

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Seroprevalencia de leptospirosis en alpacas de la
localidad de Quimsachata-Puno en época de lluvias**

TESIS

para optar el título Médico Veterinario

AUTOR

Yvan Roger Santos Sánchez

Lima – Perú

2006

“A Dios, cuya mano divina guía el camino de nuestro destino.”

A ti madre:

“Que cuando era pequeño bastaba escuchar tu voz para sentirme seguro, un beso tuyo para curar mis heridas y una caricia para sentir el inmenso amor que hay dentro de ti.”

A ti padre:

“Que con tu gran amor y rectitud me llevaste por el camino correcto de la vida personal y profesional.”

“A ambos cuya crianza y sacrificio, dejan en sus hijos una educación superior, la cual es su mejor herencia.”

“A ti, Ángela por apoyarme en todo. Eres el motor que hace que las cosas las haga cada vez mejor.”

“A mis hermanos, Rita, Abdel y Vladimir, que desde pequeños y hasta ahora ya grandes, somos tan unidos como toda familia, siendo amigos y confidentes.”

A mi Alma Mater, la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, cuyas aulas fueron cómplice de mi formación profesional y aventuras universitarias.

Al Dr. Francisco Suárez Aranda por sus enseñanzas en la dirección y realización de la tesis.

A los doctores Hermelinda Rivera, Víctor Leyva, Enrique Ameghino, Wilfredo Huanca y Teodosio Huanca, por todo el apoyo brindado en la realización de la tesis.

Al personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, en especial al Sr. Ibañez por brindarme no sólo su tiempo, sino también su amistad.

Al personal de campo del C.I.P. Quimsachata de Puno. Hombres fuertes que trabajan en condiciones adversas apoyando de manera significativa en las investigaciones de los camélidos sudamericanos.

A cada uno de mis profesores y amigos de la universidad que de alguna u otra forma, son y serán parte de mi formación académica. A ustedes mis más sinceros respetos y estima personal.

CONTENIDO

RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	vi
CONTENIDO.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. ETIOLOGÍA.....	4
2.1.1. Taxonomía.....	4
2.1.1.1. Clasificación serológica.....	5
2.1.1.2. Clasificación genotípica.....	5
2.1.2. Biología de las leptospiras.....	6
2.1.3. Métodos de cultivo.....	7
2.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	8
2.2.1. Rango de hospedadores.....	8
2.2.2. Papel del medio ambiente.....	10
2.2.3. Factores de riesgo.....	11
2.2.4. Mecanismos de transmisión.....	13
2.2.5. Prevalencia.....	14
2.2.5.1. En el hombre.....	14
2.2.5.2. En animales domésticos.....	14
2.2.5.2.1. En roedores y canes.....	14
2.2.5.2.2. En bovinos.....	15
2.2.5.2.3. En cerdos.....	16
2.2.5.2.4. En ovinos y caprinos.....	17
2.2.5.3. En animales silvestres.....	18
2.2.5.4. En camélidos sudamericanos.....	18
2.3. PATOGENIA.....	19

2.4. INMUNIDAD.....	21
2.5. DIAGNÓSTICO.....	22
2.5.1. Diagnostico clínico.....	22
2.5.1.1. En bovinos.....	23
2.5.1.2. En ovinos y caprinos.....	24
2.5.1.3. En camélidos sudamericanos.....	26
2.5.2. Diagnóstico de laboratorio.....	26
2.5.2.1. Cultivo y aislamiento.....	26
2.5.2.2. Pruebas serológicas.....	27
2.5.2.2.1. Prueba de aglutinación microscópica (MAT).....	27
2.5.2.2.2. ELISA.....	28
2.5.2.2.3. Fijación de complemento.....	29
2.5.2.2.4. Inmunofluorescencia.....	29
2.5.2.2.5. Técnicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos.....	30
2.5.3. Diagnóstico diferencial.....	30
2.5.3.1. En bovinos.....	30
2.5.3.2. En ovinos y caprinos.....	31
2.6. CONTROL.....	31
2.6.1. Tratamiento.....	31
2.6.2.- Profilaxis.....	32
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1. Lugar de estudio.....	35
3.2. Animales.....	35
3.3. Toma de muestras.....	37
3.4. Prueba serológica.....	37
3.4.1. Técnica de microaglutinación.....	37
3.4.2. Materiales y equipos.....	38
3.4.2.1. Materiales.....	38
3.4.2.2. Equipos.....	39
3.5. Análisis de datos.....	39

IV. RESULTADOS.....	41
V. DISCUSIÓN.....	45
VI. CONCLUSIONES.....	48
VII. RECOMENDACIONES.....	49
VII. REVISIÓN DE LITERATURA.....	50
VII. ANEXOS.....	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de animales muestreados en el C.I.P. Quimsachata - Puno, 2003.....	37
---	----

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Frecuencias de serovariedades detectadas en las alpacas mediante la prueba de MAT. CIP Quimsachata, Puno, 2003..... 41
- Cuadro 2.** Distribución de alpacas según sexo y edad, y su reacción a leptospirosis mediante la prueba de MAT. CIP Quimsachata, Puno, 2003..... 42
- Cuadro 3.** Distribución de animales positivos a las serovariedades de *Leptospira*. CIP Quimsachata, Puno, 2003..... 42
- Cuadro 4.** Distribución de alpacas según sexo y reacción a la prueba MAT para el diagnóstico de leptorpiras. CIP Quimsachata Puno, 2003..... 43
- Cuadro 5.** Distribución de alpacas según sexo y edad y su reacción frente al número de serovares de leptospira. CIP Quimsachata, Puno, 2003..... 43
- Cuadro 6.** Distribución de animales adultos por sexo y serovar a la dilución. CIP Quimsachata, Puno, 2003..... 43

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica, cuyo agente etiológico es la *Leptospira interrogans*, que afecta tanto a animales domésticos y silvestres, como al hombre. El objetivo del presente estudio fue estimar la seroprevalencia de leptospirosis en alpacas durante la época de lluvias. Con tal propósito se analizaron mediante la prueba de microaglutinación, sueros provenientes de 344 animales del C.I.P. Quimsachata perteneciente a la E. E. ILLPA - INIA - Puno, evaluando la asociación de las variables sexo y edad con la reacción a la prueba. Del total de sueros analizados el 44,77% (154/344) fueron positivos. Los serovares detectados fueron *pomona*, *icterohaemorrhagiae*, y *canicola*, no encontrándose ningún reactor a *hardjo*. Los serovares más frecuentes fueron *pomona* con 43,60% (150/344), *icterohaemorrhagiae* con 9,88% (34/344) y *canicola* con 1,45% (5/344). Al evaluar la variable edad, éste se analizó relacionado con el sexo; no habiendo ningún suero positivo en los tuis; mientras que para los adultos se encontró en hembras 60,98% y machos 74,36%. Al considerar la positividad de los sueros relacionados con la variable sexo, se observa ausencia de significación estadística ($p > 0.05$) indicando independencia de las variables analizadas; y considerando la variable edad se observa claramente la existencia de asociación ($p < 0,05$). Los altos títulos hallados para *pomona* e *icterohaemorrhagiae* en estos animales, sugieren una fuerte infección activa durante la época de lluvia.

Palabras claves: Leptospirosis, alpacas, seroprevalencia.

SUMMARY

The Leptospirosis is a zoonotic infections disease, affecting wild and domestics animals and human beings, caused by the *Leptospira interrogans*. The objective of this study was to estimate the prevalence of leptospirosis in the alpacas during the period of rains. With such an intention were analyzed by means of microagglutination tests, serum of 344 animals of C.I.P. Quimsachata - E.E. ILLPA - INIA - Puno, evaluating the association of the sex and age with the reaction of the test. Of the serum samples analyzed, the 44,77% (154/344) was positive. The detected serovars were *pomona*, *icterohaemorrhagiae*, and *canicola*, not being antibodies against *hardjo*. Of the 4 studied serovars, *pomona* showed the highest prevalence 43,60% (150/344), followed by *icterohaemorrhagiae* with 9,88%(34/344) and *canicola* with 1,45%(5/344), not finding positive samples in the young animals, whereas for the adults was 60,98 % in males and 74,36 % in females. Relating the positive serum to the sex, there exists absence of statistical significance ($p > 0.05$) indicating independence, and considering the age, statistical association exists ($p < 0,05$). The high titles found for *pomona* and *icterohaemorrhagiae* in these animals, suggest a strong active infection during the period of rain.

Key words: leptospirosis, alpacas, seroprevalence.

I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial que afecta al hombre y animales tanto domésticos como silvestres. En todo el mundo se han descrito más de 220 serovares pero, frecuentemente, las infecciones se producen por un número limitado de serovares endémicos de una región o país y su presencia está íntimamente ligada a factores ecológicos y medioambientales (Thiermann, 1984).

La leptospirosis es considerada una enfermedad infecciosa emergente, ya que constituye un problema de Salud Pública en muchos países en desarrollo por su alta letalidad (Levett, 2001).

La enfermedad se adquiere por contacto directo cutáneo o ingestión de aguas contaminadas por orina de animales infectados, sangre y/o tejidos de reservorios, que atraviesan las mucosas, la piel con abrasiones o pequeñas heridas, o por el contacto directo con los reservorios. La importancia de esta enfermedad depende del número de microorganismos infectantes, de las defensas inmunológicas del hospedador, de la serovariedad causal y de la virulencia de la cepa en cuestión (Elizalde *et al.*, 2004).

El mantenimiento del agente en la naturaleza depende, fundamentalmente, del prolongado período de bacteriuria de los animales portadores y de la capacidad de supervivencia del microorganismo en el medio ambiente. El pH alcalino del suelo, la baja radiación solar, el clima templado y las inundaciones, son factores que favorecen la sobrevivencia del microorganismo y su diseminación a través de las aguas superficiales contaminadas, pudiendo producirse así brotes estacionales (Acha y Szyfres, 2003).

La epidemiología de la leptospirosis ha sido modificada por cambios en la agricultura, animales, clima y comportamiento humano (Levett, 2001). El clima, el suelo, las prácticas agrícolas y la fauna, son apropiadas para la propagación de la leptospirosis en el hombre y los animales. La agricultura y la ganadería desempeñan una función fundamental (Martínez *et al.*, 1998).

La leptospirosis se encuentra ampliamente difundida en el Perú. Ha sido reportada como causa de epizootias en animales domésticos como los bovinos y porcinos, asimismo se ha determinado la presencia de anticuerpos en equinos, aislamiento de leptospiras y seropositivos en ovinos, caprinos, perros y gatos, siendo el conocimiento de su situación actual de interés en Salud Pública humana y veterinaria (Liceras de Hidalgo *et al.*, 1989).

En las últimas décadas se han intensificado los estudios sobre los aspectos productivos de los Camélidos Sudamericanos a fin de impulsar su desarrollo en economías regionales alternativas. Este desarrollo requiere optimizar la eficiencia reproductiva, para lo cual es necesario conocer tanto los parámetros fisiológicos como la susceptibilidad y la respuesta inmune de estas especies ante los agentes infecciosos. Dentro de las enfermedades infecciosas que pueden afectar la reproducción, la leptospirosis es una de las patologías probables (Johnson, 1989).

La alpaca ha sido poco investigada en relación a la ocurrencia de leptospirosis, a pesar de ser una de las especies domésticas casi exclusivas de nuestro país (Bustinza, 1984). Las elevadas tasas de mortalidad por causas infecciosas, principalmente en crías, constituye un factor limitante en la crianza de alpacas, presentando esta especie bajos índices reproductivos con variaciones de fertilidad de 45 a 60% y natalidad de 42 a 80% (Fernández - Baca, 1991 y Ameghino y De Martini, 1991).

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la presencia de anticuerpos contra leptospiras en sueros de alpacas durante la época de lluvias, y su asociación con la edad y sexo de los animales, procedentes del C.I.P. Quimsachata que pertenece a la E. E. ILLPA - INIA - Puno.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ETIOLOGÍA

2.1.1. Taxonomía

Los agentes causales de la leptospirosis pertenecen al género *Leptospira* de la familia *Leptospiraceae*, orden de los *Spirochaetales* (Canale - Parola, 1984). Se le reconoce como único género dentro de dicha familia, en la cual se incluyen tres especies: *Leptospira interrogans*, *Leptospira biflexa* y *Leptospira illini*, esta última de estado taxonómico incierto (Johnson y Faine, 1984). El criterio de clasificación clásico para el género *Leptospira* lo divide en dos especies; *L. interrogans*, que incluye a todas las leptospirosis patógenas o de vida parasitaria y *L. biflexa*, especie que engloba a todas las saprofitas o de vida libre (Beer, 1981 y Alonso - Andicoberry *et al*, 2001).

En la actualidad, gracias a la utilización de nuevas herramientas y métodos de clasificación, esta taxonomía está cambiando y se han reconocido hasta diez especies dentro del género *Leptospira* (Holt *et al.*, 1994 y Alonso - Andicoberry *et al.*, 2001).

Las leptospiras patógenas se clasifican dentro de una especie de *L. interrogans* conteniendo a 212 serovariedades, distribuidas en 23 serogrupos; por ejemplo, *L. interrogans* serovar *pomona*. Por otro lado algunos son parásitos para los humanos y para otros animales por ejemplo *L. interrogans*, serovar *canicola*, no infecta normalmente a las personas, pero la cepa que ataca a los roedores, *L. interrogans*, serovar *icterohaemorrhagiae* sí lo hace (Madigan *et al.*, 1997 y Radostits *et al.*, 2002).

