de pruebas serológicas que son usadas en el diagnóstico de leptospirosis, cada una tiene su propia sensibilidad y especificidad. La prueba de aglutinación microscópica (MAT) y la prueba de ELISA son las pruebas más comúnmente usadas, sin embargo el MAT desarrollado por Martin y Petit en 1918, permanece como el método de referencia (WHO, 2003).

La prueba de aglutinación microscópica (MAT) es la prueba recomendada para el diagnóstico serológico de leptospirosis y la más sensible y específica si se usan los serotipos apropiados (Merien, 1995), es usada para detectar anticuerpos y medir sus títulos, puede detectar tanto Ig M como Ig G. El método es simple y consiste en mezclar el suero problema con un cultivo de leptospiras y evaluar entonces el grado de aglutinación, para lo cual se usa un microscopio de campo oscuro (WHO, 2003). En la realización de la prueba se deben incluir serovares representativos de los diferentes serogrupos y especialmente los que se presenten en la región (Acha, 2003). El hallazgo de títulos altos de anticuerpos en varios animales del rebaño y una sintomatología clínica compatible con leptospirosis indican una infección reciente (Acha, 2003). Los anticuerpos pueden ser detectables ya en 6 días después del alcance de infección, con un máximo de 2 a 3 semanas. Los títulos de anticuerpos pueden persistir por períodos variables, tanto como tres meses o más (Faine, 1982). Existen trabajos que relatan se podría detectar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* en el suero de la leche usando el MAT, pero esto podría estar influenciado por la fase de lactación, inflamación de la glándula mamaria, número de lactación, stress, etc. (Lacerda, 2002).

La prueba de ELISA es una prueba muy sensible y específica para el diagnóstico biológico de leptospirosis. Es de valor particular como una prueba de “screening” serológico debido a su simplicidad relativa comparado con el MAT. ELISA puede ser usada en los estudios epidemiológicos para determinar la seroincidencia/seroprevalencia de leptospirosis (WHO, 2003).

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) detecta de forma rápida un pequeño número de leptospiras en muestras clínicas de sangre y orina, es principalmente usado en humanos para el diagnóstico temprano de la enfermedad (Levett, 2001).

El diagnóstico definitivo puede llevarse a cabo por aislamiento de la espiroqueta infectante de sangre, orina o tejidos; pero requiere de medios

especiales y tiempos prolongados de incubación, además no se realiza a menudo (Levett, 2002). Las leptospiras están presentes en sangre durante los primeros días de enfermedad. La leptospira puede ser satisfactoriamente aislado de fetos abortados (WHO, 2003). Tejidos obtenidos de la necropsia, como hígado y riñones (en casos agudos), y riñones (en transportadores crónicos) pueden ser examinados para leptosirosis por cultivo, inmunofluorescencia o tinción con plata (Faine, 1982).

El aislamiento de leptospiras usando animales experimentales como el cobayo (150 a 175 gramos) y el hámster dorado (4 – 6 semanas de edad) es llevado a cabo inoculándoles a éstos sangre u orina; el éxito varía según la susceptibilidad de los animales y depende del serovar y patogenicidad relativa de la leptospira (WHO, 2003). Muestras de orina son la fuente más apropiada de la cual se aíslan leptospiras tanto para cultivo como para inoculación de animales (Faine, 1982).

2.12. Tratamiento

Las posibilidades de intervención han sido estudiadas y se dispone de tratamiento para seres humanos y animales de profilaxis con antibióticos (Ochoa *et al.*, 2000). Muy poca información ha sido publicada acerca de quimioterapia en infección aguda de ovejas y cabras, el mismo régimen usado en vacas y cerdos puede ser empleado (Faine, 1982). Animales con leptosirosis aguda pueden ser tratados con estreptomycin (12.5 mg por kilo de peso, dos veces al día por tres días) o tetraciclina (10 a 15 mg por kilo dos veces al día por tres o cinco días) (Bolin, 1998). Se ha podido demostrar que una sola inyección de dihidroestreptomycin, a razón de 25 mg/Kg. de peso vivo, es eficaz contra la leptospirosis en bovinos y cerdos (Acha, 2003). La resistencia de la leptosirosis a las drogas aparece muy raramente (Faine, 1982).

2.13. Control

Las medidas preventivas y de control están orientadas a reducir la exposición de los hospederos, vacunación y tratamiento selectivo (Bolin, 1998).

Figuroa (1984), enumera las siguientes medidas de saneamiento como complemento de la terapia y vacunación:

- Drenar las aguas acumuladas y estancadas.
- Realizar un efectivo control de roedores.
- Tratamiento adecuado de aguas residuales.
- Almacenamiento adecuado de los alimentos.

Según Malajov y Alejin (1989), la lucha contra la leptospirosis animal se realiza en las siguientes direcciones: prevenir la infección leptospirósica de zonas no afectadas o la penetración de nuevos serovares en zonas donde éstos no habitan, sanear las unidades insalubres y proteger las personas contra la infección. La protección de zonas no afectadas abarca: realizar pruebas serológicas planificadas a los animales, especialmente a los reproductores, aplicar cuarentena a todos los animales que entran a la granja e investigarlos con sueros pareados, vacunar en el período de cuarentena a los nuevos ingresos y a toda la masa periódicamente, excluir el contacto con fuentes probables de infección como otros animales domésticos y salvajes o depósitos de agua a cielo abierto, investigar flora autóctona y aplicar medidas periódicas de saneamiento ambiental. Para prevenir el contagio humano en sectores de riesgo se recomienda planes educativos (descripción del agente, vías de transmisión, síntomas y métodos de prevención personal), utilización de antisépticos, medios de higiene personal y utilización de ropa especial en las personas en contacto directo con fuentes de infección en animales domésticos y la lucha contra reservorios y vacunación a poblaciones en alto riesgo.

