

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Presencia de anticuerpos contra serogrupos patógenos de
Leptospira spp. en el zorro sechurano (*Lycalopex
sechurae*) de vida libre y caninos domésticos en la
comunidad campesina José Ignacio Távara Pasapera,
Piura**

TESIS

Para optar el Título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Gabriela Pacheco Sánchez

Lima – Perú

2015

DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a todos los apasionados
por aprender, en especial a nosotros jóvenes
que estamos tratando de cambiar el mundo,
un experimento a la vez.*

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por estar a mi lado siempre, por escucharme y guiar mi camino sabiamente.

A mi familia por el inmenso amor y el constante apoyo en mis decisiones, por siempre creer en mí y por la fuerza que me dan a la distancia, en especial a mi madre por siempre estar ahí para absolutamente todo lo que necesite.

A mi asesora de tesis, la Dra. Calle, gracias por la presión a la distancia, por los jalones de oreja “virtuales” tan necesarios y por el cariño hacia mí. Al equipo de trabajo del laboratorio, el equipo del 2013 y 2014, infinitas gracias por la amistad, las risas, las comidas y los karaokes.

A mis amigos de la casa verde, muchas gracias por las sonrisas que me quedan al recordar los 6 años juntos, gracias por enseñarme tanto, de ustedes y de mí misma. Siempre, absolutamente siempre, bicampeones.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE CUADROS	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Leptospira y leptospirosis	4
2.1.1. Taxonomía y Clasificación	4
2.1.2. Biología de las leptospiras	5
2.1.3. Patogenia	6
2.1.4. Epidemiología	8
2.1.5. Inmunidad y Vacunas	9
2.1.6. Leptospirosis como problema de Salud Animal	11
2.1.7. Leptospirosis como problema de Salud Pública	13
2.1.8. Diagnóstico	14
2.1.9. Tratamiento	18
2.1.10. Prevención	19
2.2. El Zorro Sechurano (<i>Lycalopex sechurae</i>)	19
2.2.1. Generalidades	19
2.2.2. Taxonomía	21
2.2.3. Distribución	21

III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Lugar de ejecución	23
3.2. Calculo del tamaño de muestra	24
3.3. Caracterización de las muestras	24
3.4. Procesamiento de las muestras	24
3.5. Materiales	24
3.6. Prueba de Microaglutinación (MAT)	25
3.6.1. Preparación del antígeno y serovares utilizados	26
3.6.2. Primera parte: tamizaje	27
3.6.3. Segunda parte: titulación	29
3.7. Análisis estadístico	30
IV. RESULTADOS	31
4.1. Caninos domésticos	32
4.2. Zorros Sechuranos	36
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES	43
VII. LITERATURA CITADA	44

RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, endémica en países de clima subtropical y tropical húmedo. Afecta tanto a animales silvestres como a animales domésticos, incluyendo a los cánidos, los cuales pueden transportar las leptospiras en la orina y, por consiguiente, infectar a otros animales y humanos que interactúen con ellos. La infección es causada por especies patógenas de *Leptospira* spp, registrándose 14 especies actualmente, distribuidas en más de 250 serovares. El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. en zorros de Sechura (*Lycalopex sechurae*) y caninos domésticos que habitan en la comunidad campesina José Ignacio Tavera Pasapera, en Piura - Perú. Para tal fin se analizaron mediante la prueba de Microaglutinación (MAT) 11 muestras de suero de Zorros de Sechura y 80 muestras de suero de caninos domésticos, de ambos sexos y diferentes edades. De los 91 cánidos analizados, el 53.85% (49/91) fueron positivos para al menos un serovar evaluado. El 36.36% (4/11) de los zorros de Sechura tuvo presencia de anticuerpos contra algún serovar de *Leptospira* spp., siendo los más frecuentes los serovares Tarassovi, Javanica y Varillal; mientras que en los caninos domésticos el 56.25% (45/80) presentaron anticuerpos contra *Leptospira* spp., siendo los serovares más frecuentes Varillal, Canicola, Ballum y Hurtsbridge. Los resultados obtenidos indican que existen algún grado de exposición a *Leptospira* spp. en los zorros de Sechura y en los caninos domésticos de la comunidad estudiada, pudiendo estos constituir un posible riesgo para los animales y para las personas que habitan en la zona y/o en zonas aledañas.

Palabras clave: *Leptospira* spp., Zorro de Sechura, caninos domésticos, prueba de microaglutinación, presencia.

ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide zoonosis, endemic in tropical and subtropical countries. It affects both wild and domestic animals, including the canids, which can transport leptospire in the urine, therefore, infecting other animals and humans that interact with them. The infection is caused by pathogenic species of *Leptospira* spp., consisting of 14 species currently described, distributed in more than 250 serovars. The aim of this study was to detect the presence of antibodies against *Leptospira* spp. in the Sechura fox (*Lycalopex sechurae*) and domestic canines that inhabit the José Ignacio Távora Pasapera community, in Piura. To this end, 11 serum samples from Sechura foxes and 80 samples from domestic canines were analyzed, both from different sex and ages, using the micro agglutination test (MAT). From the 91 canids studied, 53.85% (49/91) were positive to at least one serovar tested. 36.36% (4/11) from the Sechura foxes presented antibodies against *Leptospira* spp., the most reagent serovars were Tarassovi, Javanica and Varillal. 56.25% (45/80) of the domestic canines were reagent against *Leptospira* spp., the most frequent serovars were Varillal, Canicola, Ballum and Hurtsbridge. The results indicate that there is the presence of some level of exposure to *Leptospira* spp. in the Sechuran foxes and the domestic canines that inhabit that community; which makes them a possible a risk for animals and for people that inhabit that community and the surrounding areas as well.

Key words: *Leptospira* spp., Sechura fox, Domestic canines, Micro Agglutination Test, Presence.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Leptospira</i> spp. bajo microscopía electrónica	6
Figura 2. Distribución geográfica de los brotes de leptospirosis animal reportados a la OIE entre el 2005 y 2014	12
Figura 3. Estadios de la enfermedad en correlación con los momentos de toma de muestra.	15
Figura 4. Ejemplar de <i>Lycalopex sechurae</i>	20
Figura 5. Distribución de <i>Lycalopex sechurae</i> en América del Sur	22
Figura 6. Observación microscópica de <i>Leptospira</i> spp. de un tubo de EMJH.	27
Figura 7. Distribución de resultados de la prueba de Microaglutinación (MAT).	31
Figura 8. Distribución de los resultados por tipo de cánidos.	32

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Serogrupos de <i>Leptospira</i> spp. incluidos en el estudio.	26
Cuadro 2. Títulos aglutinantes máximos de los caninos domésticos en la prueba MAT.	33
Cuadro 3. Resultados de la prueba de Microaglutinación (MAT) de los caninos domésticos según local de muestreo.	34
Cuadro 4. Caninos domésticos seroreactores según lugar de muestreo y serogrupo evaluado.	34
Cuadro 5. Resultados de la prueba de Microaglutinación de los caninos domésticos según grupos etarios.	35
Cuadro 6. Resultados de la prueba de Microaglutinación de los caninos domésticos según sexo.	35
Cuadro 7. Títulos aglutinantes de los cánidos silvestres en la prueba de Microaglutinación.	36
Cuadro 8. Resultados de la prueba de Microaglutinación de los cánidos silvestres según sexo.	36

I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por miembros del género *Leptospira* spp., que incluyen 21 especies (entre patógenas y saprófitas) genéticamente identificadas y más de 250 serovares que son tradicionalmente categorizados en serogrupos (Levett, 2001; Lehman *et al.*, 2014). Esta zoonosis está distribuida mundialmente y es mantenida en la naturaleza por una variedad de animales domésticos y salvajes (Acha y Szyfres, 2003).

El agente causal de la leptospirosis pertenece al orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae*. Son bacterias helicoidales, móviles, por la presencia de endoflagelos que se localizan en el interior del periplasma, y tienen extremos en forma de ganchos. No se tiñen bien con la tinción gram pero se podrían clasificar en bacterias gram-negativas por sus características morfológicas. Son bacterias que se encuentran con facilidad en ambientes acuáticos y su aislamiento es tedioso y a veces impreciso, por lo que para su diagnóstico se utilizan pruebas serológicas, siendo la prueba gold standard la prueba de Microaglutinación (MAT) (Adler y De La Pena Moctezuma, 2010).

La presencia de *Leptospira* spp. en animales ha sido registrada a través de los años y se considera que prácticamente cualquier especie de mamífero puede ser un reservorio para este microorganismo. No obstante, la documentación de la sintomatología de leptospirosis es rara en fauna silvestre (Leighton, 2001).

En los caninos domésticos la enfermedad, también conocida como enfermedad de Stuttgart, es de carácter agudo y tiene cuatro formas de manifestaciones clínicas: síndrome icterico, síndrome hemorrágico, síndrome urémico y enfermedad reproductiva. Un caso típico de leptospirosis canina puede evolucionar con fiebre, ictericia, vómitos, diarrea, coagulación intravascular diseminada, uremia, hemorragias y eventualmente la muerte del animal (André-Fontaine, 2006; Goldstein, 2010). Estos animales son considerados como centinelas para muchas enfermedades infecciosas, incluyendo leptospirosis. Esto significa que el involucramiento de ellos en estudios observacionales y descriptivos ayuda al conocimiento del estado sanitario de una región con respecto a la infección estudiada.

En cánidos silvestres se ha registrado una seroconversión para distintos serovares de *Leptospira* spp. en diferentes estudios. Las frecuencias relatadas han sido de 63.6% y 72.3% para coyotes y zorras grises en México (Hernández *et al.*, 2010); 46.67% para carnívoros salvajes (*Cerdocyon thous*, *Chrysocyon brachyurus*, *Speothos venaticus*, entre otros) en Brasil (Pinto *et al.*, 2011); 33.8% para zorros rojos en Croacia (Slavica *et al.*, 2011); y 10% para zorros rojos de vida libre en Escandinavia (Akerstedt *et al.*, 2010).

En el Perú no se han realizado muchos estudios concernientes a cánidos silvestres y hasta la fecha no se han reportado trabajos de frecuencia de enfermedades que involucren al zorro Sechurano (*Lycalopex sechurae*) entre las especies estudiadas, por lo que no se tiene registro del estado sanitario de esta especie de cánido silvestre tan común en el desierto peruano.

La justificación e importancia de tener a esta especie de cánido silvestre como parte del estudio radica en algunos factores: 1) según la International Union for Conservation of Nature (IUCN), el zorro sechurano es una especie catalogada como casi amenazada (NT), por lo cual toda la información que se puede obtener ayuda en el mejoramiento del control de la población, 2) el Zorro de Sechura es un ente importante en la diseminación de semillas del algarrobo (*Prosopis pallida*) por el litoral costero, justificando su importante rol ecológico (Cossíos, 2005), 3) en la alimentación de este cánido silvestre figuran algunos roedores, como las ardillas, especie en la cual se han publicado trabajos describiendo

presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. (Montes *et al.*, 2011); y 4) debido a que los cánidos silvestres pueden presentar una mayor susceptibilidad a agentes infecciosos transmitidos por poblaciones de caninos domésticos, como el caso de *Leptospira* spp., se hace requerida más información enfocada a dicha transmisión para estudios de conservación de las especies silvestres.

Con lo descrito, el objetivo del presente trabajo fue evidenciar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. tanto en zorros sechuranos (*Lycalopex sechurae*) como en caninos domésticos que cohabitan la comunidad campesina José Ignacio Tavera Pasapera, en Piura; teniendo en cuenta el carácter centinela de estos animales y la importancia de ellos para el ecosistema.

II.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEPTOSPIRA Y LEPTOSPIROSIS

2.1.1. Taxonomía y clasificación

El género *Leptospira* fue inicialmente clasificado en dos especies: *Leptospira interrogans* y *Leptospira biflexa*. Estos dos grupos diferían en su capacidad patogénica, sus requerimientos nutricionales y en otras propiedades fenotípicas (Johnson y Rogers, 1964). Todas las leptospirosas patógenas pertenecían a la especie *Leptospira interrogans*.

2.1.1.1 Clasificación serológica

Mediante la Prueba de absorción de aglutinación cruzada (CAAT) se consiguió la diferenciación en serovares, que hasta hoy es considerado el sistema básico unitario para *Leptospira* spp. Los serovares que son antigénicamente parecidos son agrupados en serogrupos (Kmety y Dikken, 1993).