2.1.1.1. Clasificación serológica

Dos cepas se consideran distintas si después de la absorción cruzada con una cantidad adecuada de antígenos homólogos el 10% o más de los títulos homólogos permanecen en por lo menos uno de los antisueros en pruebas repetidas. Más de 60 serovares de *L. biflexa* han sido reconocidos. Dentro de las especies de *L. interrogans* se han reconocido más de 200 serovares. Los serovares que están antigénicamente relacionados han sido agrupados en serogrupos. A pesar de que los serogrupos no tienen significancia taxonómica, han probado ser útiles para el mejor entendimiento epidemiológico (Levett, 2001 y Radostits *et al.*, 2002).

2.1.1.2. Clasificación genotípica

La clasificación fenotípica de las leptospiras ha sido reemplazada por una genotípica, en la cual un número de genoma - especies incluyen todos los serovares tanto de *L. interrogans* como de *L. biflexa*. Los estudios de hibridización de ADN llevaron a la definición de 10 genoma - especies de *Leptospira*. La clasificación genotípica de las leptospiras es apoyada por información de electroforesis enzimática de locus múltiples. Los genoma - especies de *Leptospira* no corresponden a las dos especies conocidas (*L. interrogans* y *L. biflexa*), y en realidad, los serovares patogénicos y no

patogénicos se presentan dentro de la misma especie. Así, ningún serogrupo, ni serovar predice confiablemente la especie de *Leptospira*. Además, estudios recientes han incluido múltiples cepas de los mismos serovares y han demostrado heterogeneidad genética dentro los serovares. Este método permite analizar observaciones entre cepas de la misma serovariedad que pueden correlacionarse con diferencias en la epidemiología de las cepas y, posiblemente la patogenicidad de las mismas (Levett, 2001 y Radostits *et al.*, 2002).

2.1.2. Biología de las leptospiras

Las leptospiras son bacterias filamentosas de 0,1 a 0,2 μm de ancho x 6 a 12 μm de largo, delgadas y flexibles, constituidas por espirales finas con extremos en forma de gancho. Están compuestas por un cilindro protoplásmico enredado en un filamento axial central recto (Greene *et al.*, 2000). El cilindro protoplásmico central contiene el citoplasma y el nucleoide, y está limitado por una membrana plasmática y por una pared celular de tipo gram - negativo. A ambos extremos del cilindro, se extienden hacia el interior entre dos y más de cien flagelos procarióticos, denominados fibras axiales, flagelos periplásmicos o endoflagelos, y en ocasiones se superponen entre sí en el tercio central de la célula. Todo el complejo de flagelos periplásmicos, el filamento axial, se localiza por debajo de una membrana externa celular o vaina flexible. Esta vaina externa contiene lípidos, proteínas e hidratos de carbono, y su estructura varía en los distintos géneros, su función se desconoce, pero es importante, puesto que las espiroquetas mueren si la vaina se elimina o se daña. Los lipopolisacáridos de las leptospiras tienen una composición similar al de otras bacterias gram - negativas, pero tienen menor actividad endotóxica (Prescott *et al.*, 2000 y Levett, 2001).

Aunque no se han establecido el mecanismo por el cual los flagelos periplásmicos impulsan la célula, estos flagelos son responsables de la motilidad, ya que los mutantes con flagelos rectos en vez de curvos son inmóviles. Cabe suponer que los flagelos periplásmicos rotan como los flagelos externos de otras bacterias. Esto podría hacer que la vaina externa con forma de sacacorchos rotara y desplazara a la célula a través del líquido circundante. La rotación flagelar también podría flexionar o doblar la célula y ser responsable del movimiento reptante observado en las superficies sólidas (Prescott *et al.*, 2000).

Las leptospiras son aerobias obligadas con una temperatura de crecimiento óptima de 28 a 30°C y con un pH óptimo de 7,2 a 7,6. Producen tanto catalasa como oxidasa. Crecen en medios simples enriquecidos con vitaminas (las vitaminas B₂ y B₁₂ son factores de crecimiento), ácidos grasos de cadena larga, y sales de amonio. Los ácidos grasos de cadena larga son utilizados como la única fuente de carbón (Beer, 1981; Prescott *et al.* 2000 y Levett, 2001).

2.1.3. Métodos de cultivo

Las leptospiras crecen mejor en medios que contengan ya sea suero o albúmina más polisorbato. Los medios de Fletcher, Kortchoff y Schüffner son los más empleados. El medio más usado actualmente está basado en el de albúmina ácida oleica EMJH. Este medio está disponible comercialmente y contiene Tween 80 y albúmina de suero bovino. Algunas cepas son más fastidiosas y requieren la adición ya sea de piruvato o de suero de conejo para el aislamiento inicial. El crecimiento de los contaminantes puede ser inhibido por la adición de 5-fluorouracilo (Melnick y Adelbery, 1999 y Levett, 2001).

En el Hospital Militar Central de Cuba se utilizó un nuevo medio de cultivo compuesto esencialmente por sales de sodio e hidróxido de potasio, así como

suero de carnero en sustitución del de conejo, para el diagnóstico de leptospirosis humana. En este nuevo medio de cultivo se aislaron un total de 135 cepas de *Leptospira sp.* correspondientes a 54 pacientes ingresados en el año 1993, y 81 pacientes ingresados en el año 1994, este nuevo medio de cultivo resulta de importancia económica por el ahorro que representa (Ayala *et al.*, 1998).

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

2.2.1. Rango de hospedadores

La infección es común en roedores y en otros mamíferos silvestres y domésticos. En el mundo, la infección se presenta en aproximadamente 160 especies de mamíferos. Cada serovar tiene su o sus hospedadores predilectos, pero cada especie animal puede ser hospedador de uno o más serovares (Acha y Szyfres, 2003). Los animales, incluyendo al hombre, pueden ser divididos en **hospedadores de mantenimiento** y **hospedadores accidentales o incidentales** (Levett, 2001).

Un animal infectado con una serovariedad del microorganismo adaptada al hospedador es un **hospedador de “mantenimiento” o “reservorio”**. Se considera como hospedador de mantenimiento a aquel que asegura la perpetuación de una población determinada de agentes infecciosos, sin la intervención de ningún hospedador accidental. Por tanto, la población de mantenimiento será aquella población de una o varias especies animales que actúan como reservorio continuo de un serovar en un determinado ecosistema. (Little, 1986 y Radostits *et al.*, 2002). Una o más especies de mamíferos silvestres o domésticos, actúan de hospedadores de mantenimiento de cada serovar de leptospirosis patógenas, pudiendo ser una especie animal reservorio

de varios serovares y diferentes especies animales serlo de un mismo serovar, estos hospedadores de mantenimiento se caracterizan por tener una alta susceptibilidad a la infección, presentar una patogenicidad relativamente baja ante el agente, tendencia a sufrir una enfermedad crónica en lugar de aguda, persistencia a las serovariantes en los riñones y a veces en el aparato genital, una respuesta de anticuerpos baja frente a la infección que dificultan el diagnóstico, y baja eficacia de la vacunación para prevenir la infección (Alonso - Andycoberry *et al.*, 2001 y Radostits *et al.*, 2002).

La exposición de animales susceptibles a las serovariedades no adaptadas al hospedador producen una enfermedad accidental o incidental. Este **hospedador “accidental o incidental”** se caracteriza por presentar una susceptibilidad relativamente baja a la infección, una patogenicidad alta ante el agente, tendencia a sufrir una enfermedad aguda, transmisión esporádica en la especie del hospedador y adquisición de la infección de otra especie, a menudo en forma epidémica, una fase renal corta, una respuesta de anticuerpos intensa frente a la infección, facilitando el diagnóstico, y las vacunas son más eficaces para prevenir la infección (Radostits *et al.*, 2002).

Los hospedadores de mantenimiento más importantes son los pequeños mamíferos, los cuales pueden transferir la infección a animales domésticos de granja, perros, y humanos. Las diferentes especies de roedores pueden ser reservorios de distintos serovares, pero las ratas son generalmente hospedadores de mantenimiento de los serovares de los serogrupos *icterohaemorrhagiae* y *ballum*, y los ratones son los hospedadores de mantenimiento de los serogrupos *ballum*. Los animales domésticos son también hospedadores de mantenimiento; el ganado lechero puede ser portador de los serovares *hardjo*, *pomona*, y *grippotyphosa*; los cerdos de *pomona*, *tarassovi*, o *bratislava*; los ovinos de *hardjo* y *pomona*; y los perros de *canicola*. El conocimiento de los serovares prevalentes y de sus hospedadores de

mantenimiento es esencial para el entendimiento epidemiológico de la enfermedad en cualquier región (Levett, 2001).

2.2.2. Papel del medio ambiente

Las regiones tropicales son áreas endémicas de leptospirosis y las tasas más altas de casos corresponden a las zonas donde las precipitaciones son más abundantes. El mayor número de casos se presenta en la estación de lluvias. La temperatura reinante en los países tropicales es un factor muy favorable para las leptospiras, pero esto no excluye que casos de leptospiras se presenten en climas fríos, aunque con menos frecuencia (Acha y Szyfres, 2003).

Las leptospiras patógenas no se multiplican fuera del organismo animal. Por tanto, es necesario que, además de animales portadores, existan condiciones ambientales favorables para la supervivencia del agente causal en el medio exterior. Las leptospiras requieren un alto grado de humedad ambiental, un pH del suelo o agua inferior a 6 ó superior a 8 es inhibitorio, temperaturas ambientales entre 0° y 25°C favorecen la supervivencia y replicación de leptospiras, mientras que el enfriamiento disminuye de manera notable la supervivencia. El agua caliente estancada o con movimiento lento proporciona un hábitat adecuado para las espiroquetas. Terrenos bajos, anegadizos, receptáculos naturales o artificiales de agua dulce (lagunas arroyos, embalses y otros) son favorables a su supervivencia, en tanto que el agua salina les resulta deletérea (Greene *et al.*, 2000; Radostits *et al.*, 2002 y Acha y Szyfres, 2003).

Al respecto, un estudio realizado para determinar la adaptación de *L. interrogans (sensu stricto)* al agua dulce, menciona que las bacterias se mantuvieron viables en el agua por 98 días, esto sugiere que las leptospiras pueden permanecer en agua por largos períodos de tiempo, con una tasa de

crecimiento relativamente baja, siendo posible que las leptospiras puedan utilizar nutrientes de leptospiras muertas (crecimiento críptico) (Trueba *et al.*, 2002). En áreas áridas o durante las sequías son más comunes las infecciones de los hospedadores incidentales alrededor de las fuentes de agua dulce (Greene *et al.*, 2000).

2.2.3. Factores de riesgo

Se ha catalogado a la leptospirosis como una enfermedad de tipo ocupacional, de mayor frecuencia en agricultores, limpiadores de desagües, cortadores de caña de azúcar, arroceros, militares, mineros, mataderos, cuidadores de animales y veterinarios (Farr, 1995 y Acha y Szyfres, 2003).

Dentro de los factores de riesgo asociados a la infección y enfermedad por leptospiras se tienen: a las características de los suelos, la presencia de aguas contaminadas, las características de las viviendas, la disponibilidad de sistemas de eliminación de excretas y la existencia de reservorios vertebrados (Perolat, 1997 y Everard *et al.*, 1992).

En nuestro país un estudio realizado sobre la hiperendemicidad de leptospirosis en localidades dedicadas al cultivo de arroz en la región de San Martín, halló un 25,2% de prevalencia en pobladores de esas localidades y los factores de riesgo asociados a la infección por leptospiras fueron; ser mayor de 30 años, no ser natural de San Martín, ser agricultor, habitar una vivienda con piso de tierra, eliminar excretas a campo abierto y no guardar la comida tapada (Cruz *et al.*, 2002); además Céspedes *et al.* (2003) obtuvo en personas con antecedentes de fiebre en localidades dedicadas a actividades mineras (lavaderos de oro) en la provincia del Manú - Madre de Dios, los siguientes factores asociados a la infección: consumo de agua de río en el hogar, consumo de agua de río en el campo, nadar en el río, habitar una vivienda con techo de

plástico y paja. Por otro lado un estudio realizado en 17 trabajadores del camal municipal de Huaraz, sólo uno presento anticuerpos contra leptospiras, siendo el factor de riesgo domiciliario la tenencia de ratas (Jaramillo *et al.*, 2002).

La crianza de ganado es uno de los principales factores de riesgo ocupacionales en todo el mundo. Los casos de leptospirosis parecen ser más frecuentes en las explotaciones de leche que en las de carne, esto debido principalmente, a que el ganado bovino lechero se explota en sistemas intensivos o semiextensivos que llevan a un mayor hacinamiento, lo cual favorece la transmisión (Alonso - Andicoberry *et al.*, 2001 y Levett, 2001).

