

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Frecuencia de infección por *Leptospira* sp. en ardillas  
nuca blanca (*Sciurus stramineus*) silvestres en el  
Patronato del Parque de las Leyendas "Felipe  
Benavides Barreda"**

**TESIS**

para optar por el título de Médico Veterinario

**AUTOR**

Daniel Montes Aliaga

**Lima-Perú**

**2009**

# ÍNDICE

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

**INTRODUCCIÓN**

**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**RESULTADOS**

**DISCUSIÓN**

**CONCLUSIONES**

**RECOMENDACIONES**

**BIBLIOGRAFÍA**

**APÉNDICE**

## RESUMEN

El objeto del presente estudio fue detectar la frecuencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* en la población de ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) silvestres capturadas en el zoológico Parque de Las Leyendas. Para tal fin se colectaron 35 muestras de suero de ardillas nuca blanca de ambos sexos, diferentes edades y zonas de captura en el zoológico, para la detección de anticuerpos contra *Leptospira sp.* mediante la prueba de microaglutinación (MAT). El 82.3% (29/35) de animales tuvieron anticuerpos contra *Leptospira sp.* del cual el 60% correspondió a los serovares *icterohemorrhagiae*, seguidos por *georgia* con 31,42%, *canícola* con 5.71%, y *australis* con 2.85%. No hubo diferencia estadística entre la presencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* y las variables sexo, edad y área de procedencia de las ardillas nuca blanca en el zoológico. Los resultados obtenidos indican que la infección leptospiral está presente en las ardillas nuca blanca pudiendo constituir un riesgo para los animales de la colección faunística y las personas que laboran en el zoológico.

Palabras clave: *Leptospira sp.*, ardillas nuca blanca, prueba de microaglutinación, frecuencia.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to detect frequency of antibodies against *Leptospira sp.* in the neck white squirrels population (*Sciurus stramineus*) wild caught in the Parque de las Leyendas Zoo. To this end were collected 35 samples of serum from neck white squirrels (*Sciurus stramineus*) of both sexes and various ages caught in the zoo, which were analyzed for antibodies against *Leptospira sp.* through micro agglutination test (MAT). The 82.3% (29/35) of animals had antibodies against *Leptospira sp.* of which 60% corresponded to serovars *icterohemorrhagiae*, followed by *georgia* with 31.42%, *canicola* 5.71%, and *australis* with 2.85%. There was no statistical difference between the presence of antibodies against *Leptospira sp* and the variables sex, age and area of origin of the neck white squirrel (*Sciurus stramineus*) in the zoo. The results indicate that leptospiral infection is present in the neck white squirrels (*Sciurus stramineus*) pose a risk to animals and the collection faunal people who work at the zoo.

Keys words: *Leptospira sp.*, Guayaquil squirrel, Micro Agglutination Test, frequency.

## I. INTRODUCCIÓN

Los roedores representan el más grande grupo de animales dentro de los mamíferos y están distribuidos a nivel mundial, excepto en las regiones áridas y árticas, pudiendo actuar como fuentes de infección de diferentes enfermedades, entre ellas la leptospirosis (Ramiro, 2001).

La ardilla nuca blanca o sabanera (*Sciurus stramineus*) es un roedor neotropical cuyas poblaciones son endémicas en la costa noroeste del Perú y suroeste de Ecuador (Tirira, 1999). La familia de las ardillas es cosmopolita, se distribuye en gran parte del planeta, excepto en la Antártida, la región Australiana y Malasia; en América se encuentra en casi todo el continente, menos en latitudes extremas (Tirira, 1999). Las ardillas nuca blanca no se encuentran en peligro de extinción, aunque comparten las mismas amenazas que otras poblaciones silvestres.

Existen algunas poblaciones pequeñas de ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) en zoológicos y parques de Lima, siendo la población del Zoológico Parque de Las Leyendas una de las más importantes por su densidad y permanente contacto con animales de la colección zoológica, principalmente aves y otros mamíferos. La población de ardillas nuca blanca consume el alimento de los animales en exhibición, causa daños al componente flora en la infraestructura del zoológico, tiene contacto con los residuos sólidos del zoológico y comparte el mismo hábitat con otros roedores, aves e insectos.