Hasta la fecha han sido descritos aproximadamente 250 serovares patógenos, siendo la lista actualizada periódicamente (Corney *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2008; Adler y De La Peña Moctezuma, 2010; Sedigheh *et al.*, 2010; Das Neves Paiva-Cardoso *et al.*, 2013). Las últimas serovariedades adicionadas a la lista son *L. kirschneri* serovar Altodouro, *L. santarosai* serovar Corredores y *L. santarosai* serovar Costa Rica (Levett y Smythe, 2014).

2.1.1.2 Clasificación molecular

La clasificación genotípica de las leptospiras está basada en electroforesis de enzimas multilocus y análisis de la secuencia 16s del rRNA (Hookey, Bryden y Gatehouse, 1993). En la reunión del Subcomité de taxonomía de *Leptospiraceae* del 2007 en Quito, Ecuador, se agregaron 4 genomoespecies a la lista de especies de leptospiras patógenas, resultando en 13: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* y *L. wolffii* (Adler y De la Peña Moctezuma, 2010). Hasta el presente año la lista de especies patógenas se encuentra actualizada en 14 especies (Lehman *et al.*, 2014).

La correlación entre la clasificación serológica y la molecular es pobre, ya que un mismo serogrupo puede ser encontrado en más de una especie. Por consiguiente, los sistemas de clasificación basados en semejanzas genéticas deben ser usados en conjunto con la clasificación antigénica (Cerqueira y Picardeau, 2009).

2.1.2 Biología de las leptospiras

El nombre de la bacteria se deriva del griego *leptos* (fino) y del latín *spira* (enroscado). El género *Leptospira* spp. está conformado por espiroquetas de doble membrana celular, finas (6-20 μm de longitud y 0.1 μm de diámetro), flexibles, móviles y de forma espiral (Cullen *et al.*, 2004).

Estas bacterias poseen extremos característicos en forma de ganchos. La movilidad les es conferida por la rotación de dos flagelos axiales insertados en los extremos opuestos de la bacteria, extendiéndose por el espacio periplásmico (región central) (Picardeau, 2013). Debido a su estrechez son visualizadas a través de microscopía de campo oscuro y microscopía de contraste de fases, apareciendo como espiroquetas activamente móviles.



Figura 1. *Leptospira* spp. bajo microscopia electrónica (Fuente: Picardeau 2013)

Entre otras características, se describe que son bacterias aerobias obligadas y crecen a una temperatura de 28-30 °C en medios líquidos o semisólidos que poseen nutrientes como vitaminas B1y B12, ácidos grasos, aminoácidos y sales minerales. Además, los medios requieren de la adición de albúmina bovina y/o suero de conejo para su óptimo crecimiento (Faine *et al.*, 1999).

Las leptospiras patógenas no se reproducen fuera del hospedador y son rápidamente inactivadas cuando son expuestas al calor excesivo, radiación ultravioleta, desinfectantes y temperaturas de congelación. Sin embargo, cuando las condiciones son óptimas, pueden sobrevivir en el agua y suelo húmedo de semanas a meses (Acha y Szyfres, 2003).

2.1.3 Patogenia

Las leptospiras pueden ingresar al organismo vía membranas mucosas o a través de piel cuya integridad haya sido comprometida por cortes, macro o micro-abrasiones y/o inmersión en agua (Adler, 2014). Posteriormente, invaden rápidamente el flujo sanguíneo, causando como lesión primaria la disrupción de la integridad de las membranas celulares endoteliales: hemorragias y fugas capilares (Rao *et al.*, 2003).

Luego de pasar por la corriente sanguínea, las leptospiras colonizan preferentemente el riñón e hígado, debido a la gran cantidad de lípidos (ácidos grasos) que poseen estos órganos; y en menor frecuencia, colonizan el pulmón y pericardio (Rao *et al.*, 2003; Janwitthayanan *et al.*, 2013).

Estas espiroquetas son capaces de persistir en órganos inmunológica y anatómicamente privilegiados. El sitio anatómico de predilección son los túbulos renales proximales, donde pueden permanecer hasta 4 semanas después de una infección aguda en humanos y de forma intermitente por años en animales (Levett y Haake, 2010).

2.1.3.1 Factores de virulencia

Los mecanismos por los cuales estas bacterias ocasionan enfermedad no están completamente entendidos. Sin embargo, se tiene entre los potenciales mecanismos de patogenicidad la respuesta del sistema inmune, la producción de toxinas, adhesinas, lipoproteínas y otras proteínas de membrana externa (Goncalves-de-Albuquerque *et al.*, 2012).

El LPS leptospiral se asemeja química e inmunológicamente al LPS de las bacterias Gram negativas. Sin embargo, ha demostrado ser menos activo y/o tóxico en exámenes de actividad de endotoxina (Adler, 2014). Otras proteínas que juegan un rol muy importante en el daño endotelial son las hemolisinas, colagenasas y proteasas, encontradas específicamente en *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* (Xue *et al.*, 2009).

La movilidad bacteriana ocupa el mayor papel en el desarrollo de la leptospirosis. La habilidad para avanzar rápidamente en ambientes desfavorables contribuye a la entrada de estas espiroquetas a través de las células epiteliales (Charon y Goldstein, 2002). Las proteínas de membrana pueden actuar como mediadores en la adherencia a las células hospedadoras o a la invasión de los tejidos. Estas proteínas pueden ser o lipoproteínas o proteínas de membrana integrales (Cullen *et al.*, 2004).

El genoma de *Leptospira* spp. contiene más de 150 genes que codifican lipoproteínas; entre estos se pueden citar los genes Lig (liga, ligB y ligC) que codifican proteínas de membrana con papel en la adhesión a los tejidos del hospedador, actuando además como antígenos primarios (Choy *et al.*, 2007). La lipoproteína más importante y conocida, LipL32, está altamente conservada entre los serovares patógenos. Otras

lipoproteínas conocidas son la LipL21 y la LipL41 (Xue, Jan y Picardeau, 2009). La proteína LenA, endostatina-like, se une al factor H, regulador del complemento, lo que sugiere un importante papel en la resistencia al suero (Stevenson *et al.*, 2007).

Las proteínas integrales de membrana externa (OMPs) juegan un papel clave en la patogénesis de la leptospirosis, ya que actúan como blancos antigénicos y de adhesión para los anticuerpos bactericidas, receptores celulares y/o porinas. El primer grupo de OMPs genéticamente definido en *Leptospira* spp. fue la lipoproteína de superficie OmpA-like, Loa22 (Ristow *et al.*, 2007). Esta lipoproteína es bastante conservada con expresión regulada en la infección aguda de la leptospirosis (Evangelista y Coburn, 2010).

Recientemente, se han identificado 4 nuevas OMPs: OmpL36, OmpL37, OmpL47 y OmpL54), aunque hasta ahora no se han descrito sus roles funcionales (Pinne y Haake, 2009). La Lsa66 es otra proteína OmpA-like actualmente descrita, la misma tiene doble actividad (adhesión e invasión), sugiriendo un papel en la patogénesis de la leptospirosis (Oliveira *et al.*, 2011).

El hierro es esencial para la viabilidad de muchas especies bacterianas, por consiguiente, la captación del mismo por la bacteria es considerada un factor de virulencia. Las leptospiras patógenas poseen la Heme oxigenasa, HemO, la cual facilita la adquisición de hierro del heme (mayor fuente de hierro) (Murray *et al.*, 2008).

2.1.4 Epidemiología

La leptospirosis es una zoonosis distribuida mundialmente, tanto en áreas urbanas como rurales, en climas templados y tropicales. Diferentes condiciones climáticas y sociales ayudan al incremento y distribución de la enfermedad, como lluvias intensas, alta densidad de población en condiciones de pobreza y ausencia de servicios sanitarios (Bharti *et al.*, 2003). Los reservorios pueden ser los animales en general; pero se destaca el papel de los roedores como principal agente diseminador, excretando leptospiras al ambiente vía orina. La enfermedad se manifiesta con problemas reproductivos (bovinos, suinos, caprinos

y ovinos), uveítis (caballos) o cuadros agudos sistémicos (caninos y humanos) (Levett y Haake, 2010; Picardeau, 2013).

En general, cada serovar está adaptado a determinados hospedadores mamíferos; sin embargo, un organismo puede infectarse con más de un serovar (Hartskeel *et al.*, 2011). Existen diferentes variaciones entre los hospedadores de mantenimiento y los serovares que transmiten; el conocimiento de los serovares prevalentes y sus hospedadores de mantenimiento es esencial para entender la epidemiología de la enfermedad (Levett, 2004; Adler y De la Pena Moctezuma, 2010).

En América Latina esta zoonosis tiene un carácter endémico en la mayoría de países. Entre los serovares más prevalentes en esta región se encuentran: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. Pomona*, *L. Bratislava*, *L. Australis* y *L. pyrogenes*, aunque se ha descrito serología para un nuevo serovar –*L. varillal* (Matthias *et al.*, 2008; Picardeau, 2013; Petrakovsky *et al.*, 2014).

En el Perú, el último trabajo realizado en caninos domésticos, del que se tiene conocimiento, detectó un 58.03% de seropositividad a por lo menos un serovar de *Leptospira* spp., siendo los serogrupos más frecuentes Iquitos, Tarassovi, Canicola, Australis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Mini y Ballum; evaluando sueros de caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis de la provincia de Lima (Siuce, 2014).

2.1.5 Inmunidad y vacunas

La respuesta inmune inicial es de tipo innata reconociendo antígenos propios de la bacteria, como son los lipopolisacáridos (LPS) de las leptospiras, por medio de receptores tipo Toll (TLR), TLR2 y TLR4. Los cuales activan los factores nucleares, como NF- κ B, que induce la producción de citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8) y al factor de necrosis tumoral (TNF). Esta respuesta es descrita en la leptospirosis a pesar de la capacidad de las leptospiras de evadir la fagocitosis y el complemento (Rao *et al.*, 2003, Hartskeel *et al.*, 2011).

La respuesta inmune en la leptospirosis es predominantemente humoral en humanos y en la mayoría de las especies animales. Muchos estudios demostraron que esta inmunidad puede ser transferida pasivamente por humanos convalescientes o suero animal, ya sea por antisuero producido experimentalmente o por anticuerpos monoclonales (Adler y De la Peña Moctezuma, 2010). El organismo consigue montar una respuesta específica contra el serovar infectante, mediante la producción de anticuerpos IgM e IgG, además de la producción de interferón gamma y la respuesta asociada a células T4 (CD4+) (Bernardi *et al.*, 2012; Goncalves-de-Albuquerque *et al.*, 2012).

Las vacunas para humanos y animales han sido usadas desde 1920; casi todas eran preparadas con leptospiras inactivadas por una variedad de métodos, como calor, formalina, fenol, irradiación, etc. (Faine *et al.*, 1999). En la actualidad existen diversas vacunas contra la leptospirosis, las más conocidas son las vacunas inactivadas, las cuales son emulsiones con mínimo 3 serovares (Koizumi y Watanabe, 2005).

La inmunización en los humanos no es muy practicada. Actualmente se tiene disponible sólo en algunos países como China (para prevenir las epidemias en grande escala en los trabajadores agrícolas), Francia (para trabajadores considerados de “ocupaciones de alto riesgo”), Cuba y Rusia (Chen, 1985; Martinez *et al.*, 2004; Laurichesse *et al.*, 2007; Levett y Haake, 2010).

Tanto en los animales como en los humanos, las vacunas son serovar específicas y protegen por un corto periodo de tiempo; por ello la revacunación en distintos intervalos es necesaria para mantener los títulos de anticuerpos protectores. Estas vacunas están enfocadas en la situación local de la enfermedad y no representan la realidad de otras áreas con otros serovares endémicos (OIE, 2012; WHO, 2003).

2.1.6 Leptospirosis como problema de salud animal

Los signos clínicos de la leptospirosis en los animales pueden variar desde la forma subclínica o de fiebre leve hasta enfermedad hepática, renal y pulmonar. La fase aguda de la enfermedad es caracterizada por falla renal y hepática asociado con disturbios hematológicos y bioquímicos; suele ser letal si no es tratada rápidamente (André-Fontaine, 2006; Goldstein, 2010).

La mayoría de los casos están relacionados a serovares adaptados con un hospedador como Canicola en perros, Bratislava en caballos y cerdos, Hardjo en ganado y Australis y Pomona en cerdos. Sin embargo, otros serovares pueden estar involucrados en presentaciones más serias (Faine *et al.*, 1999).