En Colombia, un trabajo de investigación realizado a operarios, bovinos y cerdos de una zona andina de producción pecuaria que utilizan un sistema de producción “cerdos - pastos - leche” encontró una prevalencia de 22,4% en los operarios, 60,9% en vacas en producción, 10,3% en cerdos de ceba y 25,7% en cerdos de cría. Los operarios fueron reactivos fundamentalmente a los serovares *pomona*, *bratislava* y *hardjo*, la edad promedio de los operarios seronegativos fue de 31 años y la de los seropositivos de 47 años, lo que sugiere que el tiempo de exposición es un factor de riesgo para la infección; siendo el sistema de producción “cerdos - pastos - leche” un factor que favorece la persistencia de un ciclo endémico para la leptospirosis (Ochoa *et al.*, 2000). Además otro estudio para determinar la presencia de leptospiras en aguas de explotación porcina tomando como muestras aguas para consumo y lavado menciona que las aguas servidas, tanque de almacenamiento, chupones de bebederos y tanque de lavado presentan una alta tasa de contaminación (Giraldo de León *et al.*, 2002).

Existe un riesgo significativo asociado con la exposición recreacional presentada en los deportes acuáticos, incluyendo a la natación, canotaje, regatas, pesca en agua dulce, y otros deportes donde la exposición es común,

tales como buceo y clavados. Los casos de leptospirosis también han seguido a grandes inundaciones (Levett, 2001).

2.2.4. Mecanismos de transmisión

Las leptospiras se transmiten entre animales y el hombre por contacto directo o indirecto, a través de abrasiones en la piel y de las mucosas bucal, nasal y conjuntiva. El hombre es un hospedador incidental y sólo en condiciones muy especiales puede contribuir a mantener un brote epidémico (Greene *et al.*, 2000; Acha y Szyfres, 2003).

La transmisión directa ocurre por contacto con orina infectada, transmisión venérea y placentaria, como por vía galactófora, o ingestión de tejidos infectados. Se menciona una entrada de leptospiras por vía inhalatoria o conjuntival, procedentes de núcleos goticulares formados por la dispersión de la orina de animales infectados (Greene *et al.*, 2000 y Alonso - Andicoberry *et al.*, 2001). Raramente, la infección puede ser causada por la mordedura de animales (Levett, 2001).

La vía más común es la transmisión indirecta, que ocurre por exposición de animales susceptibles a fuentes de agua, suelo y alimento contaminado. La transmisión indirecta de leptospiras puede aumentar cuando los factores ambientales que favorecen la supervivencia de los mismos son óptimos (Greene *et al.*, 2000 y Acha y Szyfres, 2003).

El semen de un toro infectado puede contener leptospiras y la transmisión por reproducción natural o inseminación artificial puede producirse, pero es raro. En carneros, es probable que el semen esté infectado durante sólo unos días durante el periodo de leptospiremia, en los verracos no hay pruebas de que se produzca una transmisión coital. *L. interrogans* serovariedad *hardjo* se elimina

por el aparato genital de las vacas que abortan, durante un período de hasta 8 días después del aborto o el parto y se detecta en los oviductos y el útero hasta 90 días después de la infección experimental y en vacas infectadas naturalmente. También pueden estar presentes en el aparato genital de los toros y es posible la transmisión venérea de la infección (Radostits *et al.*, 2002).

2.2.5. Prevalencia

2.2.5.1. En el hombre

El hombre es susceptible a un gran número de serovares. Se ha demostrado anticuerpos en sueros humanos de todos los departamentos del Perú, pero sólo se ha aislado leptospiras de Piura, Lima y Loreto. En Lima se identificó *copenhageni*, *icterohaemorrhagiae*, *monymusk*, *pomona*, *kremastos* y *andamana* éste último de la especie *L. biflexa*. En un caso de Loreto se identificó *aguaitia* que es un serovar nuevo del serogrupo Tarassovi y de Piura se menciona a *L. icteroides*. Además, estudios serológicos realizados a pacientes sospechosos de leptospirosis entre los años 1974 y 1988 en su mayoría del departamento de Lima, dieron como resultado la implicancia de los serogrupos *Icterohaemorrhagiae* (74%), *Canicola* (6%), *Hebdomadis* (2%), *Australis* (2%), *Pomona* (2%), *Bataviae* (1%), *Tarassovi* (0,5%), y *Andamana* (Licerias de Hidalgo *et al.*, 1989).

2.2.5.2. En animales domésticos

2.2.5.2.1. En roedores y canes

Los serovares predominantes en todo el mundo en el perro son *canicola* e *icterohaemorrhagiae*. Además de estos serovares, en América Latina y el Caribe se han aislado *pyrogenes*, *paidjan* y *tarassovi* (Acha y

Szyfres, 2003). Los roedores frecuentemente son implicados como portadores y diseminadores de leptospiras; una gran variedad de especies de ratas de casi todas las regiones del mundo son portadoras crónicas de leptospiras en su gran mayoría por el serovar *icterohaemorrhagiae* (Webster *et al.*, 1995).

En perros del departamento de San Martín se determinaron anticuerpos principalmente para leptospiras de los serogrupos Canicola, Mini y Bataviae (Liceras de Hidalgo *et al.*, 1989); asimismo un estudio realizado en roedores y canes en Piura, reportó que un 16,6% de roedores (*Rattus rattus*) reaccionaron para *grippotyphosa* y para los canes el serovar implicado fue *canicola* (Sacsquispe *et al.*, 2003). Otro estudio en perros callejeros de la ciudad de Cali - Colombia halló evidencias de infección en el 41,1% de los animales. La mayor reactividad fue a *icterohaemorrhagiae* con un 55,6% del total de los seropositivos (Rodríguez *et al.*, 2004). Un dato adicional es el que establecieron Belitardo *et al.* (2000) al encontrar anticuerpos contra *canicola*, *pyrogenes*, *castellonis* e *icterohaemorrhagiae* en animales de un bioterio de Brasil.

2.2.5.2.2. En bovinos

En las Américas, los serovares predominantes en bovinos son *pomona*, *hardjo* y *grippotyphosa*; siendo posible hallar infecciones por *canicola* e *icterohaemorrhagiae*, como también por otros serovares (Acha y Szyfres, 2003).

En el Perú se aislaron siete serogrupos; la serología y el aislamiento indicaron que estuvieron infectados en mayor frecuencia con leptospiras de los serogrupos Pomona y Sejroe. Por otro lado, existen informes sobre aborto producido por leptospiras de los serogrupos Pomona e

Icterohaemorrhagiae, así, en 1971 se comprobó en vacunos de Iquitos un brote epizootico con leptospiras del serogrupo Sejroe (Liceras de Hidalgo *et al.*, 1989).

En bovinos de hatos lecheros en México se halló una frecuencia de leptospirosis del 84,48%. Los serovares más frecuentes fueron *icterohaemorrhagiae* 45,69%; *pyrogenes* 21,55%, *pomona* 13,8%, *canicola* y *celledoni* con 12,93% (Fernández *et al.*, 1993). Asimismo, un estudio sobre leptospirosis bovina realizado en algunas regiones de Chile mostró un 61,20% de positivos, correspondiendo la etiología principal a los serogrupos Pomona y Sejroe (Riedemann *et al.*, 1986). Por otro lado, Zamora *et al.* (1988 y 1991) obtuvieron en muestras de suero sanguíneo de animales beneficiados, serovares *hardjo*, *pomona* y *kennewicki* con prevalencias de entre 43,9% y 44,9%.

2.2.5.2.3. En cerdos

Los serovares que con más frecuencia se han aislado en cerdos en las Américas y en el mundo son *pomona*, *tarassovi*, *grippotyphosa*, *canicola* e *icterohaemorrhagiae*, así como *bratislava* y *muenchen* del serogrupo Australis, además, en rebaños infectados la prevalencia de los animales serológicos positivos es alta, siendo alrededor del 20% (Radostits *et al.*, 2002 y Acha y Szyfres, 2003).

De animales de la costa y sierra del Perú se han aislado leptospiras de los serogrupos Pomona, Canicola y Tarassovi. De la selva se han aislado leptospiras de los serogrupos Pomona, Canicola, Bataviae y por primera vez en el mundo, de los serogrupos Sejroe, Mini y Shermani (Liceras de Hidalgo *et al.*, 1989).

En granjas porcinas de México las serovariedades reportadas más frecuentes son *icterohaemorrhagiae* (51,4%), *pyrogenes* (45,7%), *grippotyphosa* (37,1%), *autumnalis* (31,4%), *shermani* (31,4%), *canicola* (58,3%), *bratislava* (28%) y *panama* (24,5%) (Zepeda *et al.*, 1986 y Moles *et al.*, 1998). Mientras que en Colombia los serovares hallados en una población porcina fue de; *pomona* (34%), *canicola* (4%), *bratislava* (2%), *grippotyphosa* (2%) e *icterohaemorrhagiae* (1%) (Almenteros *et al.*, 2004).

2.2.5.2.4. En ovinos y caprinos

Las epizootias en estas especies no son frecuentes, siendo posible que estos animales se infecten con serovares de otras especies del mismo ambiente, siendo los serovares *pomona* y *hardjo* las más comunes (Radostits *et al.*, 2002 y Acha y Szyfres, 2003).

En el Perú, se han realizado pocos estudios, habiéndose determinado anticuerpos principalmente para leptospiras de los serogrupos Ballum, Pomona y Australis, habiéndose hallado una cepa del serogrupo Hebdomadis de una oveja en Puno (Liceras de Hidalgo *et al.*, 1989).

En México, se realizó un estudio para determinar la seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* en ovinos criollos e importados, de los primeros se obtuvo 1,44% de positivos, siendo las serovariedades más frecuentes *pyrogenes* y *hebdomadis*; y en los ovinos importados sólo un 0,57% resultó positivo a *bratislava* (Sánchez *et al.*, 1988); mientras que en otro estudio en cabras criollas y de raza dio como resultado que el 3,4% fueron positivos a alguna de las siguientes serovariedades; *canicola*, *bratislava*, *ballum*, *sejroe*, *autumnalis*, *hebdomadis*, *australis*, *hardjo* y *pyrogenes*. (Zepeda *et al.*, 1988). En Brasil, en ovinos se determinó una prevalencia de 8,6% contra *L. interrogans*. Los serovares que más

frecuentemente reaccionaron fueron *wolffi* (5,1%), *icterohaemorrhagiae* (1,2%), *grippotyphosa* (0,7%), *castellonis* (0,7%) y *hardjo* (0,4%) (Barbudo *et al.*, 1999).

2.2.5.3. En animales silvestres

En el Perú, entre 1973 y 1977 se hizo un estudio en ofidios, principalmente de los departamentos de Amazonas y Loreto y sólo individuos de la familia *Crotalidae* presentaron anticuerpos para leptospiras de los serogrupos Andamana, Panama, Pomona, Australis y Semarang. En cobayos silvestres (*Cavia aperea*) en el departamento de San Martín se aislaron cepas de *pomona*, lo cual los sindicó como reservorios de este serovar y los capturados en el departamento de Puno, mostraron anticuerpos para *ballum* (Liceras de Hidalgo *et al.*, 1989). En un estudio serológico en 47 capibaras en un zocriadero de Iquitos el 71,4% presentó anticuerpos contra *Leptospira* siendo el serovar *hardjo* el de mayor prevalencia (26,6%) seguido de *canicola* y *grippotyphosa* (20%), *wolffi* y *pyrogenes* (10%) (Muñoz *et al.*, 2000).

2.2.5.4. En camélidos sudamericanos

En el Perú los trabajos sobre leptospirosis en camélidos sudamericanos son pocos; así Ludeña y Vargas (1982) hallaron en alpacas del departamento de Puno animales positivos (2,83%) para leptospira *ballum*, *icterohaemorrhagiae* y *bataviae*; mientras que Macedo y Hung (1993) en alpacas del mismo departamento, encontraron animales positivos para *castellonis* (70%); *shermani* (10%); *andamana* (6%); *icterohaemorrhagiae* (8%) y 6% presentaron reacción múltiple a *grippotyphosa*; *bataviae* y *celledoni*. Por otro lado, Herrera *et al.* (2000) hallaron en alpacas de Puno un 6,54% de positivos, los serovares implicados fueron *butembo*, *cynopteri*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *shermani*, *patoc* y *pomona*, siendo este último el más

frecuente (79,24%). Rosadio *et al.* (2003) obtuvieron un 65% de anticuerpos (resultados preliminares) contra *pomona*, *canicola* e *icterohaemorrhagiae* en alpacas de la provincia de Cuzco.

En Argentina, Brihuega *et al.* (1996) en un estudio serológico efectuado a llamas reportaron a los serovares *pomona*, *grippotyphosa* y *patoc*; además, otro estudio realizado en animales de distintas regiones reveló prevalencias entre 47,3 y 96,2% en llamas; entre 0 y 13% en guanacos y entre 9 y 62,8% en vicuñas, de los serovares que se usaron como antígeno en las determinaciones, los que más frecuentemente reaccionaron con los anticuerpos séricos de los camélidos sudamericanos, fueron *copenhageni* y *castellonis* (Llorente *et al.*, 2002).

Por otro lado, estudios serológicos durante un período de 7 años efectuado en un zoológico de Cuba en animales silvestres se menciona que las especies más afectadas fueron guanacos, búfalos y dromedarios llegando a un 23% (80/349) siendo el serogrupo Pomona el más frecuente (Sosa *et al.*, 1988).

2.3. PATOGENIA

Las leptospiras no son específicas para la especie hospedadora, de tal manera que existen algunas serovariedades capaces de causar enfermedad en diferentes especies incluyendo al hombre. La vía de entrada puede ser a través de la piel y mucosas erosionadas tras el contacto con las ratas infectadas y agua y tierra contaminada por orina (Trigo, 1998). Las leptospiras tienen la capacidad de unirse a las células epiteliales y adherirse a los constituyentes de la matriz extracelular a través de un proceso activo que afecta a las proteínas de superficie (Radostits *et al.*, 2002). Las lesiones más severas suelen ser causadas por *L.*

pomona en bovinos y porcinos y *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae* en caninos (Jubb *et al.*, 1991).