Los roedores, entre ellos la ardilla nuca blanca (*Sciurus stramineus*), son considerados entre los principales hospedadores reservorios de microorganismos

como la *Leptospira* causante de la leptospirosis, considerada como una importante zoonosis y enfermedad re emergente.

La leptospirosis es una enfermedad de presentación a nivel mundial, considerada como una enfermedad emergente y ocupacional, de alta prevalencia en países tropicales y en vías de desarrollo. La infección es causada por espiroquetas del género *Leptospira*, clasificadas a su vez en 13 especies, patógenas y saprófitas, estableciéndose más de 250 serovariedades a partir de 25 serogrupos (Garrity *et al*, 2004; Vadillo *et al*, 2002).

La infección con leptospirosis patógenas se ha reportado en muchas especies de mamíferos, siendo los roedores el principal grupo de riesgo (Sandow y Ramírez, 2005).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* en ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) capturadas en el zoológico Parque de Las Leyendas, en el marco de ejecución de su programa de control de roedores y vectores.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. LA ARDILLA NUCA BLANCA (*Sciurus stramineus*)

#### 2.1.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica para esta especie es la siguiente (Emmons, 1991; Eisenberg y Redford, 1989):

- ▷ Reino : Animalia
- ▷ Phylum : Cordados
- ▷ Subphylum : Vertebrados
- ▷ Clase : Mamíferos
- ▷ Orden : Rodentia
- ▷ Suborden : Sciuromorpha
- ▷ Familia : Sciuridae
- ▷ Subfamilia : Sciurinae
- ▷ Género : *Sciurus*
- ▷ Especie : *S. stramineus*

Las ardillas están clasificadas en tres principales categorías: arborícolas (géneros *Sciurus* y *Tamiasciurus*), terrestres (*Spermophilus* y *Ammospermophilus*) y las ardillas voladoras (*Glaucomys*) (Nowak, 1999; Emmons, 1991). En la parte tropical de América solamente se encuentran las ardillas terrestres (Tirira, 1999).

En el Perú se han identificado 6 especies del género *Sciurus*: *S. sanborni*, *S. igniventris*, *S. oyrrhinus*, *S. spadiceus*, *S. ignitus* y *S. stramineus*. *Sciurus stramineus* es también conocida como ardilla de Guayaquil, ardilla sabanera, ardilla parda, ardilla mora, ardilla negra y ardilla nuca blanca (Tirira, 1999; Emmons, 1991).

### **2.1.2 Biología de la especie**

El orden Rodentia agrupa 29 familias, 468 géneros y 2052 especies, tiene mucho más miembros que cualquier otro orden mamífero (Nowak, 1999).

Los hábitats ocupados por los roedores son numerosos y variados, incluyen ecosistemas terrestres, subterráneos, arborícolas y semiacuáticos. Los roedores son mamíferos pequeños, de cuerpo compacto, con patas cortas y diferentes adaptaciones que les permiten correr, saltar, nadar, trepar, y roer. La mayoría de los roedores son omnívoros (Sainsbury, 2003).

Los sciúridos representan el género taxonómico de las ardillas. La ardilla nuca blanca (*Sciurus stramineus*) se agrupa entre las ardillas neotropicales, que se caracterizan por ser arborícolas, excelentes trepadoras, rústicas, de grandes incisivos y principalmente omnívoras; alimentándose generalmente de frutos secos, semillas, insectos, flores, hongos, tallos y savia. Ha sido reportada en bosques secundarios y plantaciones de café, en bosques húmedos, secos y/o montanos. En la parte norte de su distribución geográfica ocupa tanto bosques secos como húmedos, desde terrenos elevados hasta el nivel del mar. Existen pocos estudios sobre la historia natural de las ardillas neotropicales, y en muchos casos la sistemática es incierta, probablemente porque muchas especies no se encuentran en peligro, a excepción de la ardilla de Sanborn (*Sciurus sanborni*)



cuyo estatus es desconocido debido a su pequeño rango geográfico (Emmons, 1991, Nowak, 1999).

Se ha reportado para la ardilla gris (*Sciurus carolinensis*) los siguientes características reproductivas: edad de la pubertad: 12 a 18 meses, duración de la preñez: 44 días; tipo de placentación: corioalantoidea, discoidal hemocorial, longevidad 20 años (Sainsbury, 2003). No se cuentan con datos biológicos específicos para la ardilla nuca blanca (*Sciurus stramineus*).