En los caninos se describen cuatro síndromes: icterico, hemorrágico, urémico y reproductivo. Un caso típico de leptospirosis canina puede evolucionar con fiebre, ictericia, vómitos, diarrea, coagulación intravascular diseminada, uremia, hemorragias y muerte. Los casos crónicos de leptospirosis en caninos son menos frecuentes (André-Fontaine, 2006; Adler y De la Pena Moctezuma, 2010). Los hallazgos clínicos incluyen moderada leucocitosis, trombocitopenia, azotemia, incremento de enzimas hepáticas en la sangre, disturbios electrolíticos y aumentos en las concentraciones séricas de bilirrubina y dependiendo de la gravedad del caso los parámetros de coagulación pueden estar alterados (Goldstein, 2010). Existen pocos casos reportados de leptospirosis felina, sin embargo, ha sido demostrado la seroconversión para esta enfermedad (Agunloye y Nash, 1996; Markovich *et al.*, 2012;).

En animales de producción (bovinos, ovinos, caprinos y suinos), la presentación de la enfermedad puede ser aguda o crónica, con prevalencia de la segunda. Los signos de la enfermedad incluyen fallas reproductivas, abortos, natimortos, momificación fetal, nacimiento de lechones o becerros débiles y agalactia; manifestándose en pérdidas económicas para el sector ganadero y porcicultor (Adler y De la Pena Moctezuma, 2010; Lucheis y Ferreira, 2011; Petrakovsky *et al.*, 2014).

En caballos los signos clínicos generales son los mismos que los de animales de producción, aunque en la leptospirosis equina se describe la uveítis recurrente infecciosa (oftalmia periódica o ceguera lunar); la cual parece estar mediada por mecanismos autoinmunes que envuelven una reacción cruzada entre los tejidos oculares y las OMPs leptospirales (Verma *et al.*, 2013; Hamond *et al.*, 2014). Se tiene que tomar en cuenta que los animales en la fase de recuperación de la enfermedad pueden ser portadores asintomáticos albergando leptospiras patógenas en los túbulos renales por periodos de tiempo prolongados y diseminando estas bacterias en el ambiente (Levett, 2001).

En América Latina y el Caribe, la leptospirosis es una enfermedad re-emergente de carácter endémico, y se han reportado diversos brotes de la esta infección a lo largo de los años (Petrakovsky *et al.*, 2014).

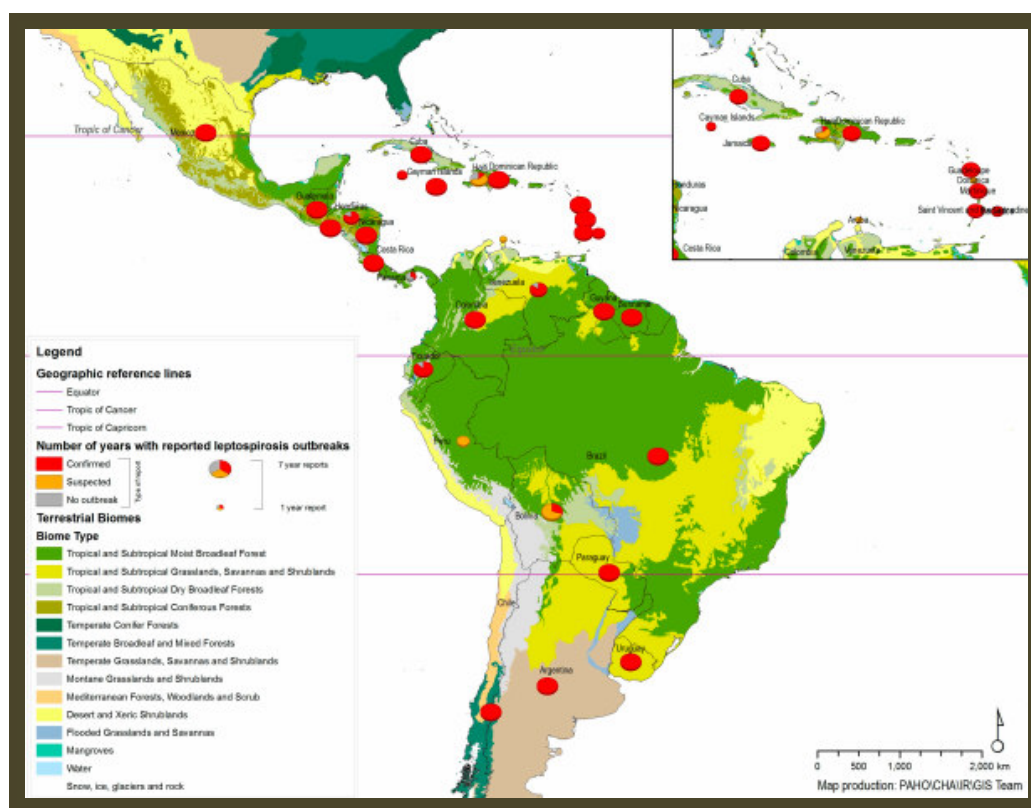


Figura 2. Distribución geográfica de los brotes de leptospirosis animal reportados a la OIE entre el 2005 y 2014. (Fuente: Petrakovsky *et al.*, 2014)

2.1.7 Leptospirosis como problema de salud pública

La enfermedad en el hombre puede presentarse de forma subclínica, con manifestaciones clínicas inespecíficas semejantes a las de la influenza (gripe), y en algunos casos, como una meningitis linfomonocitaria. El periodo de incubación es aproximadamente de 7 a 14 días. Los primeros síntomas de la enfermedad son: fiebre, cefalea y dolores musculares generalizados (Adler y De la Peña Moctezuma, 2010; Guerra, 2013).

La primera semana corresponde a la fase leptospirémica, con diseminación de leptospiras hacia diferentes órganos como hígado, riñones y musculatura esquelética y cardíaca. La forma grave de la enfermedad (Síndrome de Weil) es caracterizada por disfunción hepática, renal, respiratoria y congestión difusa, con altas tasas de mortalidad. La ictericia surge entre el tercer y séptimo día (Acha y Szyfres, 2003).

La leptospirosis humana fue reconocida inicialmente como una enfermedad ocupacional, asociada a actividades agropecuarias y mantenimiento de redes de desagües (Guerra, 2013). En la actualidad, la misma ha cobrado importancia como una zoonosis de carácter recreacional, reportándose casos asociados a viajes y a exposición recreacional acuática (pesca, natación, buceo, kayak, entre otras). Las inundaciones también se han identificado como un factor de riesgo para esta zoonosis (Levett, 2004).

Los factores de riesgo en los humanos son los mismos que en los animales – contacto con animales infectados, orina de animales infectados y/o redes de agua (o superficies) contaminada con orina de animales infectados. No existe transmisión natural humano-humano que haya sido comprobada (Bharti *et al.*, 2003; Pappas *et al.*, 2008; Adler y De la Peña Moctezuma, 2010).

En Europa el panorama de transmisión de la enfermedad involucra migración urbana, actividades ocupacionales (veterinarios y trabajadores agropecuarios) y exposición recreacional por el turismo a otros continentes. El cambio climático es un factor potencial a

tomar en cuenta al evaluar posibles locales epidémicos en este continente. Dupouey *et al.* (2014) encontró una incidencia de casos de leptospirosis humana de 0.13/100,000 habitantes en Europa, en el 2010. Si bien esta incidencia puede considerarse “estable”, se tiene que tomar en cuenta que puede reflejar únicamente los casos fácilmente identificables, escondiendo los casos asintomáticos o sin sinología específica.

En los Estados Unidos, de 100 a 200 casos humanos de leptospirosis humana fueron reportados en 1994, año en el cual dejó de ser considerada una enfermedad de notificación nacional. Sin embargo, la enfermedad aún se mantiene notificada en algunos estados como Hawaii, California y Texas (Guerra, 2013). El carácter actual de zoonosis recreacional en este país se vio afirmado con un brote de leptospirosis humana que afectó a practicantes de deportes de aventuras (Stern *et al.*, 2010).

Se sabe que en América del Sur la leptospirosis humana está presente; sin embargo, no es de carácter notificable en la mayoría de los países y la información de los casos anuales es derivada en su mayoría de la OIE. En América central los países con incidencias más altas son El Salvador, Nicaragua y Cuba. En las islas del Caribe la enfermedad es de carácter endémico, de acuerdo a reportes anuales del Centro de Epidemiología del Caribe. (Pappas *et al.*, 2008).

En el Perú, Céspedes *et al.* (2006) realizó un trabajo retrospectivo de confirmación de casos humanos de leptospirosis y registró que 18 de 24 regiones en nuestro país presentan casos confirmados de leptospirosis humana. Las regiones que tuvieron mayor distribución fueron Loreto (21.6%), Cusco (14.8%), Madre de Dios (11.6%) y Lima (11.1%). Siendo los serovares más predominantes Varillal e Icterohaemorrhagiae.

2.1.8 Diagnóstico

Debido a que esta infección tiene un amplio rango de signos clínicos, el diagnóstico definitivo de la misma es dificultoso y depende de una batería de exámenes de laboratorio (Barthi *et al.*, 2003). Además, el tiempo en el que se colecta la muestra y el tipo de muestra

son fundamentales para poder llegar a un diagnóstico definitivo de leptospirosis. Durante la fase aguda de la infección es común un cuadro de leptospiremia, que dura generalmente de 3 a 10 días; por consiguiente, una muestra de sangre para evaluar presencia de ADN leptospiral sería el examen a elección. Luego de esta fase empieza la producción de anticuerpos, que generalmente comienza en la segunda semana post- infección y puede durar algunas semanas (Picardeau, 2013).

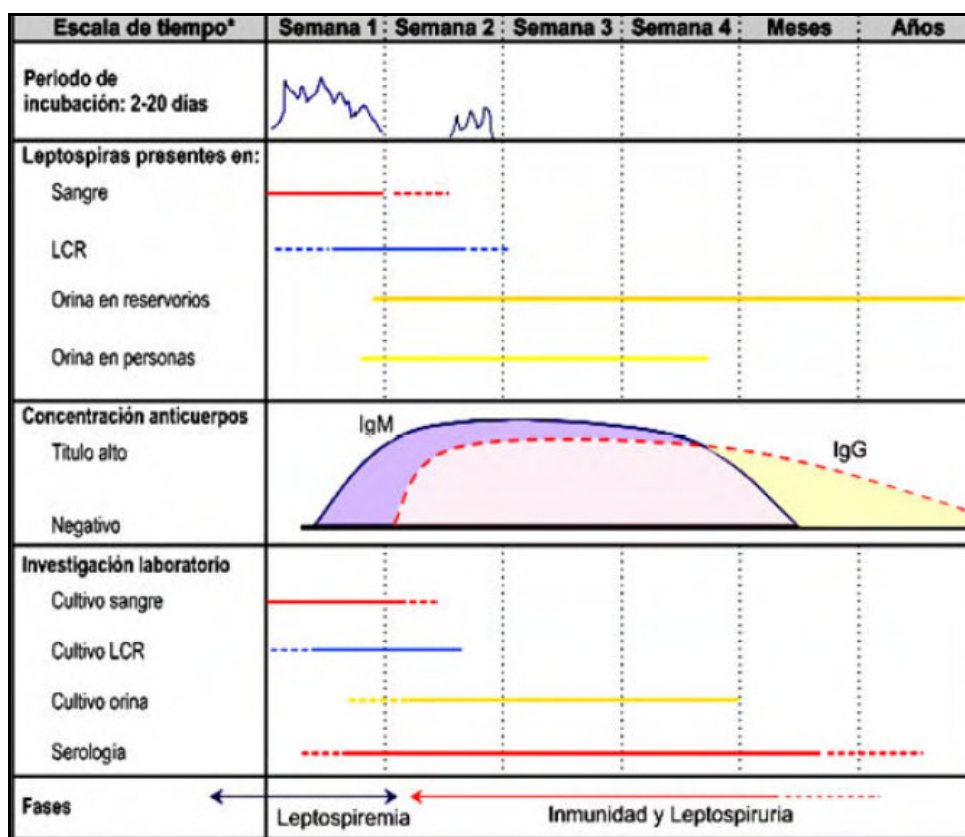


Figura 3. Estadios de la enfermedad en correlación con los momentos de toma de muestra.
(adaptado de Levett y Haake, 2010)

2.1.8.1 Examinación microscópica

Las leptospiras pueden ser visualizadas en el laboratorio por microscopia de campo oscuro, debido a su reducido tamaño. Para esto es necesario tener una muestra (sangre,

orina o líquido cefalorraquídeo) de aproximadamente 10^4 leptospiras/ml por campo. Lamentablemente, este examen diagnóstico tiene una sensibilidad y especificidad baja (Levett, 2004; Ahmad y Shah, 2005).