En el control de los roedores (ya que su eliminación de los campos en la vida salvaje es imposible) Faine (1982), recomienda el uso de venenos como el

fosforo de zinc, el fosfato de talio. Además el uso de sus enemigos naturales, tal como zorros, halcones, búhos, serpientes, por lo que recomienda su conservación y preservación. Se recomienda la poda de gras, seguido del quemado de éste ya que reduce la población de roedores temporalmente. Así mismo se menciona a la quimioterapia de animales y medio ambiente como medida preventiva, el aislamiento y tratamiento de animales seropositivos a leptospirosis, y la inmunización de animales domésticos.

2.14. Vacunación

El control por inmunización de animales y personas es potencialmente posible (Levett, 2001). La inmunidad es predominantemente serovar – específica, y es necesario conocer el serovar o serovares que actúan en un foco para poder inmunizar en forma correcta los animales (Acha, 2003). Estudios inmunológicos han demostrado que las bacterinas leptospirales inducen una razonable producción de anticuerpos por un período de al menos 6 meses (Faine, 1982). Actualmente, una vacuna de bacterina es usada extensivamente para la inmunización de ganado y mascotas (Alves, 1999).

La vacunación de animales puede prevenir la enfermedad pero no la leptospirosis y la transmisión a humanos puede ocurrir (Bharti, 2003), es decir provee baja protección en prevenir la infección renal (Alves, 1999); sin embargo esta leptospirosis dura menos que en animales no vacunados (Acha, 2003). En vacas se recomienda la primera inmunización con 2 ó 3 vacunaciones mensuales antes de salir preñadas y otro booster a media gestación de la primera preñez. Las bacterinas producen inmunidad de corta duración (al menos unos cuantos meses) para el control de la enfermedad clínica, boosters de dos veces al año son recomendados para rebaños en áreas donde la infección es enzoótica o rebaños en los cuales la leptospirosis ha sido diagnosticada (Larson, 1996).

En seres humanos se encuentra licenciada en Francia una vacuna monovalente con el serovar *icterohaemorrhagiae* y en Cuba se ha desarrollado una

vacuna que contiene los serovares *icterohaemorrhagiae*, *canicola* y *pomona* (Levett, 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar del estudio

Las unidades de producción comprendidas en este estudio fueron Casaracra, que esta situada en las provincias de Tarma y Yauli en el distrito de Lloclepampa, abarcando una extensión de 41 906.70 Has; y la unidad de producción de Consac, situado en la provincia de Jauja, distrito de Lloclepampa, con una extensión de 33 787.80 Has. (Oficina de la SAIS Tupac Amaru en Lima, datos no publicados).

3.2. Animales

Las borregas consideradas en el estudio fueron de las comunidades Consac y Casaracra aprovechando la actividad del perneo de noviembre (2003). Todos los animales evaluados fueron de la raza Junín.

Previo a la toma de muestras los animales se separaron en el grupo **CASO**: aquellas borregas que tuvieron problemas reproductivos, como las que abortaron, que quedaron vacías después del empadre por primera vez (vacías simples) y borregas que quedaron vacías después de su segundo empadre (vacías dobles); y en el grupo **CONTROL** aquellas borregas que estuvieron aparentemente sin problemas reproductivos.