### **2.1.3 Distribución geográfica**

La mayoría de las especies de ardillas tiene una distribución amplia, lo que indica que pueden vivir en una gran variedad de habitats. Sólo están ausentes en Australia, Madagascar, las regiones polares, la parte sur de Sur América y algunas zonas áridas del viejo mundo (Valdés, 2003)

*S. stramineus* es encontrada desde el suroeste de Ecuador al noroeste del Perú, alrededor del golfo de Guayaquil y bordeando el margen occidental de la cordillera de los Andes en Cajamarca, pudiendo encontrarse hasta los 2000 metros sobre el nivel del mar. Es la única ardilla encontrada en este rango geográfico (Emmons, 1991). La literatura no menciona la existencia de poblaciones silvestres de *S. stramineus* en el departamento de Lima, pero se han observado ejemplares probablemente introducidos accidentalmente en el Patronato del Parque de Las Leyendas y otros zoológicos y parques.



**Foto 1.** Ardilla nuca blanca (*Sciurus stramineus*) en la zona de residuos sólidos del área de hospital y cuarentena del zoológico Parque de Las Leyendas.



**Foto 2.** Ardilla nuca blanca (*Sciurus stramineus*) alimentándose de la ración de un guacamayo rojo amarillo (*Ara macao*).



**Foto 3.** Ardilla nuca blanca (*Sciurus stramineus*) alimentándose de flores ornamentales del zoológico.



**Foto 4.** Ardilla nuca blanca (*Sciurus stramineus*) alimentándose en el ambiente de los gansos andinos o huallatas (*Chloephaga melanoptera*).



**Foto 5.** Ardilla nuca blanca (*Sciurus stramineus*) alimentándose en el ambiente de tapires amazónicos (*Tapirus terrestris*).

#### **2.1.4 Importancia**

La literatura no define una importancia específica para esta especie, pero evidencia la función diseminadora de semillas de las ardillas en general (Nowak, 1999).

Muchas ardillas son identificadas como especies invasoras en diversos países cuando han sido introducidas a una región diferente de su área de distribución natural, provocando graves daños ecológicos y socioeconómicos. Las ardillas son voraces depredadoras de semillas, raíces y de crías de mamíferos, aves y reptiles de menor tamaño; compiten con especies nativas similares llegando a desplazarlas y son vectores de enfermedades importantes. En México se ha reportado que la conducta natural de las ardillas tiene consecuencias nocivas directas en los ecosistemas, tanto en el componente flora como en fauna, desplazando a otras especies importantes para la industria maderera y la dispersión de semillas (Alvarez, 2007 com. per.).

#### **2.1.5 Estatus y conservación**

El DS N° O34-2004-AG publicado el 22 de septiembre del 2004 en el diario oficial El Peruano, que aprueba la categorización de especies amenazadas de fauna silvestre y determina la prohibición de caza, captura, tenencia, transporte o exportación con fines comerciales de animales silvestres en peligro crítico (CR), en peligro (EN), vulnerable (VU) y casi amenazado (NT); no clasifica a las ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) en peligro. Las ardillas clasificadas en situación vulnerable son la ardilla de Sanborn (*Sciurus sanborni*) y la ardilla rojiza (*Sciurus pyrrhinus*). Dicha norma se basa en el criterio y clasificación de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), considerado como el inventario más completo del estado de conservación de las especies de animales

y plantas a nivel mundial y que por su fuerte base científica es reconocida mundialmente.

La ardilla nuca blanca (*Sciurus stramineus*) se ha reportado como invasora en Perú, cuando es traslocada a una región diferente de su región de origen (Del Río *et al*, 2001).

El Consejo Nacional de Ambiente (CONAM), el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), el Ministerio de Agricultura, el Museo de Historia Natural-Universidad Nacional Mayor de San Marcos y la Asociación Peruana para la Conservación de la Naturaleza (APECO), suscribieron en el año 2001 un informe nacional sobre las especies exóticas invasoras en el Perú. El resumen ejecutivo plantea la problemática de especies exóticas o introducidas y los lineamientos para actividades de control y erradicación de sus poblaciones. En dicho documento especifica que el problema de las especies exóticas o introducidas es cuantitativa y cualitativamente distinto al de las especies invasoras, pues éstas constituyendo solo una fracción de las primeras, producen notables efectos - generalmente negativos - sobre la diversidad genética de las especies nativas y los procesos evolutivos que los acompañan.