2.1.8.2 Aislamiento del agente

La detección de leptospiras mediante el cultivo representa un diagnóstico definitivo. Desafortunadamente, esta técnica no constituye un examen de rutina práctico para el diagnóstico por diferentes razones –periodo de incubación prolongado (hasta 3 meses, con exámenes semanales), requerimiento de muestras frescas de individuos que no hayan sido sometidos a tratamiento, peligro alto de contaminación del cultivo y baja especificidad (falsos negativos). El medio más usado para el cultivo es el medio semisólido Fletcher con adición de suero de conejo. En este se puede observar el crecimiento de las leptospiras macroscópicamente expresado en la formación de un halo, anillo de Dinger (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001; Adler y De La Pena Moctezuma, 2010).

2.1.8.3 Exámenes serológicos

La gran mayoría de casos de leptospirosis son diagnosticados mediante serología. Los anticuerpos IgM son detectados en la sangre a los 5-7 días después de la aparición de signos clínicos (Levett, 2004).

La prueba de aglutinación microscópica (MAT) es la prueba considerada “gold standard” para el diagnóstico de la leptospirosis. Esta tiene la ventaja de ser la única prueba específica para serogrupos; por lo tanto, tiene gran valor para estudios epidemiológicos. Entre las desventajas se destaca que no discrimina entre anticuerpos IgM e IgG, requiere de mucho presupuesto para mantener una batería de leptospiras vivas (usadas como antígeno) y para la lectura de la prueba se requiere de personal calificado y con mucha experiencia en el área (Ahmad y Shah, 2005; OIE, 2012).

El objetivo del MAT está basado en determinar el título máximo en el cual el 50% de leptospiras (antígeno vivo) de un campo (en el microscopio) se encuentran aglutinadas.

Estas aglutinaciones son directamente proporcionales a la cantidad de anticuerpos anti-leptospira en el suero evaluado. El punto de corte, titulación a partir del cual una muestra es considerada positiva, depende de diversos factores: especie animal, serovar prevalente en la región, presencia de co-aglutinaciones, vacunaciones, entre otros; usualmente es aceptada una titulación mínima de 1/400 acompañada de signos clínicos para confirmar al individuo como positivo para la enfermedad. Exámenes seriados (2 muestras con espacio de 15 días entre ellas) también son realizados para confirmar el diagnóstico.

Otros exámenes serológicos encontrados en el mercado son los ELISA. Estos exámenes tienen una alta sensibilidad, pero no tienen la especificidad de serotipo que da el MAT; sin embargo, son usados como primera línea diagnóstica de la leptospirosis humana en muchos países de América latina.

2.1.8.4 Exámenes moleculares

Existen diferentes protocolos de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) usados para la detección de ADN leptospiral. A lo largo de los años se han descrito diferentes protocolos usando primers generales, para leptospiras patógenas y no patógenas, y primers específicos para leptospiras patógenas; sin embargo, dos protocolos han sido los más usados para evaluación clínica y académica (Levett, 2004; Adler y De La Peña Moctezuma, 2010; Sedano 2014).

El protocolo desarrollado por Merien *et al.*, (1992) amplifica un fragmento de 331 pb usando los primers LEP1/LEP2 que codifican tanto para leptospiras patógenas como para no patógenas. El protocolo desarrollado por Brown *et al.*, (1995) que usa los primers G1/G2 no amplifica los serovares de la especie *L. kirschneri*. A pesar de las limitaciones de ambos protocolos, estos continúan siendo los de elección en el diagnóstico y la investigación.

Las muestras de las cuales se ha amplificado ADN leptospiral son: suero, orina, humor acuoso, líquido cefalorraquídeo y tejidos como riñón e hígado (Levett, 2004). El

PCR en tiempo real (qPCR) es más rápido y menos sensible a contaminantes que el PCR convencional. Existe un protocolo de PCR en tiempo real usando SYBR Green como fluorocromo que fue validado para muestras de orina y suero (Levett *et al.*, 2005).

A pesar de la alta sensibilidad de las técnicas moleculares para la detección de *Leptospira* spp., aún se tiene como limitante el hecho de que estas técnicas no son útiles en estudios epidemiológicos, p.e. determinar orígenes de brotes de leptospirosis; lo cual viene a ser un punto a favor para las técnicas serológicas, como el MAT.

2.1.9 Tratamiento

Los antibióticos son de gran utilidad en el tratamiento de la enfermedad. Se recomienda el uso de penicilinas o doxiciclinas para el tratamiento inicial en humanos y caninos. Este tratamiento debe iniciarse tan rápido como sea posible. En caninos la droga de elección para la eliminación de la bacteria de los tejidos es la doxiciclina. Ante la posibilidad de la administración de fármacos orales pueden usarse doxiciclina (5 mg/kg cada 12 horas) o amoxicilina (22 mg/kg cada 12 horas). Sin embargo, en la vía intravenosa es preferible usar ampicilina (22 mg/kg cada 12 horas) o amoxicilina (Goldstein, 2010).

Es importante realizar el tratamiento completo y con las dosis adecuadas para cada especie, debido a que, si bien el paciente puede mostrar una recuperación completa, las leptospiras pueden permanecer en los riñones -dejando a los infectados en condición de portadores y diseminadores (Sarkar *et al.*, 2012; Miraglia *et al.*, 2013). En el caso de los caninos, se usa la doxiciclina oral (5mg/kg cada 12 horas por 3 semanas) para eliminar a las bacterias de los tejidos y librar al animal del estado de diseminador (Goldstein, 2010).

En casos severos de leptospirosis animal se recomiendan altas dosis de penicilina intravenosa (hasta 4 veces al día). En casos menos severos (no comprometimiento de la función renal), antibióticos orales como amoxicilina, ampicilina, doxiciclina o eritromicina pueden ser prescritos. Las cefalosporinas de tercera generación y las quinolonas también se reportaron efectivas (WHO, 2003).

2.1.10 Prevención

Los programas de prevención en salud pública se enfocan en diferentes factores – adoptar medidas protectoras (vestimenta), evitar actividades de alto riesgo, limitar contacto con animales infectados y silvestres, implementar campañas de desratización, inmunizar y hacer uso de quimioprofilaxia. En poblaciones consideradas en riesgo (caso de agricultores en Asia y Francia), la inmunización es una estrategia adoptada y justificada (Acha y Szyfres, 2003; Levett y Haake, 2010).

En salud animal, una de las mejores estrategias de prevención es la inmunización. Actualmente se cuenta con vacunas efectivas tanto para los animales de producción como para animales domésticos. Para los primeros los principales serovares incluidas en la vacuna son *Leptospira interrogans* serovar Pomona, *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa, *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo, *Leptospira interrogans* serovar Canicola y *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae; para los segundos, se incluyen todos los anteriores con la excepción de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo (Hartskeerl *et al.*, 2011; Greene, 2013).

Debido al carácter general crónico de la enfermedad en animales de producción, lo cual convierte a estos animales en potenciales diseminadores, se recomienda el trabajo conjunto de la inmunización y adecuadas técnicas de manejo –Medidas de control de roedores, indumentaria protectora para los trabajadores y adecuado sistema sanitario (Zavitsanou y Babatsikou, 2008; Levett y Haake, 2010).

2.2 EL ZORRO SECHURANO (*Lycalopex sechurae*)

2.2.1 Generalidades

El Zorro de Sechura (*Lycalopex sechurae*) es una de las 35 especies de carnívoros reportadas en el Perú (Pacheco *et al.*, 2009). Este animal se caracteriza por el color general grisáceo del pelaje, coloración pálida del pelaje interno y pelos largos (de guarda) de color agouti: los miembros son blancos, beige o crema y la cara es de coloración gris, con un

anillo delgado marrón circundando los ojos, hocico oscuro y mentón y labio superior blancos (Thomas, 1900).



Figura 4. Ejemplar de *Lycalopex sechurae* (Fuente: Cossíos, 2010)

El zorro de Sechura es una especie omnívora. Su dieta incluye una gran cantidad de vegetales, principalmente frutos (Asa y Wallace, 1990; Landeo, 1992), con aumento considerablemente de consumo de vertebrados cuando disponibles (Asa y Wallace, 1990). Entre los alimentos de origen animal consumidos por este zorro se encuentran roedores, reptiles, aves, insectos, escorpiones, peces, crustáceos y carroña (Asa y Wallace, 1990), también se ha registrado a esta especie como consumidora de aves de corral (Aguilar *et al.*, 1977).

L. sechurae es de comportamiento nocturno (Asa y Wallace, 1990) y generalmente solitario; es poco frecuente encontrar un grupo de más de tres individuos. Usualmente se observan grupos más grandes donde la comida está concentrada (Asa y Cossíos, 2004)

Según la International Union for Conservation of Nature (IUCN), el zorro sechurano es una especie catalogada como casi amenazada (NT), siendo sus principales amenazas el mercado artesanal (amuletos y animales disecados) y la persecución por prejuicios en granjas (consumo de aves de corral y cobayas, consumo de vegetales almacenados y la creencia de la predación de cabras). También se relata el uso de especímenes o parte de ellos en prácticas mágico-religiosas por chamanes, con la finalidad de atraer espíritus buenos o energías positivas (Asa y Cossíos, 2008).

2.2.2 Taxonomía

Perteneciente a la clase Mammalia, orden Carnívora, familia Canidae, subfamilia Canidae (Wozencraft, 2005). Esta especie tiene como nombres comunes Zorro Sechurano, Zorro de Sechura, Zorro del desierto peruano y Zorro del desierto de Sechura. Otros nombres más coloquiales son Zorro Pacha, Juancito, Pacter, entre otros (Asa y Cossío, 2008). Fue documentado por primera vez por Thomas (1900).

Esta especie en un principio se reconoció dentro del género *Dusicyon* en 1945 por Simpson y, posteriormente Langguth en 1969 introduce el término *Pseudalopex* como subgénero de *Dusicyon*. Posteriormente, en 1987, se reconoce a *Pseudalopex* como un género totalmente distinto por Berta (Asa y Cossíos, 2004). Wozencraft (2005) incluye a esta especie dentro del género *Lycalopex*.

2.2.3 Distribución

Esta especie está distribuida desde el sur-oeste de Ecuador, hasta el oeste central del Perú (Asa y Cossíos, 2004). Su distribución hacia el sur no está definida, pero alcanza por lo menos 12 ° S en las proximidades de Lima, Perú (Pacheco, 2002), mientras que hacia el norte, su distribución llega hasta la Reserva Ecológica Arenillas en Ecuador (Freile y Santander, 2005).

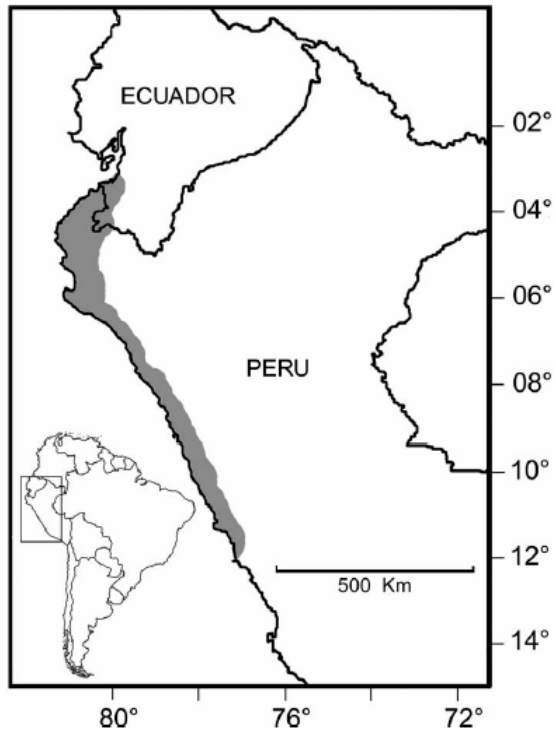


Figura 5. Distribución de *Lycalopex sechurae* en América del Sur. (Fuente: Asa y Cossíos, 2004)

III.MATERIALES Y METODOS

3.1 Lugar de ejecución

Las muestras fueron colectadas en la Comunidad Campesina de José Ignacio Tavera Pasapera (UTM 0582276 O, 9444257 S, 96msnm) ubicada entre las provincias de Tambogrande y Morropón, departamento de Piura (Perú) durante los años 2009 – 2012. Las muestras de cánidos domésticos fueron colectadas de cinco localidades en esta comunidad:

- Caserío "Malanguitas" (UTM 0582276 O, 9444257, 96 msnm). Perteneciente al distrito de Tambogrande, provincia de Piura, del Departamento de Piura (Perú).
- Caserío "el Recreo" (UTM 0582793 O, 9433738 S, 124 msnm). Perteneciente a la provincia de Morropón del Departamento de Piura (Perú).
- Caserío "Los Chuicas" (UTM 580256 O, 9444149 S). Perteneciente al distrito de Tambogrande, provincia de Piura, del Departamento de Piura (Perú).
- Caserío "Casaraná" (UTM 581224 O, 9441595 S). Perteneciente al distrito de Tambogrande, provincia de Piura, del Departamento de Piura (Perú).
- Anexo "Kilómetro 41" (UTM 579828 O, 9431364 S, 190 msnm). Perteneciente a la provincia de Morropón del Departamento de Piura (Perú).