Los organismos se dispersan desde el punto de la infección, en el cual no se produce lesión alguna, para volverse bacteriémicos. Esta fase varía en sus manifestaciones, en algunos casos sin producir enfermedad clínica y en otros causando la muerte de 1 a 7 días. A medida que la fase bacteriémica disminuye, los organismos se van localizando extracelularmente entre las células del hígado, pero particularmente en los riñones. También muestran una afinidad marcada por el útero preñado pero no parecen localizarse o persistir en otros órganos fuera de esos tres. La ictericia es una manifestación común de la enfermedad clínica aguda en todas las especies y se debe a la hemólisis y al daño hepatocelular de origen tóxico e isquémico (Jubb *et al.*, 1991 y Radostits *et al.*, 2002).

La patogenicidad de algunos serovares de *L. interrogans* parece principalmente una expresión de la actividad de la hemolisina, pero el daño capilar es un componente de la patogenicidad de todos; el mecanismo de citotoxicidad endotelial no es conocido. El mecanismo de la anemia en la leptospirosis aparentemente es debido en forma inicial a las hemolisinas producidas por el organismo y más tarde por las aglutininas producidas por el hospedador, que pueden causar una anemia hemolítica continua Coombs positiva del tipo intravascular (Jubb *et al.*, 1991). Es probable que las toxinas se adhieran a los eritrocitos y aquellos que no son lisados por los efectos directos de las hemolisinas son luego sensibilizados a la respuesta inmunitaria que se desarrolla rápidamente, en etapas crónicas, la destrucción de eritrocitos esta mediada por anticuerpos (Jubb *et al.*, 1991 y Trigo, 1998).

La localización postsepticémica de las leptospiras en los riñones está asociada con inflamación intersticial focal o difusa de ese órgano y con degeneración tubular transitoria aguda. Los organismos entran al riñón por vía

hematógena, penetran en el endotelio vascular, persisten brevemente en los espacios intersticiales, e ingresan en la luz tubular por medio de las uniones intercelulares laterales. Dentro de los túbulos, están asociados principalmente con las microvellosidades de los túbulos proximales. La fase intersticial está acompañada por alteraciones vasculares marcadas que producen hiperemia, edema e hinchazón endotelial. La degeneración del epitelio tubular parece ser causada por las toxinas excretadas durante la migración de los organismos a través de la pared tubular. La degeneración tubular se establece bien a las dos semanas y se acompaña de infiltración intersticial de células plasmáticas y linfocitos, la cual puede ser focal o difusa (Jubb *et al.*, 1991).

2.4. INMUNIDAD

La inmunidad protectora en la leptospirosis no está totalmente esclarecida. Se detectan anticuerpos dirigidos contra distintas estructuras del agente como la envoltura externa, que es de gran importancia ya que es lo primero que entra en contacto con el sistema inmune, y contra antígenos flagelares, constituidos fundamentalmente por proteínas de 33 a 36 kDa (Fontanals *et al.*, 2002).

La inmunidad a la leptospirosis es primordialmente humoral en la naturaleza. La transferencia pasiva de anticuerpos a los terneros recién nacidos ocurre a través del calostro y los anticuerpos persisten en los terneros durante 2 a 6 meses. La inmunidad está fuertemente restringida a serovares homólogos o a serovares estrechamente relacionados. La especificidad del serovar es conferida por los antígenos LPS (Levett, 2001).

Después de la infección, se inducen mecanismos específicos que opsonizan las leptospiras, facilitando su eliminación de la mayor parte del organismo. Sin embargo, las leptospiras que alcanzan los túbulos renales

proximales, el aparato genital y las glándulas mamarias parece que están protegidas por los anticuerpos circulantes. Por otro lado, es sumamente importante el hecho que, el nivel de anticuerpos séricos normalmente disminuye hasta niveles no detectables en los animales que estén infectados persistentemente. La primera respuesta serológica en caso de *hardjo* es la producción de IgM. Estos anticuerpos aumentan rápidamente pero normalmente descienden hasta concentraciones no detectables a las 4 semanas de la infección. Al cabo de 1 a 2 semanas de la infección, se detectan los IgG, y a los 3 meses, representan el 80% de los anticuerpos detectables en la prueba de MAT. La vacunación induce la formación de anticuerpos, que son principalmente de la clase IgG, con niveles máximos a las 2 semanas después de una vacunación de dos dosis, pero descienden rápidamente a niveles inferiores a los existentes después de una infección natural (Radostits *et al.*, 2002).

2.5. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la leptospirosis puede ser complicado, debido principalmente a las características intrínsecas de las leptospiras y a la epidemiología de la enfermedad (Ellis, 1994).

2.5.1. Diagnóstico clínico

Los signos clínicos de la leptospirosis son similares en los diferentes hospedadores y no varían notablemente con la especie de *Leptospira*, excepto que la infección con *icterohaemorrhagiae* normalmente causa una septicemia grave. En todos los animales el período de incubación es de 3 a 7 días (Radostits *et al.*, 2002).

2.5.1.1. En bovinos

La mayoría de infecciones con *Leptospira spp.* cursan de manera subclínica, aunque en algunas ocasiones, pueden darse casos de enfermedad grave (Ellis, 1994). La infección puede provocar un enfermedad de curso agudo, subagudo o permanecer clínicamente inaparente y se manifiesta por una fiebre de 4 a 5 días, anorexia, conjuntivitis y diarrea. La leptospiruria por *hardjo* es mucho más prolongada que por *pomona*. El serovar *hardjo* en bovinos se caracteriza por dos síndromes: agalactia o reducción de la producción láctea; y abortos a parición de terneros débiles que mueren al poco tiempo de nacer (Acha y Szyfres, 2003). Las vacas pueden presentar aborto principalmente al final de la gestación y decremento en la producción láctea con aumento en la densidad o agalactia. Los signos clínicos desaparecen generalmente de 12 a 14 días después (Fernández *et al.*, 1993).

En las infecciones por *hardjo*, las leptospiras pueden residir en los órganos genitales (útero y oviductos), tanto en hembras preñadas como en no preñadas. La infertilidad puede ser una secuela de la infección, en los casos graves hay ictericia. Sin embargo, los síntomas más notorios son el aborto y la hemoglobinuria, que se presentan en cierta proporción de los animales. Los abortos suelen producirse de 1 a 3 semanas después del comienzo de la enfermedad. La retención de envolturas suceden hasta un 20% de los animales que abortan. El curso de la enfermedad es más severo en terneros, en los cuales se observa detención en el desarrollo (Acha y Szyfres, 2003).

En la leptospirosis causada por *hardjo*; la esterilidad y el síndrome hipoagaláctico sólo ocurre en las vacas preñadas o en lactación, ya que el organismo prolifera en el útero grávido y en la glándula mamaria en lactación. Se presenta fiebre, anorexia, inmovilidad y agalactia. La leche tiene un color de amarillo a naranja y puede contener coágulos. La ubre se observa flácida, no

hay calor ni dolor. El aborto puede producirse varias semanas después de la infección inicial y puede ser el único signo de la enfermedad (Radostits *et al.*, 2002).

En la leptospirosis aguda causada por *pomona*; los terneros de hasta un mes son los más susceptibles. La leptospirosis aguda, se manifiesta por septicemia con fiebre alta (40.5 - 41.5 °C), anorexia, petequias en las mucosas, apatía y anemia hemolítica aguda con hemoglobinuria, ictericia y palidez de las mucosas. Debido a la anemia se producen taquicardia, tonos cardiacos fuertes y un latido de punta fácilmente palpable; la disnea es también manifiesta. En el ganado adulto, se pueden producir abortos en la fase aguda de la enfermedad debido a la reacción general. La producción de leche es notablemente reducida y la secreción tiene un color rojizo o contiene coágulos de sangre, y la ubre se muestra flácida y blanda. En la forma crónica los signos son leves y pueden estar limitados al aborto. Los abortos ocurren normalmente durante el último trimestre de gestación (Radostits *et al.*, 2002).

2.5.1.2. En ovinos y caprinos

Los ovinos son considerados como los animales domésticos menos susceptibles, no obstante, sufren la infección por leptospiras patógenas y en muchos casos la evolución es asintomática, pudiendo a veces ocurrir brotes de enfermedad con aborto y muerte de corderos (Herrmann *et al.*, 2004).

La serovariedad más frecuente a nivel mundial es la *hardjo*, por tanto es la causante de problemas reproductivos en ovejas y muerte de corderos. Además de esta serovariedad, también se han descrito otras, pero con menor frecuencia, destacando la presencia de los serovares *pomona*, *ballum*, *bratislava* y *grippotyphosa* (Ellis, 1983).

En estas especies es raro encontrar la forma clínica, de manera que no existen descripciones buenas de la enfermedad natural, la mayoría de los animales se encuentran muertos aparentemente por septicemia. La enfermedad se caracteriza por fiebre, anorexia y en algunos animales por ictericia, hemoglobinuria, anemia, abortos, nacimientos de animales muertos o débiles e infertilidad. La virulencia del serovar infectante y el estado del animal determinan la gravedad del cuadro clínico (Radostits *et al.*, 2002 y Acha y Szyfres, 2003). La leptospirosis ovina se asemeja a la de los bovinos.

Se ha comprobado que los ovinos son muy sensibles a los contagios por leptospirosis (Beer, 1981). Los corderos de peor condición corporal son los más susceptibles. Puede ocurrir una forma crónica y se manifiesta con pérdida de la condición corporal, pero el aborto parece que es una manifestación casi exclusiva de la forma aguda cuando la infección está causada por *pomona*. En el caso de *hardjo*, se ha descrito como único signo clínico el aborto y en ovejas en lactación se han observado oligolactea y agalactia similares al síndrome bovino hipoagaláctico (Radostits *et al.*, 2002).

Algunos estudios serológicos, involucran a las serovariedades *hardjo* y *pomona* como causantes de abortos, mortinatos, muertes neonatales y una enfermedad hemolítica fatal de los ovinos. También existen informes que asocian a *hardjo* como responsable de agalactia en ovejas (Sánchez *et al.*, 1988).

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

2.5.1.3. En camélidos sudamericanos

Los efectos de la leptospirosis no son definidos claramente en estos animales, pero se presume que es similar al de otras especies. Un rancho en los EE.UU experimentó un “Aborto epizoótico”, los estudios consideraron a un número de enfermedades, y estos concluyeron que *L. grippotyphosa* estuvo relacionada. Por otro lado, la leptospirosis fue diagnosticada a la necropsia en un guanaco de un zoológico de tres meses de edad; este animal presentó signos clásicos de anemia hemolítica, disnea y aislamiento por intervalos. En un examen exhaustivo del guanaco se observó ictericia, anuria y no pasaje de heces. La creatinina sérica fue de 5.5 mg/dl, y el nitrógeno úrico en sangre fue de 80 mg/dl, el guanaco murió 48 horas después que fueron observados los primeros signos (Theford y Johnson, 1989 y Fowler, 1998).

2.5.2. Diagnóstico de laboratorio

2.5.2.1. Cultivo y aislamiento

Para el examen bacteriológico se puede usar sangre fresca u orina, según el período de la enfermedad. Si se practica una necropsia, se debe de hacer cultivo del riñón (Melnick y Adelberry, 1999 y Acha y Szyfres, 2003). Las muestras deben de tomarse antes de empezar la antibioterapia, la presencia de leptospiras en LCR es paralela a la de la sangre, tiempo después la orina es ideal para el cultivo. Los medios para el aislamiento de leptospiras son líquidos, semisólidos o sólidos. Ellinghause, McCullough, Jonson, Harris (EMJH) es un líquido o semisólido que contiene polisorbato 80 y suero de ternera fetal o albúmina sérica de bovino. La modificación del medio estándar mediante la adición de antibióticos o 5- fluorouracilo puede mejorar los resultados en el aislamiento de ciertos serovares leptospirales (Greene *et al.*, 2000).

En Chile se realizó una comparación de 2 técnicas de aislamiento de *L. interrogans* a partir de riñones de bovinos. De 81 riñones se obtuvieron muestras mediante dos procedimientos diferentes (raspado y biopsia), las que se sembraron en medio EMJH semisólido e incubaron a 30° C por 16 semanas. Se aislaron 13 cepas del serovar *hardjo* y 2 de *kennewicki*. La técnica de dilución del raspado fue notoriamente superior, logró el aislamiento de 14 de las 15 cepas, comprobándose, además, que los cultivos deben de mantenerse como mínimo durante 12 semanas en incubación (Riedemann y Zamora, 1990).

2.5.2.2. Pruebas serológicas

2.5.2.2.1. Prueba de aglutinación microscópica (MAT)

La prueba serológica de referencia y la más usada, es la de aglutinación microscópica. En la realización de esta prueba se debe incluir serovares representativos de los diferentes serogrupos y especialmente los que se presenten en la región. Es necesario tener en cuenta que las reacciones cruzadas se producen no sólo entre diferentes serovares del mismo serogrupo, sino que al principio de la infección (2-3 semanas) también se dan entre serovares de diferentes serogrupos, y puede predominar el título de un serovar heterólogo (Acha y Szyfres, 2003).