La distribución natural de las ardillas nuca blanca no incluye la ciudad de Lima. La población de ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) del Patronato del Parque de Las Leyendas, en referencia al informe nacional es definida como “especie exótica de hábitat”, y no determina con exactitud si debe seguir las prioridades establecidas por el informe.

Se estima que los efectos negativos de las ardillas nuca blanca pronto serán evidentes en el país, pues depredan nidos de aves y compiten por los granos y frutos con nuestras especies nativas (CONAM *et al*, 2003).

Hasta la fecha el impacto de las especies exóticas invasoras o introducidas accidentalmente hacia ecosistemas naturales se ha dirigido hacia perturbaciones en la diversidad biológica (Valdés, 2003). En centros de tenencia legal de fauna silvestre el impacto es probablemente económico y social.

## **2.2. LEPTOSPIROSIS**

### **2.2.1 Generalidades**

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica de presentación a nivel mundial (WHO, 2003; Bolin, 2000). Es una enfermedad infecciosa causada por una bacteria patogénica llamada *Leptospira sp.* que puede ser transmitida directa o indirectamente desde animales a humanos (WHO, 2003; Céspedes, 2005). La bacteria está dividida en grupos llamados serovares basados en su relación antigénica. Siendo el serovar la unidad taxonómica básica para la clasificación de las Leptospiras (WHO, 2003). Los signos clínicos asociados con la leptospirosis dependen del hospedador y del serovar infectante de leptospira (Céspedes, 2005; Fowler, 2003)

La Leptospirosis fue descrita por primera vez en 1880 en El Cairo por Larrea, cuyos estudios fueron seguidos por Landouzy en 1883. En 1886, Weil la describió minuciosamente, observando cuatro casos clínicos en seres humanos. Posteriormente la Leptospirosis fue designada por Goldschmidt, como “Enfermedad de Weil” (MINSA, 1998).

En el Perú, la leptospirosis está ampliamente distribuida. El primer caso fue diagnosticado por Arce y Ribeyro en 1917. En los años siguientes se diagnosticaron más casos clínicos, se reportaron casos en vacunos y cerdos con los serotipos *pomona*, *icterohaemorrhagiae* y *canicola*. En 1955, el Instituto de

Salud Pública, en Lima, inició estudios epidemiológicos en ratas de desagüe, perros, gatos, y cerdos sacrificados en el camal del Callao, obteniéndose nuevos serogrupos y serovares (Céspedes *et al*, 2003; MINSA, 1998). Hasta la fecha continúan reportándose nuevos hospedadores, nuevos serovares y serogrupos, debido al incremento e innovación en técnicas diagnósticas.

La leptospirosis es considerada una zoonosis re emergente debido a un incremento en su reciente redescubrimiento y reconocimiento que la presenta como una enfermedad hemorrágica severa, de fácil confusión con una enfermedad hemorrágica viral; tienen un amplio rango de hospederos, y ha sido encontrada en casi todos los mamíferos y en una variedad de vertebrados de sangre fría (Bolin, 2000). Esta enfermedad febril aguda es potencialmente letal e involucra el sistema nervioso central, renal y hepático. Los animales silvestres a menudo, están involucrados en el mantenimiento y diseminación de la enfermedad en animales domésticos y humanos, incluyendo una variedad de mamíferos, como los roedores, primates, camélidos, anfibios y leones marinos (Cox *et al*, 2005).

La leptospirosis presenta una distribución cosmopolita (Céspedes *et al*, 2005). Las infecciones de leptospira en fauna silvestre son importantes porque pueden deteriorar la salud de los ecosistemas, la leptospirosis afecta virtualmente a todas las especies de mamíferos (Bolin, 2000). Ciertas especies animales son epidemiológicamente importantes en la transmisión de la leptospirosis porque pueden servir como una fuente de infección para otras especies silvestres, seres humanos y animales domésticos (Shotts, 1981).