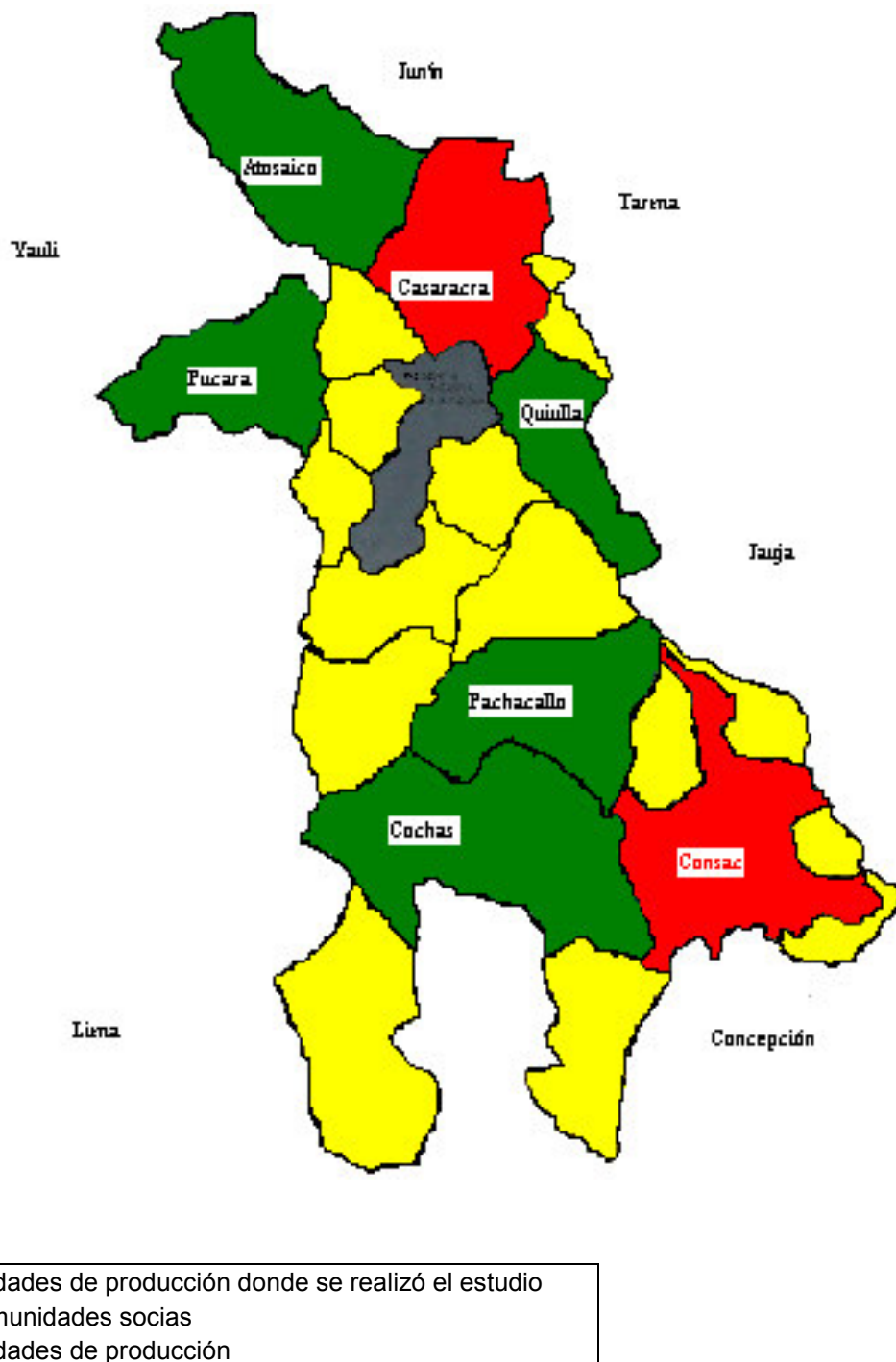


Figura 1. Mapa Conjunto de las Unidades de Producción y Comunidades Socias de la SAIS Tupac Amaru N° 1- Pachacayo. (Fuente: SAIS Tupac Amaru).

3.3. Materiales

Los materiales utilizados para la detección de anticuerpos contra *Leptospira sp.* fueron: tubos al vacío de 5 ml, agujas de doble salida N° 21G x 1½, viales de 3 ml, pipetas descartables de 2ml, micropipetas de 5-50 µL, centrífuga de 5 000 rpm, estufa de 37°C, placas de 96 pocitos, guantes estériles, solución fisiológica, aceite de inmersión, papel para lente de microscopio, láminas portaobjeto, microscopio de campo oscuro, flujo laminar, solución salina tamponada y antígeno de *Leptospira interrogans* (leptospiras vivas).

3.4. Diseño estadístico

3.4.1. Tamaño muestral

El tamaño de muestra fue obtenido según el método de **caso-control no pareado** usando el programa Win episcopo 2.0, según la fórmula de Schlesselmann:

$$n = \frac{\left(Z(a) \sqrt{\left(1 + \frac{1}{c}\right) p_m (1 - p_m)} + Z(b) \sqrt{p_1 (1 - p_1) + \frac{(p_1 - p_0)^2}{c}} \right)^2}{(p_1 - p_0)^2}$$

Siendo:

$$p_1 = \frac{p_0 \cdot RR}{1 + p_0 (RR - 1)} \quad p_m = \frac{p_1 + c \cdot p_0}{1 + c}$$

Donde:

- **Z(a)** es el valor de la t de Student para el nivel de confianza del 95%.
- **Z(b)** es el valor de la t de Student para una potencia de 80%.

- **p0** es la proporción esperada de exposición entre los sanos (controles), en este caso 15%.
- **p1** es la proporción esperada de exposición entre los enfermos (casos).
- **pm** es la proporción esperada de exposición en la población (enferma y sana).
- **1-pm** es la proporción esperada de no expuestos en la población.
- **c** es la relación esperada entre enfermos y sanos: (1 a 1).
- OR es el *Odds Ratio* estimado de suficiente importancia: 2.

Obteniéndose 414 como número mínimo de muestras de las cuales 207 muestras son del grupo **CASO** y 207 muestras son del grupo **CONTROL**.

3.5. Toma de muestras

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena cefálica en tubos vacutainer[®] de 5 cm³. Las muestras fueron identificadas y transportadas adecuadamente al laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) para su procesamiento. En el laboratorio todas las muestras fueron centrifugadas para obtener el suero y fueron guardadas a -20°C hasta el momento de realizar la prueba diagnóstica.

3.6. Determinación de anticuerpos

Los anticuerpos contra *Leptospira sp.* fueron determinados mediante la prueba de aglutinación microscópica, utilizando 8 serovares – antígeno vivos de 7 días de desarrollo a 28°C cultivados en medio EMCJ. Los serovares de *L. sp.* usados fueron: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. hardjo*, *L. grippotyphosa*, *L.*

canicola, *L. wolfii*, *L. ballum* y *L. bratislava*. Brevemente la prueba consistió (Protocolo del Laboratorio de virología de la FMV - UNMSM):

1. Los sueros se pusieron a temperatura ambiente (24 °C aproximadamente).
2. Se hicieron diluciones de los sueros de 1/50 en solución fisiológica estéril.
3. En una microplaca de 96 hoyos se realizó la prueba de MAT tamiz, enfrentándose el suero diluido 1/100 con cada antígeno de *Leptospira*.
4. Luego las muestras que fueron positivas a 1/100 fueron diluidas para determinar el título de anticuerpos.
5. Se incubó a 37°C durante 1 hora en la estufa y luego se hizo la lectura en microscopio de campo oscuro.
6. Lectura: Según descripciones de interpretación de la prueba (AAVLD, 1994), se consideró la aglutinación del 50% de las leptospiras para ser consideradas como una reacción positiva en diluciones $\geq 1:100$ (AAVLD, 1994). El título del suero fue la dilución más alta en donde se observó la aglutinación del 50% de las leptospiras.