La MAT es una prueba compleja de controlar, realizar e interpretar. Se deben mantener cultivos vivos de todos los antígenos requeridos para su uso como antígenos. El cultivo semanalmente repetido de un gran número de cepas representa, un peligro para los trabajadores del laboratorio. Otras desventajas incluyen el riesgo continuo de contaminación cruzada de los cultivos de antígeno, necesitándose una verificación periódica de cada serovar. La lectura de la MAT se hace por microscopía de campo oscuro. El

punto final es la más alta dilución de suero en la que se presenta 50% de aglutinación. Debido a la dificultad para detectar cuando el 50% de las leptospiras están aglutinadas, el punto final es determinado por la presencia de aproximadamente 50% de leptospiras libres, leptospiras no aglutinadas comparadas con una suspensión control (Levett, 2001).

2.5.2.2.2. ELISA

Es mucho más precisa y tiene muchas ventajas desde el punto de vista de la práctica de laboratorio. Puede ser específica a anticuerpos IgM o IgG. En consecuencia, un resultado positivo de ELISA específico de IgM indica que la infección se produjo en el mes anterior. Esta prueba tiene una especificidad y sensibilidad diagnósticas excelentes (Radostits *et al.*, 2002). Además, presenta ventajas frente al MAT, como el hecho de no presentar riesgo sanitario para los operarios, ser de fácil estandarización y ser una prueba en la que las reacciones cruzadas son poco frecuentes. Sus principales desventajas radica en que normalmente son serovar específicos, con lo cual no obtendremos información acerca de una posible infección con otros serovares, y que no permite diferenciar entre anticuerpos vacunales y de infección (Alonso - Andycoberry *et al.*, 2001).

La prueba de ELISA ha sido descrita para la detección de la infección por serovares *pomona* y *hardjo* en bovinos; y *hardjo* en ovinos. Varias pruebas han sido evaluadas y están disponibles comercialmente para el serodiagnóstico de la infección por *hardjo* en bovinos. La detección de IgM por ELISA también ha sido aplicada para el diagnóstico en caninos (Levett, 2001).

Un ELISA indirecta para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de leptospirosis humana en el Perú con una mezcla antigénica

(pool) presentó una buena sensibilidad (97,5%) y alta especificidad (98,75%). El ELISA descrito podría servir como prueba para seguimiento de rutina en el diagnóstico de leptospirosis en laboratorio, recomendándose el uso de esta técnica, no obstante es necesario la confirmación con MAT como prueba de referencia (Céspedes *et al.*, 2002).

En la Argentina, de 356 muestras positivas a la prueba de microaglutinación, 354 fueron positivas y 2 no reactivas para el ELISA. El ELISA desarrollado y evaluado en las condiciones de este estudio mostró una alta sensibilidad (99,4%) y especificidad (96,1%), considerando como técnica serológica de referencia la prueba de microaglutinación microscópica. A pesar de haber usado el serovar *hardjo* como antígeno, el ELISA desarrollado reaccionó con anticuerpos específicos frente a los serovares *ballum*, *pomona*, *tarassovi* y *wolffi*; lo cual indicaría que los anticuerpos detectados son género específicos. Este estudio muestra que el ELISA IgG desarrollado es un alternativa útil para el diagnóstico de bovinos infectados con leptospiras (Lottersberger *et al.*, 2002).

2.5.2.2.3. Fijación de complemento

La fijación de complemento (CF) fue ampliamente usada, pero no fue estandarizada. La CF fue aplicada al diagnóstico veterinario, pero las diferencias específicas entre especies fueron notorias. La prueba de CF ha sido generalmente reemplazada por los métodos de ELISA (Levett, 2001).

2.5.2.2.4. Inmunofluorescencia

Es un método de diagnóstico rápido y preciso para detectar la presencia de leptospiras e identificar los serotipos en la orina (Radostits *et al.*, 2002), pero principalmente para su detección en tejidos fetales, ya que el

aislamiento a partir de los mismos es difícil, debido, a que, por los procesos de autólisis las leptospiras pierden su viabilidad (Alonso - Andycoberry *et al.*, 2001).

2.5.2.2.5. Técnicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos

La más utilizadas han sido las técnicas de hibridación con sondas de ADN marcadas y las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), actualmente la técnica más eficaz para la detección de leptospiras en la orina (Alonso - Andycoberry *et al.*, 2001). La prueba de hibridación del ácido nucleico es sensible y rápida para detectar las leptospiras en la orina de bovinos que se infectan después de la vacunación y tiene una validez superior al cultivo bacteriológico y a la prueba de inmunofluorescencia (Radostits *et al.*, 2002).

2.5.3. Diagnóstico diferencial

2.5.3.1. En bovinos

La leptospirosis debe de diferenciarse de cualquier enfermedad del ganado bovino que curse con hemoglobinuria, aborto y disminución de la producción láctea con aparición de mastitis. La forma hemolítica de la leptospirosis puede confundirse con otros procesos que cursen con hemólisis, hematuria, hemoglobinuria y daño hepatorenal, tales como envenenamiento por especies del género *Brassica* (nabo silvestre), babesiosis, hemoglobinuria posparto e infecciones por clostridios (Alonso - Andycoberry *et al.*, 2001).

En caso que se sospeche de leptospirosis aguda se debe de considerar a la babesiosis, anaplasmosis, intoxicación por nabos silvestres y coles, hemoglobinuria del puerperio y hemoglobinuria bacilar. En la leptospirosis

crónica; a problemas causante de aborto, también a la rinotraqueítis bovina infecciosa, aborto por protozoarios (*Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*), algunas causas menos frecuentes son la brucelosis, la diarrea viral bovina, campilobacteria y *Actinomyces pyogenes* (Radostits *et al.*, 2002).

2.5.3.2. En ovinos y caprinos

La intoxicación crónica por cobre y la causada por los nabos silvestres pueden cursar en los ovinos de forma similar a la leptospirosis, pero sin reacción febril (Radostits *et al.*, 2002).

2.6. CONTROL

2.6.1. Tratamiento

Las leptospiras son prácticamente sensibles a todos los antimicrobianos, a excepción de las sulfonamidas y el cloranfenicol, pudiendo utilizarse una amplia gama de ellos para el tratamiento de la infección. Sin embargo, la mayor limitación de los antimicrobianos es que no eliminan el estado de portador renal (Alonso - Andycoberry *et al.*, 2001). El tratamiento tiene un efecto limitado en el curso de la enfermedad, una vez que se ha desarrollado la uremia (Manual Merck, 2000).

En infecciones debidas a *pomona*, la dihidroestreptomicina (12 mg/kg de peso IM, dos veces al día durante 3 días) es eficaz para tratar la infección sistémica. Para eliminar la leptospiruria en los bovinos y porcinos, se recomienda una única dosis de dihidroestreptomicina (25 mg/kg de peso corporal, IM) (Acha y Szyfres, 2003).

La dihidroestreptomicina G (25 mg/kg de peso, IM durante 1, 3, ó 5 días), la oxitetraciclina (40 mg/kg de peso, IM diariamente, durante 3 ó 5 días) la tilosina (44 mg/kg de peso, IM diariamente durante 5 días) o la eritromicina (25 mg/kg de peso, IM diariamente durante 5 días) son eficaces para tratar la leptospirosis persistente debida a *pomona* en la especie porcina (Radostits *et al.*, 2002). Dihidroestreptomicina - penicilina G (25mg/kg) por 1, 3 ó 5 días de tratamiento en cerdos, es efectiva para el tratamiento de leptospirosis aguda y crónica (Alt y Bolin, 1996).

En un brote bovino, el tratamiento simultáneo de todos los animales con dihidroestreptomicina, en dosis de 25 mg/kg de peso IM, y la vacunación ha sido satisfactoria para prevenir nuevos casos de abortos, cuando se trata de vacas preñadas (Radostits *et al.*, 2002).

2.6.2. Profilaxis

En cuanto a los animales domésticos, la vacunación de cerdos, bovinos y perros es eficaz para prevenir la enfermedad, pero no protege por completo contra la infección, esto debido a una serie de desventajas, uno es que las vacunas comerciales son bacterinas (Ellis, 1996) y no proporcionan protección cruzada entre serovares distintos y sólo permiten una protección limitada frente a cepas distintas de un mismo serovar. Los serovares y las cepas de otros países o región, en otras zonas puede ser poco eficaz (Thierman, 1984).

Diversos estudios sobre las vacunas existentes han demostrado que la vacunación frente a *hardjo* con vacunas tanto monovalentes como pentavalentes, no evitan la infección, la migración al útero y oviducto ni la persistencia de la infección renal y por tanto no evitan la eliminación de leptospiras en la orina, ni el nacimiento de algunos terneros débiles y mortinatos. Entretanto *hardjo* a sido descrita como poco inmunogénica ya que a la prueba

serológica produce bajos títulos de anticuerpos aglutinantes, además que esos anticuerpos duran menos que los producidos por otras serovariedades (Bolin *et al.*, 1989 y 1991).

Un estudio fue realizado para evaluar la existencia de inmunidad cruzada entre las serovariedades *hardjo* y *wolffi* empleándose un método *in vivo*; los resultados mostraron que la vacuna contra *Leptospira wolffi* confiere inmunidad cruzada en hamster al desafiarlo contra *hardjo*; existiendo reacciones cruzadas entre *hardjo* y *wolffi* en hamster (Costa *et al.*, 1998). La respuesta inmunitaria es específica del serotipo y la protección depende del empleo de bacterinas que contengan los serotipos prevalentes en dicha área. La inmunidad es predominantemente serovar - específica, y es necesario conocer el serovar o serovares que actúan en un foco para poder inmunizar en forma correcta los animales (Radostits *et al.*, 2002 y Acha y Szyfres, 2003).

Se ha demostrado que la vacunación con bacterinas estimula al principio la producción de anticuerpos IgM, que desaparecen después de algunos meses para dar lugar a los IgG. La vacunación no interfiere con el diagnóstico por la pronta desaparición de los anticuerpos IgM, que actúan en la aglutinación. Los anticuerpos protectores son los IgG (Acha y Szyfres, 2003). Existen bacterinas para la protección de bovinos contra serovares *pomona*, *hardjo* y *grippotyphosa*; contra *pomona* en cerdos y contra *canicola* e *icterohaemorrhagiae* en perros. Las hembras deben ser vacunadas antes del período de la reproducción para protegerlas durante la preñez. Los animales jóvenes se pueden inmunizar a partir de los 3 ó 4 meses de edad. Con las bacterinas en uso se necesita una revacunación anual (Acha y Szyfres, 2003).

Cuando se diagnostica leptospirosis en vacas preñadas, durante la fase inicial, se puede evitar que ocurran otros abortos vacunando rápidamente a todo el rebaño y tratando simultáneamente a todos los animales con los antibióticos

apropiados. El antibiótico reduce el número de leptospiras en los riñones y otros tejidos por lo menos durante el tratamiento y proporciona una cierta protección hasta que se desarrolla la inmunidad inducida por la vacunación (Manual Merck, 2000).

En la Argentina se usa para la inmunización en bovinos una vacuna comercial trivalente inactivada, con gel de hidróxido de aluminio como adyuvante, que contiene las siguientes cepas: *L. interrogans* serovar *pomona* cepa Bayur, *L. interrogans* serovar *wolffi*, cepa 3704 y *L. interrogans* serovar *tarassovi* cepa Perepelicin, con 2 dosis de aplicación por vía intramuscular con 30 días de intervalo (Fontanals *et al.*, 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en dos fases: la primera, correspondió a la toma de muestras, que se llevó a cabo durante los meses de enero a marzo del 2003, en el C.I.P. Quimsachata perteneciente a la E. E. ILLPA del INIA, ubicada en el distrito de Santa Lucía, provincia de Lampa, departamento de Puno, a una altitud de 4300 m.s.n.m. , con una temperatura mínima de -4.7°C y una máxima de 13.2°C , y una humedad relativa de 55%; y la segunda fase, correspondiente al procesamiento de las muestras mediante la técnica de microaglutinación microscópica (MAT) y análisis de datos, que se realizó en los Laboratorios de Microbiología y Medicina Veterinaria Preventiva de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, en Lima.

3.2. ANIMALES

Los animales para el presente estudio estuvieron constituidos por alpacas de diferentes edades y sexo, procedentes de la localidad de Quimsachata - Puno

del INIA. El tamaño de muestra se calculó empleando la fórmula para estimar una proporción, para poblaciones finitas (Daniel, 1996):

$$n = \frac{NZ^2 pq}{d^2 (N - 1) + Z^2 pq}$$

donde:

- n : Tamaño de muestra.
- N : Tamaño de la población (1800)
- z : Valor tabular para 95% de confianza (1,96)
- p : Proporción de referencia (0,5)
- q : 1 - p
- d : Error máximo admisible (0.05)

El tamaño de muestra mínimo fue de 317 animales, no obstante por contar con la colaboración del INIA y para obtener una mejor estimación se tomó una muestra de 344 alpacas.

A fin de evaluar las variables edad y sexo, el tamaño de muestra establecido se estratificó proporcionalmente de acuerdo a las poblaciones específicas según edad y sexo, a través de la fórmula (Pérez, 2000):

$$nh = \frac{Nh}{N} \times n$$

donde:

- nh : Tamaño de muestra del estrato h (según edad o sexo)
- Nh : Tamaño del estrato h.
- N : Tamaño de la población
- n : Tamaño de muestra calculado.