## 2.2.2 Agente etiológico

El término leptospira proviene del griego lepto = fino, y espira = espiral (Céspedes, 2005). Hasta hace 25 años se conocían dos especies de Leptospira: *L. interrogans* y *L. biflexa*. La primera agrupaba especies patógenas y la segunda a especies no patógenas de vida libre ó saprofitas. Desde el 2004 se conocen un total de 13 especies dentro del género Leptospira. La clasificación taxonómica de la leptospira hasta la fecha es la siguiente (Garrity *et al*, 2004):

- ▷ Reino : Animalia
- ▷ Phylum : Spirochaetes
- ▷ Clase : Spirochaetes
- ▷ Orden : Spirochaetales
- ▷ Familia : Leptospiraceae
- ▷ Género : Leptospira
- ▷ Especies : *L. interrogans*, *L. alexanderi*, *L. biflexa*, *L. borgpetersenii*, *L. faineri*, *L. inadai*, *L. kirschneri*, *L. meyeri*, *L. noguchii*, *L. parva*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. wolbachii*.

### 2.2.2.1 Características físicas

Las leptospiras son gérmenes gram negativos, aerobios obligados y móviles, muy enrollados, delgados, flexibles de 5 a 15 um de longitud por 100um de diámetro, de apariencia helicoidal, constituidas por espirales finas con extremos en ganchos, con movimientos de rotación, estiramiento y flexión (Céspedes, 2005; MINSA, 1998). Las leptospiras están compuestas por un cuerpo citoplasmático y un axostilo. El axostilo es la organela encargada de la motilidad de la leptospira, consiste en dos filamentos axiales insertados en un disco o protuberancia al final del cuerpo citoplasmático y

cuyo extremo libre está unido a la región de la bacteria. (Céspedes, 2005; Vadillo *et al*, 2002).

Al microscopio de campo oscuro puede observarse que una de las extremidades termina en gancho, y puede parecer solo como una cadena de cocos diminutos. Las leptospiras no se tiñen con facilidad pero pueden impregnarse con plata, son muy sensibles a la desecación, al calor y frío excesivo así como a las variaciones del pH, no tolerando el medio ácido. Un pH óptimo para su multiplicación es 7,2 a 7,4. No sobreviven en el agua salada, a diferencia de los largos períodos que pueden permanecer en agua dulce, principalmente si se encuentra almacenada (hasta 180 días). En la leche las leptospiras no sobreviven salvo que se encuentre diluida en agua a razón de 1:20 o más. (Céspedes, 2005; Vadillo *et al*, 2002; Sandow y Ramírez, 2005).

Las leptospiras pueden sobrevivir en el frío hasta 100 días a - 20°C. La pasteurización no destruye a las leptospiras, es necesaria la ebullición para su destrucción. A los 10 segundos muere con 100°C y sólo a los 10 minutos si la temperatura es de 56°C. La orina ácida es letal para las leptospiras y por eso es necesario alcalinizarla si se pretende aislarla de la orina de un animal enfermo. Pierde su motilidad rápidamente en medios ácidos aproximadamente en 15 minutos. Sobreviven en el suelo húmedo por largo tiempo mientras que en suelo seco su supervivencia es corta (Sandow y Ramírez, 2005).

#### **2.2.2.2 Estructura antigénica**

Todas las leptospiras poseen un antígeno somático "O" (Ag O) común, de naturaleza poliosídica, responsable de la inmunidad protectora, y de diferente composición respecto a los otros antígenos de superficie (Ag S), lo que implica la existencia de un elevado número de cepas serológicamente heterogéneas. Por lo tanto poseen antígenos de especie, de serogrupo y de serovariedad (Vadillo *et al*, 2002).

Las leptospiras patógenas se dividen según sus diferencias antigénicas en serogrupos y serovares, siendo el serovar el taxón básico (Céspedes, 2005). En todo el mundo se han descrito alrededor de 220 serovares aproximadamente, pero frecuentemente las infecciones se producen por un número limitado de serovares endémicos a cada región o país, y su presencia está íntimamente ligada a factores ecológicos y medioambientales (Mendoza, 2004). Se han dividido muchos serovares por la prueba de aglutinación cruzada. Actualmente la clasificación del género *Leptospira* está basada en la homología del ADN, el avance de la biología molecular ha permitido también secuenciar su genoma (Céspedes, 2005).

### **2.2.3 Hospedadores**

Las leptospiras tienen un amplio rango de hospederos, han sido encontradas en casi todos los mamíferos y en algunos vertebrados de sangre fría; virtualmente todos los mamíferos pueden llegar a ser infectados con leptospiras patogénicas. Los hospedadores se clasifican principalmente en reservorios o de mantenimiento, y hospedadores accidentales (Bolin, 2003).