Las muestras de cánidos silvestres (*Lycalopex sechurae*) fueron colectadas en las mismas cinco localidades, siendo la mayoría de las muestras provenientes del caserío “Malanguitas” Cabe resaltar que las muestras de Zorros de Sechura fueron colectadas como parte de un proyecto anterior, por lo tanto, no se tuvo contacto directo con los animales ni con la metodología empleada para la toma de muestras de estos animales.

El procesamiento de las muestras y el análisis de los resultados se realizaron en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología – Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2 Cálculo del tamaño de muestra

Para determinar el número mínimo de muestras necesario para el estudio se utilizó el programa Epi Info^{TD} (<http://www.openepi.com>). El número fue estimado para una población infinita, usando un poder predictivo del 90%, intervalo de confianza del 95% y basado en la frecuencia encontrada por Stokes *et al.* (2007) de 25%; resultando en un mínimo de 73 muestras.

3.3 Caracterización de las muestras

El material experimental fueron las muestras de sangre obtenidas de cánidos silvestres y caninos domésticos. Se analizaron 11 muestras de Zorros de Sechura (*Lycalopex sechurae*) y 80 muestras de caninos domésticos de la misma comunidad.

3.4 Procesamiento de las muestras

Las muestras de sangre obtenidas de los animales en estudio fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 5 minutos para obtener el suero sanguíneo. Posteriormente, el suero fue almacenado en microviales de 1.5 ml a -20 °C.

3.5 Materiales

- Medios de cultivo EMJH y Fletcher.

- Suero de conejo filtrado.
- Tubos de vidrio con tapa rosca de 10 ml.
- Pipetas graduadas de 1 y 10 ml.
- Gradillas.
- Centrífuga
- Microviales de 1.5 y 2 ml.
- Canaletas de 10 ml.
- Placas de inmunoensayos de 96 pocillos.
- Solución salina fisiológica (ClNa 0.85%)
- Pipetas Pasteur de vidrio.
- Pipeteadores de 10 ul, 300 ul y 1000 ul.
- Pipeteadores múltiples de hasta 300 ul.
- Tips de 10 ul, 300 ul y 1000 ul.
- Láminas portaobjetos.
- Microscopio de campo oscuro.

3.6 Prueba de Microaglutinación (MAT)

La prueba diagnóstica “gold standard” para el diagnóstico de leptospirosis es la prueba de Microaglutinación o Aglutinación microscópica (MAT). Esta prueba está basada en un test desarrollado por Martin y Pettit (1918) y modificado posteriormente por otros investigadores (Borg-Petersen y Fagroeus, 1949; Carbrey, 1960; Cole *et al.*, 1973; Postic *et al.*, 2000).

Esta prueba diagnóstica tiene como principio la visualización de aglutinaciones correspondientes a formaciones de complejos antígeno-anticuerpo. Utiliza como antígeno cepas vivas de *Leptospira* spp., las cuales son enfrentadas al suero problema. De acuerdo con el Subcomité Taxonómico sobre *Leptospira*, el título máximo de dilución es definido como la dilución del suero que muestra 50% de aglutinación, dejando el 50% de leptospiras

libres comparadas con el control negativo (International Committee on Systematic Bacteriology, 1984).

Para el estudio se utilizó esta técnica laboratorial conforme indicada en el manual de la OIE (“Manual of standards for diagnostic tests and vaccines”) (2014).

3.6.1. Serovares utilizados y preparación del antígeno

Para el estudio se utilizaron cepas de referencia para los 26 serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. que se han descrito y una cepa de referencia para un serogrupo no patógeno, constituyendo 27 serovares evaluados. Los serovares fueron proporcionados por el Laboratorio de Referencia internacional del Instituto Pasteur, París-Francia.

Cuadro 1. Serogrupos de *Leptospira* spp. incluidos en el estudio.

Nº	ESPECIE	SEROGRUPO	SEROVAR	CEPA
1	<i>Leptospira</i> spp.	Abramis	Abramis	Abraham
2	<i>L. biflexa</i>	Andamana	Andamana	CH11
3	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
4	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
5	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum	S102
6	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
7	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
8	<i>L. weilii</i>	Celledoni	ND	2011/01963
9	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
10	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
11	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
12	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
13	<i>L. fainei</i>	Hurtsbridge	Hurtsbridge	BUT6
14	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdun
15	<i>L. licerasiae</i>	Iquitos	Varillal	VAR10
16	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Poi
17	<i>L. noguchii</i>	Louisiana	Louisiana	LUC1945
18	<i>L. interrogans</i>	Manhao	Lincang	L14
19	<i>L. santarosai</i>	Mini	Georgia	LT117
20	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
21	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
22	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
23	<i>L. meyeri</i>	Ranarum	Ranarum	ICF

24	<i>L. weilii</i>	Sarmin	Sarmin	Sarmin
25	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
26	<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342 K
27	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin

Los serovares fueron almacenados en tubos que contenían medio semisólido Fletcher, un medio especial para mantenimiento de *Leptospira* spp., en el cual el crecimiento de estas bacterias (en la gran mayoría de casos) es manifestado por la presencia del “anillo o disco de Dinger”.

La preparación del antígeno consistía en cultivar 0.5 ml del tubo con medio Fletcher previamente evaluado (presencia de anillo de Dinger y/u observación microscópica) en tubos de 5 ml de medio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) y dejar incubar a 28 °C por 5-8 días. De ahí en adelante los cultivos se realizaron dispensando 0.5 ml de medio EMJH previamente evaluado microscópicamente (observándose presencia de leptospiras en movimiento) a otro tubo conteniendo 5 ml del mismo medio. Estos cultivos se realizaron semanalmente durante el tiempo que duró el estudio.

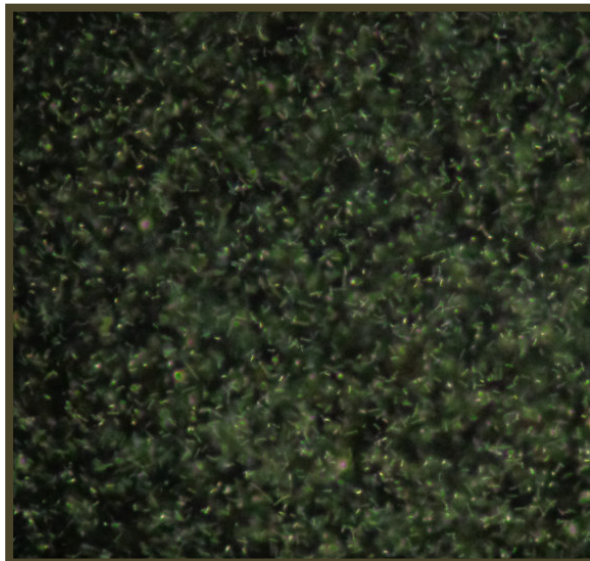


Figura 6. Observación microscópica de *Leptospira* spp. de un tubo de EMJH. (Fuente: propia)

3.6.2. Primera parte: tamizaje

La prueba se realizó en dos etapas: tamizaje o “screening” y titulación. El objetivo de la separación en dos etapas fue el de economizar recursos -menos antígeno y menos material a utilizar. Además, estas dos etapas de la prueba diagnóstica se encuentran aceptadas, validadas y son usadas en laboratorios de referencia para leptospirosis (WHO, 2003).

Los pasos de la etapa de “Screening” fueron modificados de acuerdo a las condiciones del laboratorio, respetando los principios de la prueba. El protocolo indicado es el siguiente:

- a. Preparar una dilución de 1:50 del suero problema con solución salina fisiológica. Los volúmenes para la dilución fueron 5 ul del suero problema con 245 ul de la solución salina.
- b. Dispensar por duplicado (preferencialmente en horizontal) 50 ul de la solución anterior en los pocillos de las placas de inmunoensayos. Repetir este procedimiento por cada serovar a ser evaluado.
- c. Agregar 50 ul de solución salina fisiológica (CINa 1 0.85%) al pocillo que será usado como control negativo.
- d. Dispensar 50 ul del antígeno (serovar de *Leptospira* spp. a ser evaluado) en ambos pocillos de cada muestra y en el pocillo del control negativo.
- e. Cubrir la placa de inmunoensayos e incubar en estufa de 28 °C por 2 horas.
- f. Dispensar 2.5 ul de cada uno de los pocillos a una lámina portaobjetos y realizar la lectura en el microscopio de campo oscuro.

El criterio de positividad para una muestra problema indica que se debe tener por lo menos el 50% de leptospiras aglutinadas en el campo observado, dejando el 50% de leptospiras libres, en comparación con el control negativo usado (International Committee on Systematic Bacteriology, 1984; OIE, 2014). Por lo que todas muestras que presentaron

el 50% de aglutinaciones por campo se consideraron como positivas para el “screening” y pasaron a la etapa de titulación.

3.6.3. Segunda parte: titulación

Las muestras que fueron consideradas positivas o “sospechosas” pasaron a la segunda etapa de la prueba para determinar el título máximo. El protocolo indicado es el siguiente:

- a. Preparar una dilución de 1:50 del suero problema con solución salina fisiológica. Los volúmenes fueron 5 ul del suero problema con 245 ul de la solución salina.
- b. Dispensar 100 ul de la solución preparada anteriormente en el primer pocillo de la placa de inmunoensayos (de preferencia en forma vertical) (solución A).
- c. Agregar 50 ul de solución salina fisiológica (CINa al 0.85%) al pocillo del control negativo y a cada pocillo posterior al que contiene la solución A. No agregar solución salina al pocillo con solución A.
- d. Dispensar 50 ul de la solución A al siguiente pocillo (preferencialmente en horizontal) y homogenizar de unas 10 a 15 veces (solución B). Repetir la acción esta vez dispensando 50 ul de la solución B al siguiente pocillo y así sucesivamente hasta haber creado 4 diluciones: 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800.
- e. Dispensar 50 ul del antígeno a evaluar en los pocillos con las diluciones y al pocillo del control negativo. Luego de esto se formarán 5 diluciones: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600. Cada columna corresponderá a un antígeno evaluado.
- f. Cubrir la placa de inmunoensayos e incubar en estufa de 28 °C por 2 horas.
- g. Dispensar 2.5 ul de cada uno de los pocillos a una lámina portaobjetos y realizar la lectura en el microscopio de campo oscuro.

El resultado de la prueba se evalúa con el mismo criterio que en el “screening”, donde un suero problema es considerado positivo o reactivo si se observa un 50% de aglutinaciones, con respecto al control negativo. El punto de corte utilizado para determinar a un animal seropositivo fue de 1/100.

3.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados como medidas de ocurrencia. Las frecuencias obtenidas fueron procesadas utilizando el software estadístico SAS 9.2.

IV. RESULTADOS

Los resultados de la prueba de Microaglutinación (MAT) con 27 serovares de *Leptospira* spp. (Cuadro 2) realizada en las 91 muestras de suero sanguíneo de cánidos domésticos y silvestres, indicaron que un 53.85% (49/91) de la población total evaluada presentó títulos para al menos un serovar estudiado.