3.7. Análisis de los datos

Primero se estandarizó la edad de los animales para determinar si existe diferencia estadística significativa. Segundo, las variables cualitativas fueron sometidas a un análisis mediante la prueba de Chi cuadrado para determinar si existía asociación entre borregas seropositivas a *Leptospira sp.* y la presentación de problemas reproductivos, mediante el software STATA®.

IV. RESULTADOS

Los resultados de seropositividad a la *Leptospira sp.* en los animales de los grupos Caso y Control se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Presencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* en borregas según grupo de estudio. 2003

Grupo	N° animales		%
	muestreados	seropositivos	
Caso	220	63	28.64 %
Control	220	46	20.91 %
TOTAL	440	109	24.77 %

Análisis Estadístico

El análisis de los resultados mediante la prueba Chi cuadrado indicó que no existe correlación significativa estadísticamente, entre las variables presencia de anticuerpos y presentación de problemas reproductivos.

Las borregas con problemas reproductivos de ambas zonas de estudio presentaron similares porcentajes de animales seroreactores a *Leptospira sp.* (Cuadro 2)

Cuadro 2. Presencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* en borregas con problemas reproductivos. 2003

Tipo de problema reproductivo	N° animales	Positivos a anticuerpos /zona			
		Consac	Casaracra	Total	%
Abortos	133	16	18	34	25.56 %
Vacías simples	34	11	2	13	38.24 %
Vacías dobles	53	11	5	16	30.19 %
TOTAL	220	38	25	63	28.64 %

El porcentaje de animales seroreactores fueron similares en las borregas según su procedencia. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Presencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* en borregas según lugar de procedencia. 2003

Procedencia	N° Animales	Animales con anticuerpos	
		N°	%
Consac	242	66	27.27 %
Casaracra	198	43	21.71 %
TOTAL	440	109	24.77 %

La seropositividad a los diferentes serovares de *Leptospira sp.* fluctuaron entre 0 a 42.2%. (Cuadro 4).

Cuadro 4. Borregas seroreactoras a 8 serovares de *Leptospira sp.* (n =109). 2003

Animales positivos	% Seropositividad	Serovar de <i>Leptospira</i> usado
5	4.59%	<i>pomona</i>
0	0%	<i>hardjo</i>
1	0.92%	<i>canicola</i>
34	31.19%	<i>icterohaemorrhagiae</i>
3	2.75%	<i>grippotyphosa</i>
0	0%	<i>wolffi</i>
45	41.28%	<i>ballum</i>
0	0%	<i>bratislava</i>
16	14.68%	<i>icterohaemorrhagiae + ballum</i>
3	2.75%	<i>pomona + ballum</i>
1	0.92%	<i>wolffi+ grippotyphosa</i>
1	0.92%	<i>icterohaemorrhagiae+ canicola + ballum</i>
109		100%

En el Cuadro 5 y 6 se presentan la distribución de los títulos de anticuerpos contra los diversos serovares de *Leptospira sp.* en el grupo Caso y Control respectivamente.

Cuadro 5. Títulos de anticuerpos entre serovares de *Leptospira sp.* en borregas seroreactoras del grupo CASO (n =63). 2003.

Serovares <i>Leptospira sp</i>	Número positivos	Porcentaje positivos	1/100	1/200	1/400	1/800	1/3200
<i>pomona</i>	5	7.94%	4	0	0	1	0
<i>hardjo</i>	0	0%	0	0	0	0	0
<i>canicola</i>	1	1.59%	1	0	0	0	0
<i>icterohaemorrhagiae</i>	14	22.23%	7	7	0	0	0
<i>grippotyphosa</i>	3	4.76%	1	1	0	1	1
<i>wolffi</i>	0	0%	0	0	0	0	0
<i>ballum</i>	25	39.68%	9	10	4	1	1
<i>bratislava</i>	0	0%	0	0	0	0	0
<i>icterohaemorrhagiae + ballum</i>	10	17.46%	4i/4b	6i/3b	3b	0	0
<i>pomona + ballum</i>	3	4.76%	1	1p/3b	0	1	0
<i>wolffi+ grippotyphosa</i>	1	1.59%	1w	0	0	1g	0
<i>icterohaemorrhagiae+ canicola + ballum</i>	1	1.59%	1c	0	1b	1i	0
Total	63						100%

i: icterohaemorrhagie
b:ballum
p:pomona
g:grippotyphosa
w:wolffi
c:canicola

Cuadro 6. Títulos de anticuerpos entre serovares de *Leptospira sp.* en borregas seroreactoras del grupo CONTROL (n =46). 2003

Serovares <i>Leptospira sp</i>	Número positivos	Porcentaje positivos	1/100	1/200	1/400	1/800	1/3200
<i>pomona</i>	0	0%	0	0	0	0	0
<i>hardjo</i>	0	0%	0	0	0	0	0
<i>canicola</i>	0	0%	0	0	0	0	0
<i>icterohaemorrhagiae</i>	20	43.48%	17	3	0	0	0
<i>grippotyphosa</i>	0	0%	0	0	0	0	0
<i>wolffi</i>	0	0%	0	0	0	0	0
<i>ballum</i>	20	43.48%	9	6	5	0	0
<i>bratislava</i>	0	0%	0	0	0	0	0
<i>icterohaemorrhagiae + ballum</i>	6	13.04%	3i/4b	2i/1b	1i/1b	0	0
Total	46						100%

i: icterohaemorrhagie
b:ballum
p:pomona
g:grippotyphosa
w:wolffi
c:canicola

Tampoco hubo diferencia en la seropositividad a *Leptospira sp.* en relación a la edad de las borregas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Presencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* en borregas según edad. 2003