Los hospedadores de mantenimiento son aquellos que aseguran la perpetuación de una población determinada de agentes infecciosos en un ecosistema, sin la intervención de ningún hospedador accidental. Los

hospedadores de mantenimiento representan la población de una o varias especies animales que actúan como reservorio continuo de un serovar, en un ecosistema determinado (Sandow y Ramírez, 2005). Los animales silvestres son probablemente los reservorios de la mayor parte de los serovares de leptospiras patógenas (Bolin, 2000; Laguna, 2000).

Los principales hospedadores reservorios naturales de leptospira patógenas son los roedores. Las familias Sciuridae, Cricetidae y Muridae, constituyen dentro del orden rodentia, reservorios de gran importancia para los serovares de *Leptospira interrogans* (Karaceva, 1971). Los roedores han sido reconocidos como los más importantes hospedadores y de amplia difusión, entre ellos la rata noruega o almizclera (*Rattus norvegicus*), las ratas (*Rattus rattus*) y el ratón doméstico (*Mus musculus*) (WHO, 2003; Macedo *et al*, 1993; Sandow y Ramírez, 2005).

Los animales de granja, domésticos, y los animales silvestres, como los carnívoros, marsupiales e insectívoros, son también considerados portadores de leptospiras, eliminando durante semanas meses o años después de la infección un gran número de leptospiras con la orina (WHO, 2003; MINSA, 1998).

Se define como hospedadores accidentales a los animales infectados accidental o incidentalmente con un serovar para el cual el animal no es un hospedador natural (WHO, 2003). Los hospedadores accidentales desarrollan la enfermedad mientras que los hospederos reservorios o de mantenimiento presentan una infección de tipo sub clínica y crónica (Bolin, 2003).

Los hospedadores accidentales son potencialmente cualquier mamífero, incluyendo el ser humano. Al igual que los reservorios, incluyen a los animales domésticos y de granja, así como algunas especies silvestres (Sandow y Ramírez, 2005; Bolin, 2003).

En España y Francia, se consideraron a algunas aves que consumen ratones, como vectores por la eliminación de las leptospiras en sus fluidos (Sandow y Ramírez, 2005).

#### **2.2.4. Relación serovar – hospedero**

Las diferentes cepas patógenas de *Leptospira* pueden afectar, potencialmente, a un gran número de especies animales que actúan como hospedadores accidentales o de mantenimiento en función de cada serovar (Alonso *et al*, 2001; Bolin, 2003). De esta forma, una especie puede ser reservorio de varios serovares y varias especies pueden ser reservorios de un serovar común (Alonso *et al*, 2001; Sandow y Ramírez, 2005).

Una relación entre el hospedador de mantenimiento y serovar se caracteriza por una transmisión eficiente entre animales, una relativa alta prevalencia de la infección (30 a 50%) dentro de la población, producción de una enfermedad crónica más que aguda e infección persistente en los riñones, baja producción de anticuerpos contra el serovar, presencia en jóvenes y animales gestantes, eliminación prolongada de leptospira por vía urinaria, y difícil diagnóstico (Alonso *et al*, 2001; Bolin, 2000; Sandow y Ramírez, 2005).

La relación entre el serovar infectante y el hospedador accidental presenta características opuestas: relativa baja prevalencia, alta patogenicidad para el hospedador afectado, presentación de enfermedad aguda, signos clínicos característicos, marcada respuesta de anticuerpos, un período corto de excreción de leptospira por vía renal y su diagnóstico resulta por lo general bastante fácil (Bolin, 2000; Sandow y Ramírez, 2005).

El ser humano es susceptible a la infección, desarrolla los signos clínicos característicos de la enfermedad. La infección con leptospiras está influenciada

por el tipo de ocupación o actividad laboral de los humanos infectados (MINSA, 1998; Bolin, 2000).

### **2.2.5 Transmisión**

Las vías de transmisión pueden ser directas o indirectas, horizontales o verticales. En los hospedadores de mantenimiento la transmisión horizontal directa es la más frecuente (Sandow y Ramírez, 2005; Alonso *et al*, 2001).