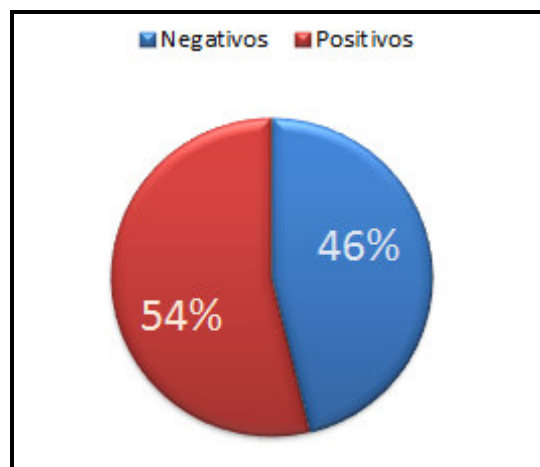


Figura 7. Distribución de resultados de la prueba de Microaglutinación (MAT). Se observó un porcentaje mayor de animales seropositivos.

De los caninos domésticos muestreados, 56.25% (45/80) fueron seroreactores a la prueba de Microaglutinación (MAT). Por otro lado, de los Zorros de Sechura (cánidos

silvestres) evaluados, 36.36% (4/11) resultaron seropositivos para al menos un serovar de *Leptospira* spp. (figura 8).

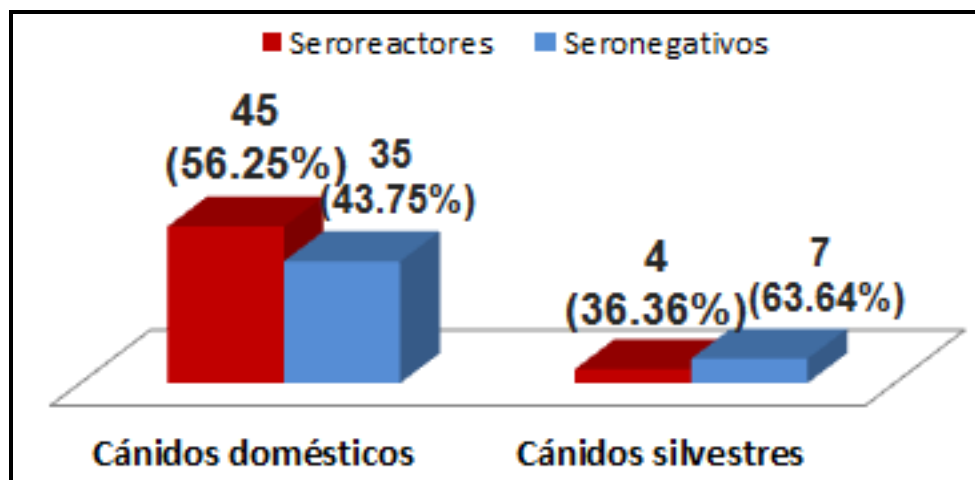


Figura 8. Distribución de los resultados por tipo de cánidos. Se observó un mayor porcentaje de seroreactores en el grupo de los caninos domésticos y un mayor porcentaje de seronegativos en el grupo de los cánidos silvestres (Zorros de Sechura).

4.1. Caninos domésticos.

Con referencia a los caninos domésticos, se observó que los caninos fueron seroreactores a 12 serogrupos patógenos de los 27 serogrupos totales. La seroreactividad se presentó ante los serogrupos Autumnalis, Bataviae, Canicola, Cynopteri, Djasiman, Louisiana, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi, Ballum, Hurstbridge e Iquitos.

Del total de animales seroreactores (45), las frecuencias observadas por serogrupo en la prueba de Microaglutinación (MAT), fueron: 2.2% (1/45) Autumnalis, 4.4% (2/45) Bataviae, 6.7% (3/45) Ballum, 11.1% (5/45) Canicola, 2.2% (1/45) Cynopteri, 6.7% (3/45) Djasiman, 6.7% (3/45) Hurtsbridge, 84.4% (38/45) Iquitos, 2.2% (1/45) Louisiana, 2.2% (1/45) Pomona, 2.2% (1/45) Pyrogenes y 2.2% (1/45) Tarassovi (Cuadro 2).

Cuadro 2. Títulos aglutinantes máximos de los caninos domésticos en la prueba MAT.

Serogrupo	Serovar	Titulación					Total	Frecuencia
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600		
Autumnalis	Autumnalis	1	-	-	-	-	1	2.2 %
Bataviae	Bataviae	2	-	-	-	-	2	4.4 %
Ballum	Ballum	1	2	-	-	-	3	6.7 %
Canicola	Canicola	3	2	-	-	-	5	11.1 %
Cynopteri	Cynopteri	-	1	-	-	-	1	2.2 %
Djasiman	Djasiman	1	1	1	-	-	3	6.7 %
Hurtsbridge	Hurtsbridge	-	2	1	-	-	3	6.7 %
Iquitos	Varillal	9	12	13	3	1	38	84.4 %
Louisiana	Louisiana	-	1	-	-	-	1	2.2 %
Pomona	Pomona	-	-	1	-	-	1	2.2 %
Pyrogenes	Pyrogenes	-	1	-	-	-	1	2.2 %
Tarassovi	Tarassovi	1	-	-	-	-	1	2.2 %

Con respecto a la cuantificación del resultado de la prueba de Microaglutinación, la mayoría de animales seropositivos presentaron títulos máximos de 1/100 y 1/200, títulos denominados comúnmente como de exposición. Sólo se presentaron títulos máximos de 1/800 y 1/1600 en el serovar Varillal del serogrupo Iquitos (cuadro 2).

Los caninos domésticos fueron muestreados en cinco localidades ubicadas dentro de la comunidad estudiada. En el caso de “Malanguitas”, “Chuicas” y el “Km 41”, más del 50% de los animales muestreados fue seroreactor en la prueba de MAT; mientras que en el “Recreo” y “Casaraná” más del 50% de los caninos fue seronegativo a dicha prueba diagnóstica (cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de la prueba de Microaglutinación (MAT) de los caninos domésticos según local de muestreo.

Resultado	“Malanguitas”	“Recreo”	“Chuicas”	“Casaraná”	“Km 41”	Total
Seroreactores	28	4	5	3	5	45
Seronegativos	16	8	3	4	4	35
Total	44	12	8	7	9	80

En la evaluación de seroreactividad según lugar de muestreo, se observó que el dato más sobresaliente fue que más del 50% de caninos muestreados en “Malanguitas” (26/44) fue seroreactor al serogrupo patógeno Iquitos, repitiéndose los resultados para las localidades “Recreo”, “Casaraná” y “Km 41” (cuadro 6).

Cuadro 4. Caninos domésticos seroreactores según lugar de muestreo y serogrupo evaluado.

	“Malanguitas”	“Recreo”	“Chuicas”	“Casaraná”	Km 41	Total
Autumnalis	-	-	1	-	-	1
Bataviae	2	-	-	-	-	2
Ballum	2	-	1	-	-	3
Canicola	4	-	1	-	-	5
Cynopteri	1	-	-	-	-	1
Djasiman	1	-	1	-	1	3
Hurtsbridge	1	-	1	1	-	3
Iquitos	26	4	2	3	3	38
Louisiana	1	-	-	-	-	1
Pomona	1	-	-	-	-	1
Pyrogenes	1	-	-	-	-	1
Tarassovi	-	-	-	-	1	1

Para la evaluación según edad se determinaron tres grupos etarios: de 0 a 24 meses, entre 25 y 72 meses, y 73 meses. Se determinó que el mayor porcentaje de los animales seroreactores según grupo etario se presentó en los caninos mayores de 73 meses, constituyendo un 62.5% (5/8), seguido por los caninos de entre 25 a 72 meses (57.1%) y por último, los caninos domésticos menores de 24 meses (54.5%).

Cuadro 5. Resultados de la prueba de Microaglutinación de los caninos domésticos según grupos etarios.

Edad en meses				
Resultado	De 0 a 24 m	De 25 a 72 m	De 73 m a más	Total
Seroreactores	24	16	5	45
Seronegativo	20	12	3	35
Total	44	28	8	80

En la evaluación según sexo se determinó que un 56.2% (41/73) de los caninos domésticos machos muestreados fueron seroreactores a por lo menos un serogrupo de *Leptospira* spp. evaluado; mientras que un 57.1% (4/7) de las hembras fueron seroreactores (cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados de la prueba de Microaglutinación de los caninos domésticos según sexo.

Sexo			
Resultado	Hembras	Machos	Total
Seroreactores	4	41	45
Seronegativo	3	32	35
Total	7	73	80

4.2. Zorros Sechuranos (cánidos silvestres).

Con respecto a los cánidos silvestres, representados por los Zorros de Sechura, se observó seroreactividad a tres serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. evaluados (figura 10). La seroreactividad se presentó para los serogrupos Javanica (50%, 2/4), Iquitos (75%,3/4) y Tarassovi (50%, 2/4). Con respecto a la titulación de la prueba de Microaglutinación, los animales seroreactores presentaron títulos máximos de 1/100 y 1/200, títulos denominados comúnmente como de exposición (cuadro 7).

Cuadro 7. Títulos aglutinantes de los cánidos silvestres en la prueba de Microaglutinación.

Serogrupo	Serovar	Titulación					Total
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	
Javanica	Javanica	2	-	-	-	-	2
Iquitos	Varillal	-	2	-	-	-	2
Tarassovi	Tarassovi	1	2	-	-	-	3

Según los datos obtenidos solo se pudo realizar la evaluación según sexo. En esta parte se observó que un 60% (3/5) de los Zorros Sechuranos machos fueron seroreactores y que un 16.7% (1/6) de las hembras fueron seroreactores (cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados de la prueba de Microaglutinación de los cánidos silvestres según sexo.

Resultado	Sexo		Total
	Hembra	Macho	
Positivo	1	3	4
Negativo	5	2	7
Total	6	5	11

V. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue el de determinar la seroreactividad a serogrupos patógenos de *Leptospira* spp de los Zorros Sechuranos y caninos domésticos que cohabitan el mismo espacio geográfico. Para dicho fin, se utilizaron 26 serovares de serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. y un serovar saprófito.

La prueba utilizada para este estudio fue la prueba denominada como “gold standard” para el diagnóstico de leptospirosis, la prueba de Microaglutinación (MAT). Entre las ventajas que presenta esta método diagnóstico está el poder epidemiológico que tiene, ya que esta es la única prueba diagnóstica para esta zoonosis que es capaz de determinar el serogrupo infectante y cuantificar el título de infección; lo cual la hace superior para estudios de tipo transversales en comparación con otras herramientas más sofisticadas, como PCR.

Los resultados indican que un 53.85% del total de caninos muestreados (domésticos y silvestres) se mostraron reactivos para al menos un serogrupo evaluado. Solamente en la población de caninos domésticos se determinó un 56.25% (45/80) de animales seroreactores a la prueba de Microaglutinación. Esta frecuencia encontrada muestra ser mayor que los datos registrados en otros estudios realizados en latinoamérica. En un estudio realizado en el departamento de Tolima, Colombia, se determinó una frecuencia de

infección de 21.4% en caninos (Romero *et al.*, 2010). En otro estudio realizado esta vez en Valdivia, Chile, se determinó una frecuencia de 14.8% de caninos de la zona rural y urbana atendidos en una clínica veterinaria de la misma ciudad (Silva y Riedemann, 2007). Las bajas frecuencias encontradas en estos estudios pueden deberse a la cantidad de serogrupos utilizados, 6 en Tolima y 8 en Valdivia, lo cual podría estar disminuyendo la sensibilidad de la prueba limitando su poder diagnóstico. El estudio del cual se tomó la frecuencia base de 25% fue realizado en Michigan, EEUU, por Stokes *et al.* (2007) con 6 serovares de *Leptospira* spp.

Ya en el Perú, se tiene conocimiento de un estudio realizado en humanos y perros en Huaral, en el que se determinó una seroprevalencia de 27.8% en caninos domésticos (Céspedes *et al.*, 2007). Un estudio reciente realizado por Siuce (2014), determinó una frecuencia de 58.03% en una población de caninos domésticos con diagnóstico clínico presuntivo de leptospirosis. Cabe resaltar que en los estudios realizados por ambos investigadores el número de serogrupos utilizados fue de 18 y 25, respectivamente, incrementando el nivel de sensibilidad de la prueba en ambos casos. La frecuencia encontrada específicamente para caninos domésticos en este estudio (56.25%) puede ser comparada con el trabajo de Siuce *et al.* (2014), ya que en el último trabajo se utilizaron 25 de los 27 serogrupos utilizados en este estudio; incluyendo al serogrupo patógeno Iquitos, recientemente aislado en la Amazonía Peruana y reportado como agente causal de leptospirosis humana (Matthias *et al.*, 2008).