Grupo etáreo (años)	N° Animales	Anticuerpos contra <i>Leptospira</i> sp.	
		N°	%
1 a 2	118	29	24.58 %
3 a 4	140	33	23.57 %
> 5	182	47	25.82 %
Total	440	109	24.77 %

V. DISCUSIÓN

La presencia de anticuerpos contra ocho diferentes serovares de *Leptospira sp.* en el $24.8 \pm 4.56\%$ (109/440) de borregas con o sin problemas reproductivos indica que estos animales fueron expuestos a infecciones naturales de *Leptospira* ya que en el calendario sanitario que utiliza la SAIS Tupac Amaru no figura la vacunación contra esta bacteria (Cuadro 1). Así mismo, la prevalencia de la *Leptospira* fue similar en borregas criadas en la zona de Consac y Casaracra (Cuadro 3).

Las prevalencias de los serovares *pomona*, *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *ballum* y *wolffi* tuvieron un rango de 0.92 a 42.2%. No se detectaron anticuerpos contra los serovares *hardjo*, *canicola* y *bratislava* (Cuadro 4). La presencia de anticuerpos contra los cinco serovares de *Leptospira* mencionados, indican que estos agentes están distribuidos en las zonas de procedencia de las borregas. La persistencia de la *Leptospira* en determinadas áreas requiere de condiciones ambientales óptimas de humedad, ojos de agua u oconales, suelo neutro o ligeramente alcalino, etc., y de la presencia de hospedadores de mantenimiento que pueden ser roedores u otros animales silvestres e incluso animales domésticos en los cuales la incidencia de la infección es alta y de tipo subclínico pero con eliminación de la bacteria en la orina contaminando el agua y pastos (Bolin, 1998; Vanasco, 2001).

El 28.64% (63/220) y el 20.91% (46/220) de las borregas con y sin problemas reproductivos respectivamente tuvieron anticuerpos contra 8 serovares de *Leptospira* arriba indicados. El análisis de estos datos mediante la prueba de Chi cuadrado indica que no existe una correlación estadísticamente significativa entre las variables presencia de anticuerpos y problemas reproductivos. Sin embargo, la *Leptospira* puede estar involucrado en la presentación del aborto o infertilidad ya que los serovares *ballum*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona* y *grippotyphosa* tienen mayores prevalencias en el grupo CASO incluso algunos con títulos de anticuerpos hasta 1/3200 comparado con el grupo CONTROL (Cuadros 5 y 6) así mismo, el mayor número de borregas con infecciones mixtas y con títulos de anticuerpos desde 1/100 hasta 1/800 se observaron en el grupo CASO.

Al parecer existen escasos estudios epidemiológicos de Caso-Control en leptospirosis en ovinos que permita contrastar el presente estudio. La falta de significancia estadística en el resultado de ambos grupos de borregas puede deberse a la compleja epidemiología de la leptospirosis, escasa información sobre la generación y duración de la inmunidad humoral en las borregas frente a infecciones leptospirales, etc. Sin embargo el porcentaje de borregas seroreactoras en ambos grupos es mayor a la prevalencia de 15.25% reportada en el país por Quiroz (1969); al igual que las prevalencias reportadas en ovinos de otros países como Chile: 5.7% (Zamora *et al.*, 1999); Bolivia: 14.3% (Ciceroni *et al.*, 1997); Brasil: 8.6% (Barbudo Filho *et al.*, 1999), Italia 6.1% (Ciceroni *et al.*, 2000), 17.1% en Nueva Zelanda (Collings, 1984) entre otros; con excepción de un estudio realizado en Rio Grande do Sul, Brasil, por Herrmann *et al.* (2004), donde se reporta una mayor prevalencia (34.26%) a la obtenida en el presente estudio.

Dentro del grupo de animales seropositivos se detectaron también animales con anticuerpos contra dos hasta tres serovares simultáneamente indicando infecciones mixtas, siendo la asociación entre serovares *icterohaemorrhagiae* y *ballum* (14.68%) las más frecuente y cuyos hospedadores de mantenimiento son los roedores silvestres (Cuadro 4). La respuesta inmunitaria del animal frente a una infección por *Leptospira* es serovar específico pero pueden existir reacciones

cruzadas entre algunos serovares, sobre todo en títulos bajos que se observa mayormente en infecciones agudas predominando durante la convalecencia los anticuerpos serovar específico (Awad y Willinger, 1982). La presencia de anticuerpos en diluciones bajas como 1/100 en las borregas con infecciones mixtas podrían ser reacciones cruzadas pero títulos de anticuerpos de 1/400 a 1/800 es más probable que sean serovar específico (Cuadros 5 y 6).

La ausencia de anticuerpos contra los serovares *hardjo*, *canicola* y *bratislava* es intrigante pues estos serovares han sido detectados en bovinos y ovinos (Hathaway *et al.*, 1982; Ellis, 1994; Zamora *et al.*, 1999; Ochoa *et al.*, 2000). Aunque Blackmore *et al.* (1979) menciona que el serovar *hardjo* a diferencia de lo que ocurre en el bovino, no es endémica en ovinos pero puede afectarlos esporádicamente. Los serovares de menor prevalencia fueron *canicola* y *wolffi*, ambos con títulos bajos pudiendo tratarse también de reacciones cruzadas con otro serovar. En un estudio realizado en humanos, bovinos y perros del valle del Mantaro, se reporta anticuerpos contra el serovar *canicola* (2,8%) en las tres especies estudiadas y *wolffi* (0,89%) solo en bovinos (Céspedes *et al.*, 2003) indicando que ambos serovares están presentes en la sierra central pero que sus prevalencias en las zonas de estudio podrían haber sido bajas o que desaparecieron.