El total de animales muestreados, estratificados de acuerdo a la población total fue la siguiente:

Tabla 1. Número de animales muestreados en el C.I.P. Quimsachata. 2003.

ALPACAS	Nh	nh
Tuis machos	293	56
Tuis hembras	230	44
Adultos machos	204	39
Adultos hembras	1073	205
TOTAL	1800	344

3.3. TOMA DE MUESTRAS

Se obtuvo muestras de sangre de los animales por punción de la vena yugular usando vacutainers 22 x 1½ procediéndose luego a la separación del suero sanguíneo mediante centrifugación, por 10 minutos a 3000 rpm. Los sueros fueron colocados en viales y congelados a -20° C, posteriormente fueron dispuestos en una caja térmica acondicionada con hielo y gel para la conservación de las muestras, para su posterior traslado al Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM en Lima, donde permanecieron hasta su análisis serológico en el Laboratorio de Microbiología.

3.4. Prueba serológica

3.4.1. Técnica de microaglutinación

La técnica se desarrolló de acuerdo al protocolo que existe en el Laboratorio de Virología de la FMV - UNMSM, que consiste en preparar

diluciones seriadas de las muestras de suero junto con suero fisiológico, de 1:50 hasta 1:1600, las cuales se colocaron en microplacas de 96 pozos. Luego de sembrar en cada uno de los pozos el antígeno de *Leptospira*, se llevó a incubar la placa en estufa por 2 horas a 28 °C. La lectura se hizo en un microscopio de campo oscuro, comparando los resultados de las muestras problema con el control positivo (antígeno) y negativo (suero fisiológico). Se consideró los sueros positivos aquellos que den títulos $\geq 1:100$.

3.4.2. Materiales y equipos

3.4.2.1. Materiales

- Medio base Fletcher para cultivo de leptospiras (Difco).
- Medio EMJH.
- Suero de conejo.
- Solución fisiológica o solución buffer como diluyente.
- Cepas de leptospiras *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona* y *hardjo*.
- Agua deionizada.
- Pipetas de 10 ml.
- Pipetas de 1 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Pipeta multicanal de 50 - 100 μ l.
- Pipeta de 10 - 100 μ l.
- Tubos con tapa rosca (10 ml.).
- Laminas portaobjeto.
- Frasco de vidrio de 500 ml. estéril.
- Microplacas de 96 pocillos.
- Guantes estériles.
- Aceite de inmersión.
- Papel para lente de microscopio.

3.4.2.2. Equipos

- Máquina de autoclave.
- Estufa de 32 °C.
- Estufa de 28 °C.
- Baño María.
- Balanza de precisión.
- Microscopio de campo oscuro.
- Cámara de flujo laminar.

3.5. Análisis de datos

Los resultados, tanto el estimado general como los específicos (según sexo y edad) son expresados en forma porcentual (porcentaje de prevalencia) (Sentís *et al.*, 1995), de acuerdo a la positividad de los sueros a la prueba serológica, acompañado de sus respectivos intervalos de confianza, según la fórmula siguiente:

$$P = \frac{\text{N}^\circ \text{ de sueros positivos}}{\text{N}^\circ \text{ de sueros analizados}} \times 100$$

El resultado se expresa en forma porcentual con intervalo de confianza del 95%.

$$IC_{0,95} = p \pm Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{p \times q}{n}}$$

donde:

Z : 1.96

p : Prevalencia calculada.

q : 1 - p

n : Número de sueros analizados.

Se analizó además, la asociación del evento en estudio (reactores a leptospirosis) con las variables consideradas (sexo y edad) mediante la prueba no paramétrica de Chi cuadrado (Berquó *et al.*, 1981), usando la siguiente fórmula:

$$X^2_c = \sum_{i=1}^k \left[\frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \right]$$

Grados de libertad: $gl = (F - 1)(C - 1)$

decisión:

Si:

$X^2_c > X^2_t$, entonces existe asociación estadística significativa

$X^2_c < X^2_t$, entonces no existe asociación estadística significativa

IV. RESULTADOS

De 344 muestras de sueros analizados 154 (44,77% \pm 5,25) fueron positivos a anticuerpos contra leptospiras mediante la prueba de microaglutinación (MAT). Los serovares detectados fueron *pomona*, *icterohaemorrhagiae*, y/o *canicola*, no encontrándose ningún reactor a *hardjo*. El cuadro 1 muestra las frecuencias de serovares detectados en los animales, observándose que el más frecuente fue *pomona* con 43,60% \pm 5,24 (150/344), seguido de *icterohaemorrhagiae* con 9,88% \pm 3,15 (34/344) y *canicola* con 1,45% \pm 1,26 (5/344), además 10,17% \pm 3,19 (35/344) presentaron reacción múltiple a los tres serovares. En el cuadro 3, se presenta la distribución de los serovares empleados en el estudio, según los grupos establecidos por sexo y edad, destacando la predominancia del serovar *pomona* y ausencia de reactores para *hardjo*.

Cuadro 1. Frecuencias de serovariedades detectadas en las alpacas mediante la prueba de MAT. CIP Quimsachata, Puno, 2003.

SEROVARIEDAD	N	Prevalencia e IC _(0,95)
<i>pomona</i>	150	43,60% \pm 5,24
<i>icterohaemorrhagiae</i>	34	9,88% \pm 3,15
<i>canicola</i>	5	1,45% \pm 1,26
Reacción múltiple	35	10,17% \pm 3,19

Cuadro 2. Distribución de alpacas según sexo y edad, y su reacción a leptospirosis mediante la prueba de MAT. CIP Quimsachata, Puno, 2003.

ANIMALES	positivos	Negativos	Total
Tuis machos	0	56	56
Tuis hembras	0	44	44
Adultos machos	29	10	39
Adultos hembras	125	80	205
TOTAL	154	190	344

Cuadro 3. Distribución de animales positivos a las serovariedades de Leptospira. CIP Quimsachata, Puno, 2003.

EDAD Y SEXO	SEROVARIEDADES			
	<i>canicola</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>pomona</i>	<i>hardjo</i>
Tuis machos	0	0	0	0
Tuis hembras	0	0	0	0
Adultos machos	4	4	28	0
Adultos hembras	1	30	122	0
TOTAL	5	34	150	0

Para evaluar el sexo de los animales relacionado a la positividad a leptospirosis y teniendo dos grupos de edad establecidos, se analizaron por separado; así, no se observó ningún suero positivo en aquellos animales clasificados como tuis; mientras que los hallazgos en los animales adultos fueron los siguientes: hembras 60,98% \pm 6,68 y machos: 74,36% \pm 13,70 (Cuadro 4). La mayoría de los sueros positivos a leptospirosis reaccionaron frente a un solo serovar (119), mientras que a dos serovares reaccionaron 34 sueros, y sólo un suero reaccionó frente a tres serovares (Cuadro 5). Los títulos altos de los sueros positivos fueron para *canicola* 1:200, para *icterohaemorrhagiae* 1:6400; y para *pomona* 1:12800 (Cuadro 6).

Cuadro 4. Distribución de alpacas según sexo y reacción a la prueba MAT para el diagnóstico de leptospiras. CIP Quimsachata, Puno, 2003.

GRUPO Y EDAD	N	Reactores	Prevalencia e IC_(0,95)
Tuis machos	56	0	0
Tuis hembras	44	0	0
Adultos machos	39	29	74,36% ± 13,70
Adultos hembras	205	125	60,98% ± 6,68
TOTAL	344	154	44,77% ± 5,28

Cuadro 5. Distribución de alpacas según sexo y edad y su reacción frente al número de serovares de leptospira. CIP Quimsachata, Puno, 2003.

ANIMALES	1 serovar	2 serovares	3 serovares	Total
Tuis machos	0	0	0	0
Tuis hembras	0	0	0	0
Adultos machos	22	6	1	29
Adultos hembras	97	28	0	125
TOTAL	119	34	1	154

Cuadro 6. Distribución de animales adultos por sexo y serovar a la dilución. CIP Quimsachata, Puno, 2003.

SEROVAR	ANIMALES	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
<i>canicola</i>	Machos		4						
	Hembras		1						
<i>ictero.</i>	Machos	3						1	
	Hembras	24	4	1				1	
<i>pomona</i>	Machos	4	1	8	9	1	2	2	1
	Hembras	13	23	24	33	10	11	3	5

Al evaluar la positividad de los sueros relacionados con la variable sexo, se observa ausencia de significación estadística ($p > 0.05$) indicando independencia de las variables evaluadas. Al considerar la variable edad se observa claramente la existencia de asociación estadística, toda vez que no hubo ningún positivo en los animales jóvenes ($p < 0,05$).

V. DISCUSIÓN

La presencia de animales positivos en el C.I.P. Quimsachata de la E.E. ILLPA del INIA - Puno, permite incluir a esta especie dentro de animales susceptibles a infecciones por leptospira. De acuerdo a los resultados hallados en el estudio, la seroprevalencia para los animales muestreados fue de 43,6% para *pomona*, 9,88% para *icterohaemorrhagiae* y 1,45% para *canicola*; Rosadio *et al.* (2003), hallaron los mismos serovares en alpacas de Cuzco, pero difieren en la prevalencia para *icterohaemorrhagiae* (19%) y *canicola* (47%), solamente el serovar *pomona* (47%) coincide con lo obtenido; no obstante, los hallazgos de Herrera *et al.* (2000), *pomona* (79,2%) e *icterohaemorrhagiae* (3,8%) resultan significantes, ya que el serovar *pomona* se observa altamente predominante en las investigaciones.

Cabe destacar que el muestreo en los estudios anteriores se realizó en época de lluvias, y se sabe que las leptospiras son dependientes de condiciones ambientales óptimas para su supervivencia y desarrollo; pero las condiciones ambientales y climáticas de las zonas altoandinas donde habitan los camélidos sudamericanos difieren totalmente, ya que presenta un clima seco, temperaturas extremas de lluvias estacionales y por lo general escasas. Al respecto, Herrera *et al.* (2000) realizando estudios de prevalencia en alpacas en épocas de lluvias y

seca en diferentes años, mencionan que las lluvias funcionan como un factor condicionante para la infección por leptospiras, afirmando que la ocurrencia de leptospirosis en alpacas debe ser de una etiología multifactorial.

La presencia de otras especies en el hábitat de los camélidos podría contribuir a que la enfermedad esté presente durante todo el año, así, Liceras de Hidalgo *et al.* (1989) mencionan infección por serogrupos de Pomona y Sejroe en bovinos; y Ballum, Pomona, Australis y Hebdomadis en ovinos de Puno; además, se ha mencionado casos de cobayos silvestres en el departamento de San Martín con anticuerpos contra el serovar *pomona* y otro en el departamento de Puno con anticuerpos contra el serovar *ballum*.

El no hallar sueros positivos en los animales jóvenes (tuis), es contrario a lo que se menciona sobre leptospirosis, en el sentido que la enfermedad es más severa en los terneros, en los cuales se observa detención en el desarrollo y una tasa de mortalidad variable; además, la serovariedad *pomona* es un patógeno porcino para el que el ganado vacuno es un hospedador accidental, causando abortos en vacas y una enfermedad hemolítica mortal en terneros (Radostits *et al.*, 2002 y Acha y Szyfres, 2003). Por otro lado, la transferencia pasiva de anticuerpos a los terneros recién nacidos ocurre a través del calostro y los anticuerpos persisten en los terneros durante 2 a 6 meses, presentando títulos de anticuerpos similar al de sus madres (Merck, 2000 y Levett 2001). En el caso de los ovinos, éstos no son hospedadores de mantenimiento naturales de *pomona* y *hardjjo*, y suelen tener infecciones de duración relativamente corta (Radostits *et al.*, 2002).

Los títulos máximos hallados para *pomona* (1/12800), *icterohaemorrhagiae* (1/6400) y *canicola* (1/200), difieren de lo hallado por Macedo y Hung (1993), que reportaron títulos para *icterohaemorrhagiae* de 1/1000, además de hallar títulos para *castellonis* de 1/10000. En caso de infección por *pomona* los bovinos tienden a desarrollar una titulación elevada de aglutininas con o sin enfermedad clínica, y

no permanecen como portadores a largo plazo, en consecuencia las infecciones por pomona pueden quedar limitadas a un único rebaño (Radostits *et al.*, 2002). El hallazgo de títulos altos de anticuerpos en varios animales del rebaño y una sintomalogía clínica compatible con leptospirosis indican una infección reciente, por el contrario, títulos bajos pueden significar anticuerpos residuales de una infección pasada o anticuerpos de reciente formación que aún no han tenido tiempo de alcanzar un nivel alto (Acha y Szyfres, 2003).

La diferencia encontrada entre animales positivos machos (29) y hembras (125) coincide con los estudios de Ludeña y Vargas (1982), donde hallaron 2 % de machos sobre el total de machos muestreados, y 3% de hembras positivas a leptospiras sobre el total de hembras muestreadas.