Estas frecuencias similares entre el presente estudio y el de Siuce (2014) pueden deberse en parte a la batería de *Leptospira* spp. usada como antígeno, el cual fue muy similar e incrementó la sensibilidad de ambos estudios; sin embargo, ya que las muestras en el presente estudio eran de una población canina asintomática y sin vacunación reciente para leptospirosis, los resultados no podrían compararse tanto como con el estudio de Céspedes *et al.* (2007), en el cual el muestreo de los animales fue aleatorio (similar al de este estudio) y se usó una batería de 18 serovares de *Leptospira* spp. Con todo esto, una

frecuencia de 56.25% de seroreactores representa el doble de la frecuencia encontrada por el último autor, además de ser una alerta importante de la diseminación de los distintos serogrupos de *Leptospira* spp entre el territorio peruano.

El serogrupo más frecuente en la población de caninos domésticos fue Iquitos (84.44%, 38/45) seguido por Canicola (11.11%, 5/45). El serogrupo Iquitos también fue el que reportó los títulos más altos, 1/800 y 1/1600. Este serogrupo pertenece a la especie *Leptospira licerasiae*, la cual fue aislada por Matthias *et al.* (2008) de pacientes humanos con enfermedad febril aguda en la amazonía peruana. El serovar Varillal de este serogrupo patógeno, evaluado como el más frecuente en este estudio, ha sido reportado como uno de los más reactivos en los casos de leptospirosis humana en Perú (Céspedes *et al.*, 2006). Con los resultados de este estudio que confirman la presencia significativa de este serogrupo patógeno oriundo del Perú, se puede ratificar la amplia distribución del mismo por nuestro territorio, reportándolo ahora en caninos asintomáticos de Piura.

Con respecto a la procedencia de los caninos domésticos seroreactores, la gran mayoría (62.22%, 28/45) fueron del lugar de muestreo “Malanguitas”, este resultado tiene concordancia con el hecho de que la mayoría de los animales (55%, 44/80) fueron muestreados en esta localidad. Con respecto a la evaluación según edad, se determinó que de los tres grupos etarios en este estudio, el grupo de los caninos mayores de 73 meses presentó más animales seroreactores (62.5%). Este último resultado tiene concordancia con el trabajo realizado por Huerta *et al.* (2013) en Lima, en el cual se evaluó edad, tamaño y sexo como factores de riesgo para la presentación de leptospirosis en caninos. Lo encontrado sería explicado por la mayor exposición de los perros adultos de seroreaccionar para diversas enfermedades por el contacto y exposición más prolongado que los caninos más jóvenes.

Con respecto a la evaluación según edad, esta demostró que en el grupo de las hembras se encontró una frecuencia ligeramente mayor de seroreactores (57.1%) en

comparación con los machos (56.2%). Este último dato muestra ser contradictorio con la evaluación realizada por Huertas *et al.* (2013) y esto podría deberse a que el grupo de hembras evaluado fue de 7 muestras, casi 10 veces menor a la cantidad de caninos machos en el estudio, lo que aumentó las probabilidades de encontrar resultados poco representativos en esta última evaluación.

En los cánidos silvestres se ha reportado la seroreactividad a diferentes serogrupos de *Leptospira* spp., especialmente en el continente americano y tanto en animales de vida libre como de cautiverio. Dentro de los estudios realizados en cánidos silvestres tenemos, por ejemplo, el estudio en el Parque Nacional del Climaterio, en Querétaro, México, donde se encontró una prevalencia de *Leptospira* spp. en coyotes y en zorras grises del 63.6 % y 72.3 %, respectivamente (Hernández *et al.*, 2010). Otro estudio, realizado en la zona del Pantanal Norte en Brasil por la Universidad de São Paulo, evidenció una frecuencia del 42,7 % de carnívoros salvajes, donde se incluían entre las especies estudiadas al zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*), el aguara guazú (*Chrysocyon brachyurus*), el perro venadero (*Speothos venaticus*), entre otros (Pinto *et al.*, 2011). En una investigación realizada en Croacia, en los zorros rojos (*Vulpes vulpes*), se evidenció que el 33.8% de los animales estudiados fueron positivos a 11 serovares de *Leptospira* spp (Slavica *et al.*, 2011). Mientras que en un estudio realizado en cánidos de vida libre en Escandinavia y Svalbard, se encontró que un 10 % de la población de zorros rojos estudiados tuvieron títulos de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (Akerstedt *et al.*, 2010).

En el Perú y en el mundo no se han realizado muchos estudios concernientes a cánidos silvestres, y hasta la fecha no se han relatado trabajos de frecuencia de enfermedades que involucren al zorro Sechurano (*Lycalopex sechurae*) entre las especies estudiadas, por lo que no se tiene registro del estado sanitario de esta especie de cánido silvestre tan común en el desierto peruano. Siendo el Zorro Sechurano una especie catalogada como casi amenazada según la IUCN todo estudio referente a esta especie es importante para estrategias de prevención, antes de que pase a ser considerada una especie amenazada.

Según los resultados del presente trabajo, un 36.36% (4/11) de los Zorros Sechuranos fueron seroreactores a por lo menos un serovar de *Leptospira* spp., con Tarassovi, Iquitos y Javanica como serogrupos reactivos, siendo los dos primeros serogrupos reactivos también en los caninos domésticos. Con lo último se puede colegir que existe un grado de contacto/exposición entre los caninos domésticos y cánidos silvestres, al presentar ambos una respuesta serológica semejante a dos serogrupos estudiados. El mismo principio de contacto/exposición podría extrapolarse a un contacto animal-humano, para confirmar esto sería necesario un estudio que involucrara tanto a los humanos como a los caninos.

El último paso en la prueba diagnóstica es la determinación de los títulos aglutinantes de las muestras que seroreaccionaron. La gran mayoría de los títulos fueron de 1/100 y 1/200, tanto en los caninos domésticos como en los cánidos silvestres, títulos relativamente bajos que pueden ser explicados por un contacto o exposición previa que haya ocasionado que los animales generen anticuerpos contra el serovar infectante; títulos altos (1/400, 1/800 y 1/1600) fueron determinados en el serogrupo Iquitos, y dado que los animales muestreados eran asintomáticos se podría asumir una posible adaptación de este serogrupo a los caninos domésticos muestreados.

Tanto los caninos domésticos como los cánidos silvestres tienen potencial de agentes diseminadores de enfermedades, pero los caninos domésticos además pueden transmitir diversos agentes infecciosos a los cánidos silvestres, dependiendo de la susceptibilidad de la especie silvestre (Cleaveland *et al.*, 2001; Knobel *et al.*, 2014). En las zonas rurales como la comunidad estudiada, donde los caninos domésticos no son mantenidos las 24 horas del día dentro de las casas, el comportamiento ambulatorio y explorador propio de los caninos puede permitir un contacto con agentes patógenos y la posterior diseminación de estos agentes a otras especies cohabitantes (Medina-Vogel, 2010). Si bien en el presente estudio sólo se identificaron dos serogrupos, Iquitos y Tarassovi, común entre ambas especies estudiadas, esta información ya es indicativa de un

posible contacto entre los caninos domésticos y cánidos silvestres de la región, el mismo que podría estar ayudando a la propagación de diversos agentes infecciosos entre esas especies.

Es sabido que los caninos domésticos son animales considerados y usados en investigación por muchos autores como centinelas, para conocer el estado sanitario de una población con respecto a algunas enfermedades zoonóticas, como leptospirosis (Sepulveda *et al.*, 2002; Brod *et al.*, 2005; Modolo *et al.*, 2006; Céspedes *et al.*, 2007). Además, los caninos domésticos tienen amplio potencial para auxiliar en la investigación de diversas enfermedades en el campo de la salud pública, por sus características de permanecer en contacto con humanos y otros animales, y poder consecuentemente diseminar agentes infecciosos a las especies con las que interactúan o cohabitan. Por este motivo la investigación del estado sanitario de estos animales, especialmente enfocado al estudio de las zoonosis, es de vital importancia para conocer las posibles enfermedades que estén circulando en una región.

VI. CONCLUSIONES

- Los caninos domésticos que habitan la comunidad campesina “José Ignacio Távara Pasapera” en Piura, Perú, presentan anticuerpos contra 12 serogrupos patógenos de *Leptospira* spp.: Autumnalis, Bataviae, Ballum, Canicola, Cynopteri, Djasiman, Hurstbridge, Iquitos, Javanica, Louisiana, Pomona, Pyrogenes y Tarassovi. Siendo los más frecuentes los serogrupos Iquitos y Canicola.
- Los Zorros sechuarons que habitan la comunidad campesina “José Ignacio Távara Pasapera” en Piura, Perú, presentan anticuerpos contra 3 serogrupos patógenos de *Leptospira* spp.: Iquitos, Tarassovi y Javanica. Siendo el más frecuente el serogrupo Tarassovi.

VII. LITERATURA CITADA

1. Acha PN, Szyfres B. 2003. Leptospirosis. In Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington, EUA. 175-186 p.
2. Adler B. 2014. Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects. *Veterinary microbiology*, 172(3): 353-358.
3. Adler B, De la Pena Moctezuma A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary microbiology*, 140(3):287-296.
4. Aguilar P, Beingolea O, Brack A, Ceballos I. 1977. Vertebrados importantes en la agricultura peruana. *Revista Peruana de Entomología*. 20: 25- 32.
5. Agunloye CA., Nash AS. 1996. Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. *Journal of small animal practice*, 37(3):126-129.
6. Ahmad SN, Shah S. 2005. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Journal of postgraduate medicine*, 51(3):195.
7. Akerstedt J, Lillehaug A, Larsen I, Elde N, Arnemo J, Handeland K. 2010. Serosurvey for canine distemper virus, canine adenovirus, *Leptospira interrogans* and *Toxoplasma gondii* in free-ranging canids in Scandinavia and Svalbard. *Journal of wildlife diseases*, 46(2):474-480
8. André-Fontaine G. 2006. Canine leptospirosis—Do we have a problem?. *Veterinary microbiology*, 117(1):19-24.

9. Asa CS, Cossíos ED, Williams R. 2008. *Pseudalopex sechurae*. IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. [Internet], [10 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/details/6925/0>
10. Asa CS, Cossíos ED. 2004. Sechuran fox. En: Sillero-Zubiri C, Hoffmann M, Macdonald DW, eds. Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan. 1ª ed. Switzerland: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources/Species Survival Commission Canid Specialist Group. p 69–72.
11. Asa CS, Wallace MP. 1990. Diet and activity pattern of the Sechuran desert fox (*Dusicyon sechurae*). *Journal of Mammalogy*. 71: 69-72.
12. Bernardi FDC, Ctenas B, Da Silva LFF, Nicodemo AC, Saldiva PHN, Dolhnikoff M, Mauad T. 2012. Immune receptors and adhesion molecules in human pulmonary leptospirosis. *Human pathology*,43(10):1601-1610.
13. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Peru—United States Leptospirosis Consortium. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet infectious diseases*, 3(12):757-771.
14. Borg-Petersen C, Fagroeus A. 1949. The influence of the antigen density and other factors on the serum titer in the agglutination-lysis-test for leptospirosis. *Acta Pathologica*, 26:1-4.
15. Brod CS, Aleixo JAG, Jouglard SDD, Fernandes CPH, Teixeira JLR, Dellagostin OA. 2005. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(4): 294-300.
16. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, Van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Levett, P. 1995. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of medical microbiology*, 43(2):110-114.
17. Carbrey EA. 1960. The relative importance of variable factors in the agglutination-lysis test. *Annual Proceedings of the United States Livestock Sanitary Association*, 64:130-142.

18. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1994. Summary of notifiable diseases, United States, 1993. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 42(53).
19. Cerqueira GM, Picardeau M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5):760-768.
20. Céspedes M, Balda L, González D, Tapia R. 2006. Situación de la leptospirosis en el Perú 1994-2004. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 23(1):56-66.
21. Céspedes M, Chu M, Cano E, Huaranca I, Atoche H, Ortiz H, Huamán T. 2007. Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en personas asintomáticos y en perros de Chancay, Lima 2001. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 24(4): 343-349.
22. Charon NW, Goldstein SF. 2002. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annual Review of Genetics*, 36(1):47-73.
23. Chen TZ. 1985. Development and situation of and techniques for production of leptospirosis vaccine in China. *Jpn J Bacteriol*, 40:755-62.
24. Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Møller AK, Matsunaga J, Haake DA. 2007. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infection and immunity*, 75(5):2441-2450.
25. Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH. 2001. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B* 356:991–999.
26. Cole JR, Sulzer CR, Pursell AR. 1973. Improved microtechniques for the leptospiral agglutination test. *Applied Microbiology*, 25:976-980.
27. Corney BG, Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, McClintock CS, McGowan MR, Smythe LD. 2008. *Leptospira weilii* serovar Topaz, a new member of the Tarassovi serogroup isolated from a bovine source in Queensland, Australia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(10): 2249-2252

28. Cossíos E. 2005. Dispersión y variación de la capacidad de germinación de semillas ingeridas por el zorro costeño (*Lycalopex sechurae*) en el Santuario Histórico Bosque de Pómac, Lambayeque. Tesis de Magister en Zoología. Lima. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 70 p.
29. Cullen PA, Haake DA, Adler B. 2004. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS microbiology reviews*, 28(3):291-318.
30. Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B. 2005. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infection and immunity*, 73(8):4853-4863.
31. Das Neves Paiva-Cardoso M, Arent Z, Gilmore C, Hartskeerl R, Ellis WA. 2013. Altodouro, a new *Leptospira* serovar of the Pomona serogroup isolated from rodents in northern Portugal. *Infection, Genetics and Evolution*, 13:211-217.
32. Dupouey J, Faucher B, Edouard S, Richet H, Kodjo A, Drancourt M, Davoust, B. 2014. Human leptospirosis: An emerging risk in Europe?. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 37(2):77-83.
33. Evangelista KV, Coburn J. 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future microbiology*, 5(9):1413-1425.
34. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat, P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. Medisci, Melbourne.
35. Freile JF, Santander T. 2005. Áreas importantes para la conservación de las aves en Ecuador. Áreas importantes para la conservación de las aves en los Andes tropicales: sitios prioritarios para la conservación de la biodiversidad. BirdLife International and Conservation International, Quito, Ecuador. 283-470 p.
36. Goldstein RE. 2010. Canine leptospirosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(6):1091-1101.
37. Goncalves-de-Albuquerque CF, Burth P, Silva AR, Younes-Ibrahim M, Castro-Faria-Neto HC, Castro-Faria MV. 2012. *Leptospira* and inflammation. *Mediators of inflammation*.
38. Greene CE. 2013. *Infectious diseases of the dog and cat*. Elsevier Health Sciences.

39. Guerra MA. 2013. Leptospirosis: public health perspectives. *Biologicals*,41(5):295-297.
40. Hamond C, Pinna A, Martins G, Lilenbaum W. 2014. The role of leptospirosis in reproductive disorders in horses. *Tropical animal health and production*, 46(1):1-10.
41. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clinical microbiology and infection*, 17(4):494-501.
42. Hernández N, López C, Guerrero M. 2010. Seroprevalencia de *Leptospira interrogans*, hematología y perfil bioquímico en cánidos silvestres del Parque Nacional El Climatarío, Querétaro, México. *Therya*, 1(2):121-128
43. Hookey JV, Bryden J, Gatehouse L. 1993. The use of 16S rDNA sequence analysis to investigate the phylogeny of Leptospiraceae and related spirochaetes. *Journal of general microbiology*, 139(11):2585-2590.
44. Huerta C, Chilón V, Díaz D. 2013. Estudio de caso-control para evaluar factores de riesgo en la presentación de Leptospirosis canina en la ciudad de Lima. *Rev. investig. vet. Perú* v.24 n.1
45. Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H. 1916. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). *The Journal of experimental medicine*, 23(3):377-402.
46. International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*. Minutes of the meeting, 6 to 10 August, 1982, Boston, Massachusetts, USA. 1984. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34:258-259.
47. Janwitthayanan W, Keelawat S, Payungporn S, Lowanitchapat A, Suwancharoen D, Poovorawan Y, Chirathaworn C. 2013. In vivo gene expression and immunoreactivity of *Leptospira* collagenase. *Microbiological research*, 168(5):268-272.
48. Johnson RC, Rogers FC. 1964. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire with 8-azaguanine. *Journal of Bacteriology* 88:1618-1623.
49. Kmety E, Dikken H. 1993. Classification of the Species *Leptospira interrogans* and History of its Serovars. University Press, Groningen, Netherlands.

50. Knobel D, Butler JRA, Lembo T, Critchlow R, Gompper ME. 2014. Dogs, disease, and wildlife. En: Gompper ME, eds. Free-ranging dogs and wildlife conservation. 1ra ed. Oxford: OxfordUniversityPress.144–169 p.
51. Koizumi N, Watanabe H. 2005. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *Journal of postgraduate medicine*, 51(3):210.
52. Landeo C. 1992 Impacto del zorro de Sechura *Pseudalopex sechurae* sobre el ganado caprino en el Coto de Caza “El Angolo” - Piura. Tesis para optar el grado de Magíster Scientiae en la especialidad de Conservación de Recursos Forestales. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.
53. Laurichesse H, Gourdon F, Smits HL, Abdoe TH, Estavoyer JM, Rebika H, Beytout J. 2007. Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers. *Clinical microbiology and infection*, 13(4):395-403.
54. Lehmann JS, Matthias MA, Vinetz JM, Fouts DE. 2014. Leptospiral pathogenomics. *Pathogens*, 3(2): 280-308.
55. Leighton FA. 2001. Leptospirosis in *Infectious diseases in wild mammals*. Williams, E. S., y I. K. Barker Eds. Tercera edición. Iowa State University Press. Pp. 498-502
56. Leptospirosis OIE. 2012. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2008. Capítulo, 2(9): 186-190.
57. Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 14:296–326.
58. Levett, PN. 2004. Leptospirosis: A forgotten zoonosis?. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4(6):435-448.
59. Levett PN., Haake DA. 2010. *Leptospira* species (leptospirosis). *Principles and practice of infectious diseases*, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 3059-3065.
60. Levett, PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 54(1):45-49.

61. Levett, PN, Smythe L. 2014. International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64:1071-1072
62. Lucheis SB, Ferreira Jr RS. 2011. Ovine leptospirosis in Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17(4):394-405.
63. Markovich JE, Ross L, McCobb E. 2012. The prevalence of leptospiral antibodies in free roaming cats in Worcester County, Massachusetts. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(3):688-689.
64. Martin L, Pettit A. 1918. Sero-diagnostic de la spirochaetose icterohaemorrhagique. *Bulletin et Mémoires de la Société Médicale des Hôpitaux de Paris*, 42:672-675.
65. Martínez R, Pérez A, Quiñones MDC, Cruz R, Álvarez A, Armesto M, Fernández N. 2004. Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Panam Salud Pública*, 15(4):249-55.
66. Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, Vinetz JM. 2008. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(4): e213.
67. Medina-Vogel G. 2010. Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. *Arch Med Vet* 42: 11-24.
68. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of clinical microbiology*, 30(9): 2219-2224.
69. Miraglia F, Matsuo M, Morais ZM, Dellagostin OA, Seixas FK, Freitas JC, Moreno AM. 2013. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 77(3):195-199.
70. Modolo JR, Langoni H, Padovani CR, Shimabukuro FH, de Oliveira Mendonça A, Victoria C, da Silva WB. 2006. Investigação soroepidemiol gica de leptospirose

- canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 43(5):598-604.
71. Montes D, Rivera H, Ramirez M, Ríos P, Angulo C, Muñoz K. 2011. Frecuencia de infección por *Leptospira* sp. en ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) en un zoológico de la ciudad de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(1):67-71.
72. Murray GL, Ellis KM, Lo M, Adler B. 2008. *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. *Microbes and Infection*, 10(7):791-797.
73. Musso D, La Scola B. 2013. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(4):245-252.
74. Noguchi H. 1917. Spirochaeta icterohaemorrhagiae in American wild rats and its relation to the Japanese and European strains. *Journal of Experimental Medicine*, 25:755-63
75. Oliveira R, de Moraes ZM, Goncales AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL. 2011. Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PLoS One*, 6(7): e21962.
76. Pacheco V, Cadenillas R, Salas E, Tello C, Zeballos H. 2009. Diversidad y endemismo de los mamíferos del Perú. *Revista Peruana de Biología* 16(1):5-32.
77. Pacheco V. 2002. Mamíferos del Perú. Pp. 503-549 in *Diversidad y conservación de los mamíferos Neotropicales* (G. Ceballos and J. A. Simonetti, eds.). Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad—Nacional Autónoma de México, México, Distrito Federal, México.
78. Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *International Journal of Infectious Diseases*, 12(4): 351-357.
79. Petrakovsky J, Bianchi A, Fisun H, Nájera-Aguilar P, Pereira MM. 2014. Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries: Reported Outbreaks and

- Literature Review (2002–2014). *International journal of environmental research and public health*, 11(10):10770-10789.
80. Picardeau M. 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*, 43(1):1-9.
 81. Pinne M, Haake DA. 2009. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. *PLoS One*, 4(6):e6071.
 82. Pinto R, Ferreira F, Ferreira J, De Arruda S, De Souza E, De Moraes ZM, Oliveira G. 2011. Exposure of free-ranging wild carnivores, horses and domestic dogs to *Leptospira* spp in the northern Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(4): 441-444.
 83. Postic D, Merien F, Perolat P, Baranton G. 2000. Diagnostic biologique leptospirose - borréliose de Lyme/Biological diagnosis leptospirosis - Lyme borreliosis, 2nd ed. Paris, Collection des Laboratoires de Référence et d'Expertise. Institut Pasteur à Paris, 177-186.
 84. Rao RS, Gupta N, Bhalla P, Agarwal SK. 2003. Leptospirosis in India and the rest of the world. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 7(3):178-193.
 85. Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride FW, Figueira CP, Huerre M, Ave P, Picardeau M. 2007. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS pathogens*, 3(7): e97.
 86. Romero MH, Sánchez JA, Hayek LC. 2010. Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en población urbana humana y canina del departamento del Tolima. *Rev salud pública*, 12(2): 268-75.
 87. Sarkar J, Chopra A, Katageri B, Raj H, Goel A. 2012. Leptospirosis: a re-emerging infection. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 5(6): 500-502.
 88. Sedano A. 2014. Estandarización e implementación de una técnica de qPCR para la detección de *Leptospira* sp. Patógenas en muestras de orina de caninos domésticos. Tesis de grado de Médico Veterinario. Lima. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 70 p

89. Sedigheh Z, Nargess K, Zahra FG, Neda S, Abdol-Ali M, Mohamed MG, Navid DD. 2010. *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Journal of Infectious, Genetics and Evolution*, 10:273-277.
90. Sepúlveda A, Santiago J, Preciado FJ. 2002. La rata y el perro, importantes vectores de la leptospirosis en explotaciones pecuarias de Cd. Guzmán, Jalisco. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(1): 21-23.
91. Silva RF, Riedemann S. 2007. Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. *Archivos de medicina veterinaria*, 39(3): 269-274.
92. Siuce J.J. 2014. Identificación de serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. en caninos domésticos. Tesis de maestría en Medicina Veterinaria. Lima. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 57p.
93. Slavica A, Dezdek D, Konjevic D, Cvetnic Z, Sindicic M, Stanin D, Habus J, Turk N. 2011. Prevalence of leptospiral antibodies in the red fox (*Vulpes vulpes*) population of Croatia. *Veterinarni Medicina*, 56 (4): 209 – 213.
94. Stern EJ, Galloway R, Shadomy SV, Wannemuehler K, Atrubin D, Blackmore C, Clark TA. 2010. Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6): 843-849.
95. Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, DeMoll E, Haake DA. 2007. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS One*, 2(11): e1188.
96. Thomas O. 1900. New South-American mammals. *Annals and Magazine of Natural History*, Series 7, 5:148–153.
97. Uhlenhuth P, Formme W. 1916. Quoted in Topley and Wilson's *Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*, 8(2): 617.
98. Valverde MDLA, Ramirez JM, de Oca LM, Goris MG, Ahmed N, Hartskeerl RA. 2008. Arenal, a new *Leptospira* serovar of serogroup Javanica, isolated from a patient in Costa Rica. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 529-533.

99. Verma A, Stevenson B, Adler B. 2013. Leptospirosis in horses. *Veterinary microbiology*, 167(1): 61-66.
100. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of biosciences*, 33(4): 557-569.
101. World Health Organization (WHO). 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.
102. Wozencraft WC. 2005. Order Carnivora. En: Wilson DE, Reeder DM, eds. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 3a ed. Maryland: Johns Hopkins University Press. p 532–628.
103. Xue F, Yan J, Picardeau M. 2009. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. *Microbes and infection*, 11(3): 328-333.
104. Zavitsanou A, Babatsikou F. 2008. Leptospirosis: epidemiology and preventive measures. *Health Sci J*, 2(2): 75-82.