El hospedador de mantenimiento del serovar *canicola* es el perro y en las puntas de las borregas existen perros ovejeros por lo que se esperaba encontrar anticuerpos contra este serovar, la ausencia de anticuerpos podría deberse a que los perros no estuvieron infectados con este serovar.

Muchas de las infecciones por leptospiras patógenas en bovinos y otros rumiantes menores y porcinos son subclínicas siendo detectadas sólo por la presencia de sus anticuerpos. En casos agudos y crónicos la infección está asociada a problemas reproductivos como abortos, nacidos muertos o infertilidad (Bolin, 1998). En las borregas de la SAIS Tupac Amaru, el aborto constituye el 6% de los problemas sanitarios. Este aparente bajo porcentaje tendría otra dimensión

en una población de más de 100 000 cabezas de ovinos que posee la SAIS, por lo que probablemente el aborto ocasiona pérdidas económicas para dicha empresa (Gamarra, M; comunicación personal).

El mayor número de borregas seroreactoras fueron las que abortaron y que tuvieron más de 5 años de edad. Los títulos de anticuerpos contra seis serovares en borregas del grupo CASO tuvieron un rango desde 1/100 a 1/3200, mientras que en el grupo CONTROL desde 1/100 hasta 1/400 argumentando el posible rol de la *Leptospira* en la presentación de los problemas reproductivos y que a mayor edad tienen más probabilidad de infectarse como ocurre en otras infecciones (Cuadros 5, 6 y 7). En el país no se dispone de informaciones de la presentación clínica de leptospirosis en ovinos a pesar que existen evidencias de infección sugiriendo que la infección es mayormente de tipo subclínica. En Nueva Zelanda se reportó un brote de mortalidad de corderos, los hallazgos histopatológicos y los títulos de anticuerpos contra el serovar *pomona* mayores a 1/25,600 en los corderos sobrevivientes indicaron que este serovar fue la causa del brote (Vermunt *et al.*, 1994).

No se conoce el tiempo de persistencia de los anticuerpos leptospirales en los rumiantes pero se menciona que los anticuerpos desaparecen en pocos meses hasta el punto de no ser detectados (Wohl, 1996). Por tanto, los anticuerpos detectados podrían corresponder a infecciones pasadas o muy recientes, esta posibilidad solo podría resolverse utilizando sueros pareados que indicaran presencia o ausencia de seroconversión. En caso de porcinos si la causa del aborto es la *Leptospira*, la marrana presenta altos títulos durante el aborto, en bovinos depende del serovar infectante, si es *hardjo*, puede hasta no tener anticuerpos pero eliminan la *Leptospira* por la orina e inclusive puede persistir en el tejido renal durante la vida del animal (Bolin, 1992, Barr, 1993).

La prueba de microaglutinación es la técnica de referencia para el diagnóstico de la leptospirosis (OIE, 2006). La prueba de microaglutinación puede ser aplicada para detección de anticuerpos en diferentes especies de animales

incluyendo el hombre e identifica el serovar infectante pero a diferencia de la prueba de Elisa no distingue las clases de inmunoglobulinas IgM o IgG que pudiera indicar infección temprana o tardía, por tanto no es posible saber si los títulos detectados son producto de infecciones recientes o pasadas (Levett, 2001). No existen datos concretos sobre el grado de sensibilidad y especificidad de la prueba posiblemente porque depende de varios factores. En un estudio de comparación con la prueba de aglutinación en látex, se indica que la técnica de microaglutinación tiene una sensibilidad de 85% cuando la infección tiene 30 días o más de haberse iniciado (Smits *et al.*, 2000).

El estudio de la leptospirosis es compleja por las numerosas especies patógenas y por las numerosas especies de animales domésticos y silvestres implicadas en su epidemiología. En el Perú, es aún más complicado por la falta de uniformidad en el uso de los serovares ya que la elección de los serovares para un estudio serológico está en función de la especie animal en determinada área geográfica y los serovares de *Leptospira* presentes en la zona. Y para elucidar su rol en la presentación de los abortos en las borregas sería necesario el análisis de la borrega y del feto durante el aborto, pero también es una tarea difícil ya que los abortos generalmente no son visualizados sino, meses después durante el perneo denominándolas borregas vacías. También sería necesario realizar un estudio de incidencia de la leptospirosis.

VI. CONCLUSIONES

1. No existió asociación estadística significativa entre la seropositividad a la *Leptospira sp.* y la presentación de problemas reproductivos en las borregas de la “SAIS Tupac Amaru” durante la campaña reproductiva del 2003.
2. La infección por *Leptospira sp.* está distribuida en las borregas de diferentes edades de las zonas de Consac y Casaracra de la SAIS Tupac Amaru en la Sierra Central.

VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. **AAVLD (Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico). 1994.** Manual de Leptospirosis. Buenos Aires – Argentina. Pp: 50.
2. **Acha, P. y B. Szyfres. 2003.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol. 1, 3ª ed., p. 175 – 186. Publicación científica N° 850. Organización Panamericana de la Salud. Washington, EUA.
3. **Alves, F. S. F., R. B. Lefebvre y W. Probert. 1999.** Identification of outer envelope proteins conserved among *Leptospira* serovars. Rev. Med. Vet., 150(11): 877-884.
4. **Alves, F. S., R. B. Lefebvre and W. Probert. 1999.** Bactericidal assay and passive protection studies of *Leptospira interrogans*. Rev. Med. Vet., 150(11): 885-890.
5. **Anderson, D. L. y R. C. Johnson. 1968.** Electrón microscopy of immune disruption of leptospire: action of complement and lysozyme. J. Bacteriol., 95: 2293-2309.