VI. CONCLUSIONES

- Se ha determinado una prevalencia de leptospirosis en alpacas de $44,77\% \pm 5,28$.
- De los resultados obtenidos, los serovares que más frecuentemente reaccionaron al MAT frente al suero de alpaca, fueron *pomona* 43.60% (150/344), *icterohaemorrhagiae* 9.88% (34/344) y *canicola* 1.45% (5/344).
- Los altos títulos hallados para *pomona* e *icterohaemorrhagiae* en estos animales, sugieren una fuerte infección activa durante la época de lluvia.
- No se ha observado efecto del sexo relacionado a la infección de leptospirosis. A su vez, el no haber hallado sueros positivos en los animales jóvenes (tuis), puede deberse al tipo de manejo que se realiza en la estación experimental, aunque aún esto no está muy claro.
- Los resultados obtenidos en el país de otros trabajos de investigación sobre leptospira, junto con lo hallado en el presente estudio permiten inferir que la fuente de infección de las alpacas, puede deberse a la convivencia con otras especies domésticas y/o roedores silvestres.

VII. RECOMENDACIONES

- Se debe de continuar con investigaciones sobre la epidemiología de esta enfermedad, para saber cual es el rol de estos animales, si actúan como hospedadores de mantenimiento o incidental, ampliando el número de cepas de leptospiras.
- Realizar estudios para determinar el rol del agente etiológico en problemas reproductivos de los camélidos sudamericanos, ya sea en unidades de explotación mixta alpaca - ovino o alpaca - bovino - ovino.

VII. REVISIÓN DE LITERATURA

1. **Acha, P. ; B. Szyfres. 2003.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol. I, 3ª ed., p. 175 - 186. Publicación científica y técnica N° 850. Organización Panamericana de la Salud. Washington. EUA.
2. **Almenteros, C.; G. Arrieta; S. Mattar; A. Barguil; L. Tamayo; T. Padilla; Z. Bedoya; S. Mendoza; F. Estereta; N. Díaz; C. Estrada; A. Medina; A. Rodríguez; M. De la Ossa; A. Pérez; R, Ríos. 2004.** Seroprevalencia de leptospirosis porcina en el Departamento de Córdoba. Rev. Col. Cien. Pec., 17(2): 141 - 147.
3. **Alonso - Andicobery, C.; F. García - Peña; L. Ortega - Mora. 2001.** Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina. Revista Agraria: Prod. Sanid. Animal., 16(2): 205 - 225.
4. **Alt, D. ; C. Bolin. 1996.** Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* serovar *pomona* infection in hamster and swine. Am. J. Vet. Res., 57(1): 59 - 62.

5. **Ameghino, E. ; J. De Martini. 1991.** Mortalidad en crías de alpacas. IVITA. UNMSM. INIAA.
6. **Ayala, I.; M. Fors; J. Puentes; M. Mas. 1998.** Nuevo medio de cultivo para el aislamiento de *Leptospira sp.* Rev. Cubana Med. Mili., 27(1): 44 - 48.
7. **Barbudo, J.; R. Girio; L. Mathias; A. Oliveira ; M. Marinho. 1999.** Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira interrogans* em soros de ovinos do estado de São Paulo. Avaliação do serotipo *jequitiaia* de *Leptospira biflexa* como antígeno de triagem sorológica. Ars Veterinaria, 15(1): 26 - 32.
8. **Belitardo, D.; J. Freitas; E. Müller. 2000.** Leptospirose em animais do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Semina: Ci. Agrarias, 21(1): 19 - 25.
9. **Berr, J. 1981.** Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Tomo II, p. 269 - 286. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
10. **Berquó, E.; J. Souza; S. Gotlieb. 1981.** Bioestatística. p. 281 - 285. Ed. EPU, Sao Paulo, Brasil.
11. **Brihuega, B.; L. Leoni; M. Martínez. 1996.** Leptospirosis en llamas (*Lama glama*): Estudio serológico. Rev. Arg. Prod. Anim., 16(4): 393 - 396.
12. **Bolin, C.; A. Thiermann; A. Hadnsaker; J. Foley. 1989.** Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis infection in pregnant cattle. Am. J. Vet. Res., 50: 161 - 165.

13. **Bolin, C.; J. Cassells; B. Phil; R. Zuerner; G. Trueba. 1991.** Effects of vaccinations with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* vaccine on type *hardjo-bovis* infections of cattle. Am. J. Vet. Res., 52: 1639 - 1643.
14. **Brooks G.; J. Butel; S. Morse. 1999.** Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 16^a ed., p. 365 - 367. Editorial el Manual Moderno. México D.F. México.
15. **Bustinza, M.** 1984. In The Camels. Vol I. Edit. W. Ross & Cocrill, Sweden.
16. **Canale - Parola E. 1984.** Order I. Spirochaetales Buchanan 1917, 163^{al}. En: Bergery's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I, p. 38 - 39. Williams & Wilkins, Ed. Baltimore, USA.
17. **Céspedes, M.; M. Glenny; V. Felices; L. Balda; V. Suárez. 2002.** Prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de leptospirosis humana. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública, 19(1): 24 - 27.
18. **Céspedes, M; M. Ormaeche; P. Condori; L. Balda; M. Glenny. 2003.** Prevalencia de leptospirosis y factores de riesgo en persona con antecedentes de fiebre en la provincia del Manú, Madre de Dios, Perú. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública 20 (4): 180 - 185.
19. **Costa, M.; E. Moreira; R. Leite; N. Martins. 1998.** Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira hardjo* e *L. Wolffi*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 50(1): 11 - 17.

20. **Cruz, R.; F. Fernández; H. Arévalo. 2002.** Hiperendemicidad de leptospirosis y factores de riesgo asociados en localidades arroceras del Departamento de San Martín - Perú. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública, 19(1): 10 - 16.
21. **Daniel W. 1996.** Bioestadística. 5ª. Ed. p. 205 - 207. UTEHA Ed. México, México.
22. **Ellis, W.A. 1983.** Possible involvement of leptospire in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. Veterinary Record. 26(12): 291 - 293.
23. **Ellis, W.A. 1994.** Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet. Clin. North. Am., Food anim. Pract., 10: 463 - 478.
24. **Ellis, W.A. 1996.** Leptospirosis. O.I.E. Manual: Amedet I, 1 - 8.
25. **Elizalde A.; G. Tenorio; O. Velasco. 2004.** Identificación de *Leptospira* en la patogénesis de la uveítis crónica en la ciudad de México. Rev. Mex. Oftalmol., 78(4): 164 - 170.
26. **Everard, C.; S. Bennett; C. Edwards; G. Nicholson; T. Hasell; D. Carrington. 1992.** An investigation of some risk factors for severe leptospirosis on Barbados. J. Trop. Med. Hyg., 95: 13 - 22.
27. **Farr R. 1995.** Leptospirosis. Clinical infections Disease, 21(1): 1 - 6.
28. **Fernández, J.; V. Reyes; A. De la Peña. 1993.** Detección de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* en bovinos de hatos lecheros en el valle de Atlixco, Puebla, mediante la prueba de aglutinación microscópica. Vet. Mex., 24(1): 47 - 49.

29. **Fernández - Baca, S. 1991.** Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. p. 265 - 305. Oficina Regional de la FAO. Santiago, Chile.
30. **Fontanals, A.; P. Llorente; L. Sanmartino; S. Mundo. 2002.** *Leptospira interrogans* serovar *pomona*: Detección de diferencias antigénicas entre tres aislamientos regionales de bovinos y una cepa de referencia. Disponible en: www.drwebsa.com.ar/aam/rev_033/vol_033_02/o33_08-htm.
31. **Fowler, M. 1998.** Medicine and surgery of south american camelids. 2^a ed., p. 176 - 177. Iowa State University Press/Ames.
32. **Giraldo de León, G.; A. Orrego; M. Santacruz; E. Yepes. 2002.** Leptospirosis: Las aguas de la explotación porcina como vehículo de la leptospira, en la zona central cafetera de Colombia. Arch. Med. Vet., 34(1).
33. **Greene, C.; M. Miller; C. Brown. 2000.** Enfermedades infecciosas en perros y gatos. 2^a ed., p. 302 - 311. Mc. Graw - Hill Interamericana. México.
34. **Herrera, J.; S. Vasconcellos; Z. Morais; F. Ferreira; S. Sakamoto; J. Ferreira; S. Pinheiro. 2000.** Soropositividade para leptospirose em alpacas criadas no altiplano peruano. Puno, Peru. Análise de associação com o índice pluviométrico. Arq. Inst. Biol., 67(2): 171 - 176.
35. **Herrmann, G.; A. Pereira; E. Moreira; J. Haddad; J. Rescende; R. Rodrigues; R. Leite. 2004.** Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural, 34(2): 443 - 448.

36. **Holt J.; N. Krieg; P. Sneath; J. Staley; S. Williams. 1994.** Bergery's Manual of Determinative Bacteriology. p. 27 - 37. Williams & Wilkins, Ed. Baltimore, USA.
37. **Jaramillo, K.; R. Torres; I. Sal y Rosas; J. Lucero; M. Gleny. 2002.** Estudio serológico de IgG contra leptospirosis en trabajadores del camal Municipal de Huaraz. Ancash - 2001. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública, 19: 20 - 21.
38. **Johnson, L.W. 1989.** Llama reproduction. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., 5: 159 - 182.
39. **Johnson R.C; S. Faine. 1984.** Family II. Leptospiraceae Pillot 1965, 79^{al}. En: Bergery's Manual of Systematic Bacteriology. Vol I., p. 39 - 66. Williams & Wilkins, Ed. Baltimore, USA.
40. **Jubb; K.; P. Kennedy; N. Palmer. 1991.** Patología de los animales domésticos. 3° ed. Tomo II, p. 434. Editorial Hemisferio Sur. Montevideo. Uruguay.
41. **Levett, P. 2001.** Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev., 14(2): 296 - 326.
42. **Liceras de Hidalgo, J.; S. Valdivia; E. Higuchi. 1989.** Leptospirosis en el Perú. En: Análisis del seminario nacional de zoonosis y enfermedades de transmisión alimentaria 3-4 de julio Lima - Perú. p. 7 - 20. Ceres Editora. Lima. Perú.
43. **Lottersberger, J.; R. Pauli; N. Vanasco. 2002.** Desarrollo y validación de un enzimoimmunoensayo para el diagnóstico de Leptospirosis bovina. Arch. Med. Vet., 34 (1).

44. **Little, T. 1986.** Changes in our understanding of the epidemiology of leptospirosis. En: Ellis W.A. Little T (eds). Present state of leptospirosis diagnosis and control. p. 149 - 173. Martinus Nijhoff Publishers.
45. **Ludeña, H.; A. Vargas. 1982.** Leptospirosis en alpacas. Avance Veterinario, 2(2): 27 - 28.
46. **Llorente, P.; L. Leoni; M. Martínez. 2002.** Leptospirosis en camélidos sudamericanos. Estudio de prevalencia serológica en distintas regiones de la Argentina. Arch. Med. Vet., 34(1): 59 - 68.
47. **Macedo, A.; A. Hung. 1993.** Leptospirosis: Estudio serológico en alpacas (*Lama pacos*) de la SAIS Picotani - Puno. Rev. Per. Med. Trop. U.N.M.S.M. 7(2): 11 - 14.
48. **Madigan, H.; J. Martinko; J. Parker. 1997.** Brock: Biología de los microorganismos. p. 688 - 689. Editorial Prentice Hall. Madrid. España.
49. **Manual Merck de veterinaria. 2000.** 5° ed., p. 376, 529 - 533, 1111. Océano Grupo Editorial, S.A. Barcelona. España.
50. **Martínez R.; A. Obregón; A. Pérez; A. Baly; M. Díaz; M. Baro; R. Menéndez; A. Ruiz; G. Sierra; A. López. 1998.** Reactogenicidad e inmunogenicidad de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana. Rev. Cub. Med. Trop., 50(2): 159 - 166.
51. **Moles, L.; R. Urrutia; F. Diosdado; A. Morilla. 1998.** Frecuencia de *Letospora interrogans* en unidades de producción porcina del altiplano de México. Vet. Méx. 29(1): 49 - 52.

52. **Muñoz, K.; C. Cornejo; H. Rivera. 2000.** Anticuerpos contra leptospira en capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de un zocriadero de la amazonía peruana. Rev. Inv. Vet. Perú, 11(2): 167 - 169.
53. **Ochoa, J.; A. Sánchez; I. Ruiz; 2000.** Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. Rev. Panam. Salud Pública, 7(5): 325 - 331.
54. **Pérez C. 2000.** Técnicas de muestreo estadístico. Ed. Alfaomega. p. 244 – 246. México.
55. **Perolat, P. 1997.** Epidemiology of leptospirosis, in New Caledonia (South Pacific): a one - year survey. Eur. J. Epidemiol., 13(2): 161 - 167.
56. **Prescott, L.; J. Harley; D. Klein. 2000.** Microbiología. 4° ed., p. 98 - 99, 466 - 469. Mc Graw - Hill Interamericana. España.
57. **Radostits, M.; C. Gay; D. Blood; K. Hinchcliff. 2002.** Medicina Veterinaria: Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Vol. I, 9ª ed., p. 1151 - 1168. Mc. Graw - Hill Interamericana. España.
58. **Riedemann, S.; H. Leal; J. Zamora. 1986.** Diagnóstico serológico de leptospirosis bovina en cuatro regiones de Chile. Arch. Med. Vet., 18(2): 129 - 133.
59. **Riedemann, S.; J. Zamora. 1990.** Comparación de dos técnicas de aislamiento de *Leptospira interrogans* a partir de riñones de bovinos. Arch. Med. Vet., 22(2): 175 - 177.