El contacto directo o indirecto con agua, saliva, orina, placenta y fluidos, o leche, contaminada con leptospiras son las formas más comunes de transmisión accidental de leptospirosis (Sandow y Ramírez, 2005; Bolin, 2003). Las condiciones ambientales son críticas para la transmisión indirecta (Sandow y Ramírez, 2005; Bolin, 2000). La vía horizontal directa es la más estudiada pues presenta diferentes formas y se considera fundamental en áreas con condiciones climáticas favorables o de densidad poblacional desfavorable para la transmisión de la enfermedad (Sandow y Ramírez, 2005).

La transmisión horizontal indirecta entre hospedadores de mantenimiento y accidentales, o entre hospedadores accidentales depende de la supervivencia de las leptospiras en el medio, es la más importante en las infecciones accidentales (Sandow y Ramírez, 2005; Alonso *et al*, 2001).

La ruta y modo de ingreso de las leptospiras en infecciones naturales no es clara. Se presume que las leptospiras pueden ingresar por las mucosas oral, conjuntiva o del tracto genital, o través de pequeñas abrasiones en la piel (WHO, 2003). La presencia de leptospiras en tejidos y fluidos animales está influenciada por el pH, contaminación con otras bacterias y manejo de los mismos. La vía de transmisión mediante abrasiones cutáneas al manipular los tejidos y fluidos provenientes de animales infectados, es importante para personal que trabaja en

mataderos y en sanidad animal (Sandow y Ramírez, 2005). Se cree improbable el ingreso de las leptospiras por la piel intacta. La infección fetal ocurre por una invasión directa del microorganismo a la placenta en cualquier etapa de la preñez en los mamíferos. Por sus características físicas, las leptospiras pueden penetrar tejidos por su paso a través o entre las células. Las cepas patogénicas de leptospira penetran más rápidamente y crecen más rápido que las cepas no patogénicas (Sandow y Ramírez, 2005).

Los núcleos goticulares formados por la dispersión de la orina de animales infectados, es la vía de transmisión directa más importante. Los hospedadores de mantenimiento de un determinado serovar eliminan gran cantidad de *Leptospira* en la orina por un periodo prolongado de tiempo. Las gotículas de orina tendrán una alta concentración de leptospiras (Sandow y Ramírez, 2005; WHO, 2003). Algunos autores plantean que la orina de los hombres, ratas y ratones no son una buena fuente de supervivencia para las leptospiras, a menos que estén diluidas en agua, lo que aumenta su capacidad infectante, sobretodo en el agua de consumo y el barro (Sandow y Ramírez, 2005). Este hecho, unido a la alta receptividad de los hospedadores de mantenimiento a la infección con leptospiras, supone a este tipo de transmisión como la principal (Alonso *et al*, 2001).

La transmisión sexual no ha sido reportada en animales domésticos, pero se presume podría ser una vía opcional para otras especies (Alonso *et al*, 2001). Se ha reportado la transmisión por inmersión prolongada en aguas contaminadas. La presencia de sustancias antimicrobianas no permite la supervivencia en la leche, a pesar de esto se ha reportado infecciones de leptospira por consumo de leche contaminada en humanos (Sandow y Ramírez, 2005).

#### **2.2.6. Factores asociados a la infección**

La literatura menciona una serie de factores que contribuyen a la presentación de las infecciones. Estos factores son clasificados de acuerdo al hospedador, el agente etiológico y el medio ambiente.

Los factores asociados al hospedero de mayor importancia son: la edad, el estado inmunitario y la etapa de gestación (Alonso *et al*, 2001). Estos factores han sido más estudiados en animales domésticos.

Los factores asociados al agente etiológico están referidos a la resistencia de las leptospiras a las condiciones ambientales, el elevado grado de variación antigénica y la amplia variedad de vertebrados susceptibles que pueden servir como hospedadores del microorganismo (MINSAs, 1998). Las condiciones ambientales aparentemente propician una cierta estacionalidad observada en la presentación de casos agudos en determinadas épocas de año (Sandow y Ramírez, 2005).

El medio ambiente influye en la presentación de la enfermedad mediante las actividades de manejo, alimentación, sanidad y sistema de producción. Estas variables han sido ampliamente estudiadas en los animales de producción (Sandow y Ramírez, 2005; Alonso *et al*, 2001).