6. **Argento, E., J. Barriola, R. Caminoa, M. G. Draghi, M. Saraví, A. Seijo, C. L. Stiebel y G. T. Dorta. 1994.** Manual de Leptospirosis. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico.
7. **Awad, M. and H. Willinger. 1982.** Evaluation of 2-mercapto-ethanol treatment in serodiagnosis of swine leptospirosis. *Microbiologica*. 6: 133-143.
8. **Barbudo Filho, J., R. J. S. Girio, L. A. Mathias, A. V. Oliveira y M. Marinho. 1999.** Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira interrogans* em soros do ovinos do estado de São Paulo. Avaliação do sorotipo *jequitaiá* de *Leptospira biflexa* como antígeno de triagem sorológica. *Ars Veterinaria*., 15(1):26-32.
9. **Barr, B. C.; M. L. Anderson. 1993.** Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 9: 343-368.
10. **Blackmore, D. K.; A. R. Bahaman and R. B. Marshall. 1979.** The epidemiological interpretation of serological responses to leptospiral serovars in sheep. *N. Z. Vet. J.* 30:38-42.
11. **Bharti, A. et al. 2003.** Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.*, 3(12): 757-771.
12. **Bolin, C. A. 1992.** *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection of cattle. *Proc. Am. Assoc. Bov. Prac.* 24:12-14.
13. **Bolin, C., y D. P. Alt. 1998.** Clinical signs, diagnosis, and prevention of bovine leptospirosis. *Bovine Practitioner*. 33(1): 50-55.
14. **Bolin, C. 2000.** Leptospirosis. In C. Brown, and C. Bolin (ed.), *Emerging diseases of animals*. ASM Press, Washington, D.C. p. 185-200.

15. **Céspedes, M.; L. Llantoy, M. Arizapana y J. Unsihuay. 2003.** Seroprevalencia de leptospirosis en humanos, vacunos y perros en establos del valle del Mantaro. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 20(3)S: S1-S3.
16. **Ciceroni, L., A. Bartoloni, A. Pinto, P. Guglielmetti, C. Valdez, H. Gamboa, M. Roselli, F. Giannico y F. Paradisi. 1997.** Serological survey of leptospiral infections in sheep, goats and dogs in Cordillera province, Bolivia. New Microbiol., 20(1): 77 - 81.
17. **Ciceroni, L., D. Lombardo, A. Pinto, S. Ciarrocchi y J. Simeoni. 2000.** Prevalence of antibodies to *Leptospira* in sheep and goats in Alto Adige-South Tyrol. J. Vet. Med., 47, 217-223.
18. **Cisneros, M. A., N. Rojas y L. P. Moles. 1994.** Sensibilidad de dos serovariedades de *Leptospira interrogans* a diferentes concentraciones de 5-fluoracilo. Tec. Pecu. Méx., 32(1):18-24.
19. **Collings, D. F. 1984.** *Leptospira interrogans* infection in domestic and wild animals in Fiji. N. Z. Vet. J. 32: 21-24.
20. **Dirección General de Información Agraria (DGIA), 2002.** Situación Actual de la Crianza de Ovinos en el Perú. Ministerio de Agricultura. Disponible en: www.minag.gob.pe/portaagrario.
21. **Ellis, W. A. 1994.** Leptospirosis as a causa of reproductive failure. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 10:463-478.
22. **Faine, S. 1982.** Guidelines for control of leptospirosis. Faine S. (Ed.) WHO Offset Publication, N°67. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Pp.: 27-29, 67-83.

23. **Faine, S. 1994.** Leptospira and leptospirosis. CRC Press, Boca Raton, Fla., 245-264.
24. **Faine, S., B. Adler, C. Bolin, and P. Perolat. 1999.** Leptospira and leptospirosis, 2nd ed. MediSci, Melbourne, Australia. Pp.:272.
25. **Figueroa, M. 1984.** Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centro América. Editorial Universal. San José, Costa Rica. pp. 173-194.
26. **Haake, D. A. 2000.** Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiology. 146:1491-1504.
27. **Haake, D. A., G. Chao, R. L. Zuerner, J. K. Barnett, D. Barnett, M. Mazel, J. Matsunaga, P. Levett y C. A. Bolin. 2000.** The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect. Immun. 68(4):2276-2285.
28. **Hathaway, S. C.; T. W. Little; A. E. Stevens. 1982.** Serological survey of leptospiral antibodies in sheep from England and Wales. Vet. Rec. 110(5):99-101.
29. **Herrmann, G.; A. Pereira; E. Moreira; J. Haddad; J. Rescende; R. Rodríguez y R. Leite. 2004.** Soroprevalencia de aglutininas anti-Leptospira sp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural. 34(2): 443-448.
30. **INEI. 1994.** III Censo Nacional Aropecuario (CENAGRO). Disponible en: <http://www.inei.gob.pe/>

31. **Johnson, R. C., and S. Faine. 1984.** Leptospira, p. 62-67. In N. R. Krieg, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
32. **Kmety, E., and H. Dikken. 1993.** Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. University Press Groningen, Groningen, Holanda. Pp.: 104.
33. **Lacerda, L.M., R.J.S. Girio, M. Marchiori Filho y L. A. Mathias. 2002.** Pesquisa de aglutininas contra *Leptospira interrogans* sorovar wolffi nos soros sanguíneo e lácteo de bovinos em diferentes fases do período do lactação. *Ars Veterinaria*. 18(3): 294-299.
34. **Larson, B. 1996.** Immunization to decrease pregnancy wastage in beef cattle. Part II. Available vaccines. *Compendium on Continuing Education* 18(5).
35. **LeFebvre, R. B., A. B. Thiermann and J. Foley. 1987.** Genetic and antigenic differences of serologically indistinguishable leptospire of serovar *hardjo*. *J. Clin. Microbiol.*, 25(11):2094-2097.
36. **Levett, P. 2001.** Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(2):296-326.
37. **Levett, P. 2002.** Evaluation of two enzyme – linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66(6):745-748.
38. **Liceras de Hidalgo J., S. Valdivia y E. Higushi. 1989.** Leptospirosis en el Perú. *Anales del Seminario Nacional de Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria*. 3-4 de Julio. Lima-Perú. p. 7-20. MINSA. Programa Nacional de Control de Zoonosis.