60. **Rodríguez; A.; B. Ferro; M. Varona; M. Santafé. 2004.** Evidencia de exposición a *Leptospira* en perros callejeros de Cali. *Biomédica*, 24: 291 - 295.
61. **Rosadio, R.; H. Rivera; A. Chávez; E. Serrano; R. Quispe; J. Rodríguez. K. Yaya. 2003.** Seroprevalencia de agentes abortigenicos en alpacas de la provincia de Canchis, (Cuzco, Perú). En: III Congreso Mundial de Camélidos Oruro, Bolivia, p. 863 - 868.
62. **Sacsquispe, R.; M. Glenny; M. Céspedes. 2003.** Estudio preliminar de leptospirosis en roedores y canes en Salitral, Piura - 1999. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública*, 20(1): 39 - 40.
63. **Sánchez, H.; O. Zepeda; A. Ortiz; J. Tortora. 1988.** Seroprevalencia de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* en ovinos criollos e importados. *Téc. Pec. Méx.*, 26(1): 78 - 80.
64. **Sentís, H; H. Pardell; E. Cobo; J. Canela. 1995.** Bioestadística. 2ª ed. p. 115 - 117. Ed. Masson, S.A. Barcelona, España.
65. **Sosa, G.; O. Santos; C. Duarte; D. Hernández; L. Delgado. 1988.** Investigación serológica y bacteriológica de leptospirosis realizada en fauna exótica. *Rvta. Cub. Cienc. Vet.*, 19(3): 219 - 226.
66. **Theford, T. ; L. Johnson. 1989.** The veterinary clinics of North America. Food animal practice, 1: 147 - 149.
67. **Thiermann, A. 1984.** Leptospirosis: Current developments and trends. *JAVMA*, 181: 722 - 725.

68. **Trigo, F. 1998.** Patología Sistémica Veterinaria. 3° ed., p. 344 - 345. Mc Graw - Hill Interamericana. México.
69. **Tripathy, D.; L. Hanson; M. Mansfield; J. Thilsted. 1985.** Experimental infection of lactating goats with *Leptospira interrogans* serovars *pomona* and *hardjo*. Am. J. Vet. Res., 46(12): 2512 - 2514.
70. **Trueba, G.; S. Zapata; K. Madrid; N. Peñafiel. 2002.** Adaptación de *Leptospira interrogans* (*sensu estricto*) al agua dulce. Rev. Cubana Med. Trop., 54(1): 1 - 4.
71. **Webster, J.; W. Ellis; D. Macdonald. 1995.** Prevalence of *Leptospira spp.* in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. Epidemiol. Infect., 114(1): 195 - 201.
72. **Zamora, J.; S. Riedemann; M. Frías. 1988.** Leptospirosis bovina. Aislamiento de los serovares *hardjo bovis A* y *portlanvere*. Arch. Med. Vet., 20(2): 136 - 140.
73. **Zamora, J.; S. Riedemann; M. Montecinos; X. Cabezas. 1991.** Aislamiento en Chile de *Leptospira interrogans* serovares *hardjo* y *kennewicki* de bovinos aparentemente sanos. Arch. Med. Vet., 28(2): 131 - 135.
74. **Zepeda, O.; H. Sánchez; A. Mendez. 1986.** La rata en la epizootiología de la leptospirosis en granjas porcinas. Téc. Pec. Méx., 52: 29 - 44.
75. **Zepeda, O.; H. Sánchez; M. Sánchez; G. Mapes. 1988.** Estudio serológico de leptospirosis en cabras criollas e importadas provenientes de diferentes estados de la República Mexicana. Téc. Pec. Méx. 26(1): 63 - 66.

VII. ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo del Test de Microaglutinación Microscópica (MAT)

Insumos

- Cepas de entre 7 y 15 días de incubación.
- Solución fisiológica o solución buffer fosfato como diluyente.
- Pipeta multicanal de 50 – 100 µl.
- Pipeta 1 ml.
- Tubos hemólisis.
- Microplacas de 96 pocillos.
- Ansa.
- Sueros problemas sin hemólisis, ni contaminación marcada.

Se deben de llevar todos los materiales a temperatura ambiental.

Método

1. Observar las cepas. Determinar concentración óptima.
2. Transvasar asépticamente la cantidad necesaria de cada cepa a tubos debidamente rotulados.
3. Dilución de los sueros:
1:50 10 µl. + 490 µl. de SFE.
4. Rotular debidamente la placa.

	Can .	Ictero.	Pom.	Hard.
Control	○	○	○	○
Suero 1	○	○	○	○

1° 50 µl. de Ag
2° 50 µl. de SFE

3° 50 µl. de Ag
4° 50 µl. de suero 1:50

5. Incubar a 37 °C. 1h, 2h a 30 °C.

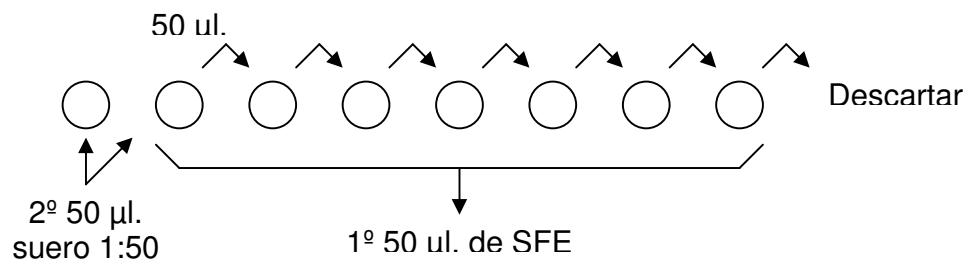
6. Lectura

En condensador. Aceite, colocarlo al pegado al porta.

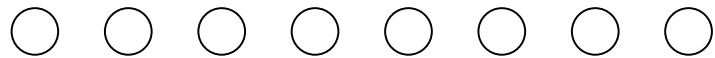
Reacción POSITIVA, cuando se observe más del 50% de aglutinación.

7. Suero POSITIVO.

3º Efectuar diluciones.



Diluciones:



1:100 1:200 1:400 1:800 1:1600 1:3200 1:6400 1:12800

4º Agregar a todos los posillos 50 µl. de antígeno.

8. Incubar a 37 °C. 1h, 2h a 30 °C.

9. Lectura:

En condensador. Aceite, colocarlo al pegado al porta.

Reacción POSITIVA, cuando se observe más del 50% de aglutinación.

ANEXO 2

Protocolos de medios de cultivo

MEDIO FLETCHER

	AD c.s.p. Cantidad final de medio		
	1000 ml.	500 ml.	250 ml.
Peptona	0,3 gr.	0,15 gr.	0,075 gr.
Extracto de carne	0,2 gr.	0,1 gr.	0,05 gr.
Cloruro de sodio	0,5 gr.	0,25 gr.	0,125 gr.
Agar	1,5 gr.	0,75 gr.	0,375 gr.
	2,5 gr.	1,25 gr.	0,625 gr.

Agregar 10% de volumen de suero de conejo estéril (inactivado por calor a 56 °C por 30') entibiado a 50 °C.

Fraccionar a temperatura adecuada (contiene agar). PH: 7,2 - 7,6.

MEDIO DE CULTIVO EMJH

Leptospira Médium base EMJH - DIFCO*, deshidratado.....	2,3 gr.
AD c.s.p. (autoclavar 15' a 121 °C.).....	900 ml.
Suplemento de enriquecimiento**	100 ml.

* Leptospira Médium Base EMJH - DIFCO, deshidratado, contiene c/100gr.

Sodium phosphate dibasic.....	1,0 gr.
Potassium phosphate monobasic.....	0,3 gr.
Ammonium chloride.....	0,25 gr.
Sodium chloride.....	1,0 gr.
Thiaminae.....	0,005 gr.

**** Suplemento de enriquecimiento (9 partes medio basal: 1 parte enriquecimiento)**

I Albúmina bovina

Fracción V (sigma 96 - 99%) 10 gr.

AD 50 gr.

Espolvorear la albúmina sobre 50 ml. de AD en un Erlenmeyer de 1L., dejando que se hidrate sola, sin agitar.

II Agregar las siguientes soluciones stock:

Cada producto disuelto en AD estéril

Producto	Cantidad	50 ml.	25 ml.	10 ml.
Ca Cl ₂	1 ml.	0,75 gr.	0,37 gr.	0,15 gr.
Mg Cl ₂	1 ml.	0,75 gr.	0,37 gr.	0,15 gr.
Zn SO ₄	1 ml.	0,2 gr.	0,1 gr.	0,04 gr.
Fe SO ₄	10 ml.	0,25 gr.	0,125 gr.	-
Cianocobalamina (B 12)	1 ml	0,02 gr.	0,01 gr.	0,004 gr.
Twenn 80	12,5 ml.	4 ml.	2 ml.	-

PH: 7,4

Unir I y II en las cantidades mencionadas, completar a 100 ml. con AD estéril. Filtrar para esterilizar (es ideal el fraccionamiento en 50 ml para freezer).

ANEXO 3

Modelos de hojas de trabajo para Leptospira

HOJA DE TRABAJO N° 1*

+ : Positivo
- : Negativo

N°	N° suero	Edad T - A	Sexo M - H	canicola		ictero.		pomona		hardjo	
				1:50	1:100	1:50	1:100	1:50	1:100	1:50	1:100
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											

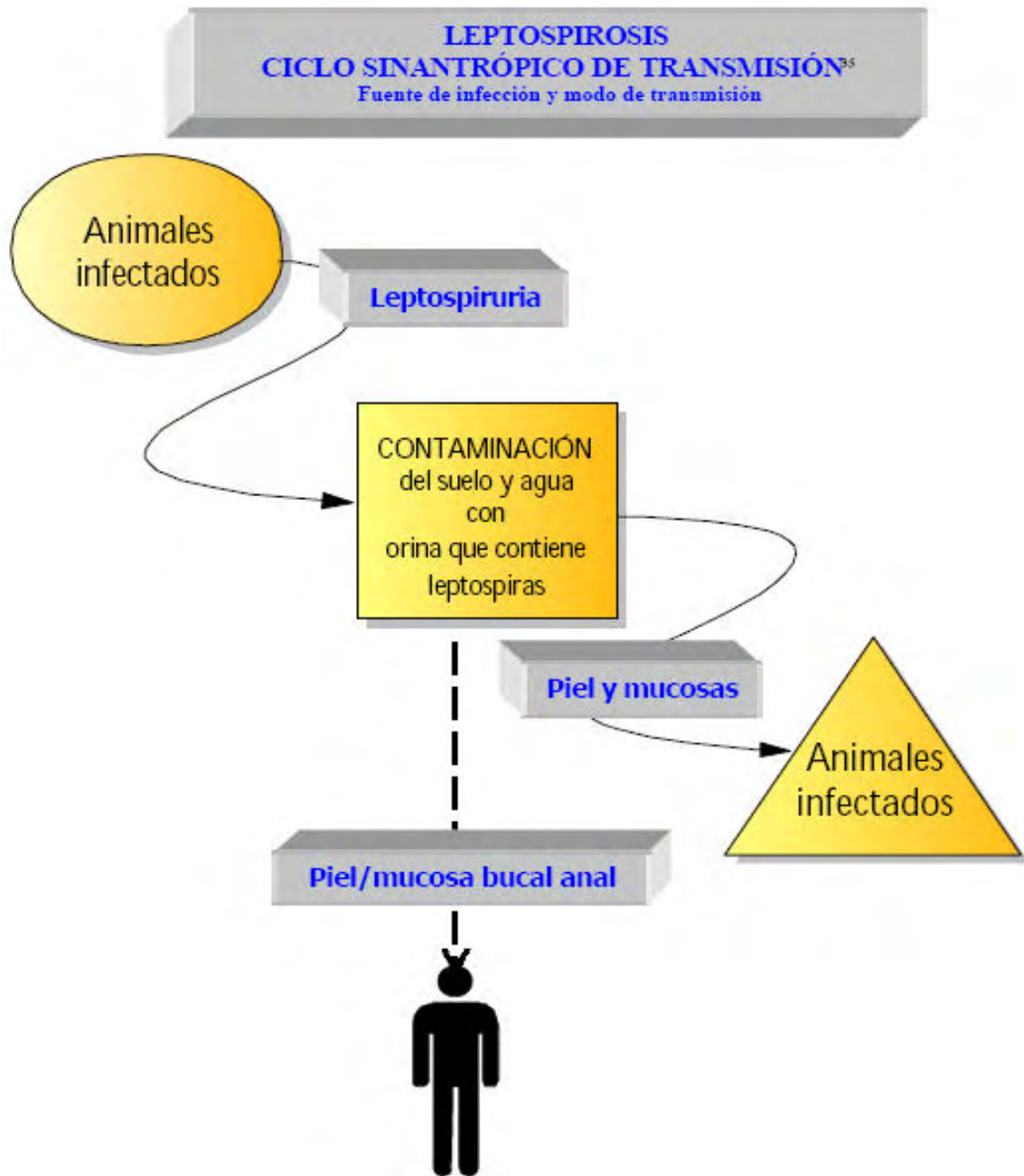
HOJA DE TRABAJO N° 2**

+ : Positivo
- : Negativo

N°	N° Suero	Edad	Sexo											
				1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600		
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														

* y ** Elaborados por el tesista.

ANEXO 4



Fuente: Leptospirosis. Módulos Técnicos 2002. Oficina General de Epidemiología - Instituto Nacional de Salud.