39. **Lomar A. V., D. Diament y J. R. Torres. 2000.** Leptospirosis in Latin America. Emerging and re-emerging Diseases in Latin America. Infect. Dis. Clin. North Am., 14 (1); 23-38.
40. **Madigan M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003.** Brock: Biología de los microorganismos 10° Ed. Editorial Pearson Prentice Hall Iberia, Madrid. Pp.: 1064.
41. **Malajov, J. A. y Alejin R. M. 1989.** Leptospirosis del Cerdo. Editorial Científico Técnico. La Habana.
42. **Merien, F., G. Barants y P. Perolat. 1995.** Comparison of polymerase Chain reaction with microagglutination test and cultures for diagnosis of leptospirosis. J. Infect. Dis.,172: 281-285.
43. **Michel V., C. Branger y G. Andre- Fontaine. 2002.** Epidemiology of leptospirosis. Rev. Cub. Med. Trop., 54(1):7-10.
44. **Murray P. R., G. S. Kobayash, M. A. Pfaller y Rosenthal K. S. 1999.** Microbiología Médica 2° Ed. Editorial Harcourt Brace de España.
45. **Ochoa J. E., A. Sánchez e I. Ruiz. 2000.** Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. Revista Panamericana de Salud Pública. 7(5):325-331.
46. **Organismo Internacional de Epizootias. OIE. 2006.** Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.2.4. Leptospirosis. Disponible en: <http://www.oie.int/>
47. **Paster, B. J., F. E. Dewhirst, W. G. Weisburg, L. A. Tordoff, G. J. Fraser, R. B. Hespell, T. B. Stanton, L. Zablen, L. Mandelco, and C. R. Woese. 1991.** Phylogenetic analysis of the spirochetes. J. Bacteriol. 173:6101-6109.

48. **Peña-Monctezuma, A., D. M. Bulach, T. Kalambaheti and B. Adler. 1999.** Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. FEMS Microbiol. Lett., 177: 319-326.
49. **Prescott, L. M., J. P. Harley, D. A. Klein. 1999.** Microbiología. 4^{ta} edición. Mc Graw-Hill Interamericana. España. Pp: 466-469.
50. **Quiroz J. E. 1969.** Encuesta serológica de leptospirosis en ovinos sacrificados en el camal de Yerbateros (Lima). Tesis Bachiller. FMV-UNMSM. Lima – Perú.
51. **Schoenian, S. 2000.** Infectious causes of abortion in ewes. Western Maryland Research. University of Maryland. Disponible en: www.sheepandgoat.com/articles/abortion.html
52. **Smits, H. L.; M. A. Van Der Hoorn; M. G. Goris; G. C. Gussenhoven; C. Yersin; D. M. Sasaki; W. J. Terpstra and R. A. Hartskeerl. 2000.** Simple latex agglutination for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 38(3):1272-1275.
53. **Tremi, E., M Pejcoch y Z. Holesovsky. 2002.** Small mammals – natural reservoir of pathogenic leptospire. Vet. Med. Czech., 47(10-11): 309-314.
54. **Tripathy, D.; L. Hanson; M. Mansfield; J. Thilsted. 1985.** Experimental infection of lactating goats with *Leptospira interrogans* serovars *pomona* and *hardjo*. Am. J. Vet. Res., 46(12): 2512-2514.
55. **Vanasco, N. B., J Littersberger, M Sequeira y H Tarabla. 2001.** Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents. Vet. Microbiol., 82: 321-330.

56. **Vermunt, J., D. West, D. Arthur and R. Marshall. 1994.** Leptospirosis in a lamb. N. Z. Vet. J. 42(4): 155.
57. **Villarroel, J y Gamarra, M. 1978.** El Ovino Raza Junín. Sociedad Agrícola de Interés Social Tupac Amaru Limitada N° 1. Pachacayo, Perú .Pp. 33.
58. **Vinh, T., B. Adler, and S. Faine. 1982.** The role of macrophages in the protection of mice against leptospirosis: in vitro and in vivo studies. Pathology. 14 (1): 463-468.
59. **Vinh, T., B. Adler, and S. Faine. 1986.** Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. J. Gen. Microbiol., 132(1):103-109.
60. **Wohl, J. 1996.** Canine Leptospirosis. Comp. Small Anim., 18(11):1215-1241.
61. **World Health Organization. 1999.** Leptospirosis worldwide. Wkly. Epidemiol. Rec., 74(1):237-242.
62. **World Health Organization. 2003.** Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. WHO Library Cataloguing – in – Publication Data. Printed in Malta.
63. **Yuri, K., Y. Takamoto, M. Okada, T. Hiramune, N. Kikushi, R. Yanagawa. 1993.** Chemotaxis of leptospire to hemoglobin in relation to virulence. Infect. Immun., 61:2270-72.
64. **Zamora, J., S. Riedemann y N. Tadish. 1999.** A serological survey of leptospirosis in sheep in Chile. Rev. Latinoam. Microbiol. 41(2): 73-76.