### **2.2.7 Epidemiología**

La leptospirosis es considerada una enfermedad zoonótica, y de distribución mundial, a excepción de las regiones polares (Céspedes y Glenny, 2002). Es clasificada como una enfermedad re emergente por el reconocimiento de nuevas cepas patógenas y la aparición de nuevos casos asociados a la enfermedad (Bolin, 2000; Céspedes, 2005).

La leptospirosis tiene comportamiento endémico en una zona o región, la infección se mantiene tiempo después de ocurrido el primer brote, por ello la



enfermedad no puede considerarse como un problema individual, sino un problema de un grupo de animales en un área determinada. (Alfaro, 2004). Es una enfermedad de alta morbilidad y baja mortalidad (Bolin, 2002; Céspedes, 2005).

La mayor prevalencia de la enfermedad se encuentra en los países sub tropicales, y tropicales húmedos, que presentan condiciones favorables para su presentación, como precipitaciones fluviales frecuentes, temperatura, humedad relativa, pH, estructura y composición de los suelos, presencia de fauna silvestre y prácticas agrícolas (Bolin, 2000; Sandow y Ramírez, 2005).

La leptospirosis es una enfermedad económicamente importante en animales de producción (equina, bovina, caprina, porcina, ovina) por los abortos, mortinatos, nacimientos de crías débiles, muertes, pérdida de producción y costos en el tratamiento, vacunación y cuidados veterinarios (Bolin, 2000; MINSA, 1998). Algunos serovares de leptospira son prevalentes para determinadas regiones y están asociados a uno o más hospedadores de mantenimiento, los cuales sirven como reservorios de la infección y a menudo suelen ser animales silvestres o de producción (Bolin, 2000).

La leptospirosis es considerada como una enfermedad ocupacional, atribuyéndole un carácter de enfermedad profesional relacionada a los agricultores de arroz, cortadores de caña de azúcar, médicos veterinarios y técnicos agropecuarios, trabajadores de limpieza y mantenimiento de alcantarillas, mineros, trabajadores de camales, recolectores de basura, gasfiteros, limpiadores de acequias, etc. por el riesgo del contacto directo o indirecto con orina de animales infectados. Sin embargo, el fenómeno de globalización, los cambios climáticos, y las migraciones de animales y personas hacia nuevas zonas, han propiciado que la leptospirosis sea considerada en la actualidad como un problema latente para cualquier población (MINSA, 1998; Céspedes, 2005). No

existen reportes de la presentación de esta enfermedad en cuidadores de zoológicos o manejadores de fauna silvestre *ex situ* o *in situ*.

Se han encontrado en algunas poblaciones de zoológicos y fauna silvestre, infecciones en hospedadores de mantenimiento. Por ejemplo, en USA, mapaches, zarigüeyas y zorrillos son hospedadores de mantenimiento para leptospira, y la infección en estas especies alcanza una prevalencia de 30% a más. El impacto de la leptospirosis en los hospedadores de mantenimiento silvestres no es claro, sin embargo, como hospedadores de mantenimiento, muchas de las infecciones son subclínicas (Bolin, 2003). El principal impacto de la leptospirosis sobre la salud pública es el alto costo del tratamiento en humanos (MINSA, 1998). El Apéndice 6 detalla una relación de hospedadores silvestres encontrados en la literatura.

Se desconoce la real incidencia de la leptospirosis, debido a la falta de conocimiento de la enfermedad, a la gran proporción de infección subclínica que puede pasar desapercibida, y la poca disposición de los métodos diagnósticos en las áreas endémicas. En departamentos de la selva del Perú (Loreto y Madre de Dios), se halló una proporción muy alta (20 - 30%) con evidencia serológica de leptospirosis aguda en pacientes con síndrome febril indiferenciado (Céspedes *et al*, 2005).

En los últimos diez años la leptospirosis se ha presentado como una enfermedad infecciosa importante en el Perú. Puede ser encontrada en las principales ciudades de la costa, sierra y selva, así como en las áreas rurales del país. Se han presentado casos con hemorragia pulmonar, que a menudo son mortales. Se confirmaron casos en 18 de 24 regiones, con predominancia en las regiones de Loreto, Lima y Madre de Dios; los serogrupos más frecuentes son *varillal* e *icterohaemorrhagiae*, los cuales están asociados con casos fatales (Céspedes *et al*, 2005). En el Perú no es una enfermedad de notificación

obligatoria y sus niveles de prevalencia son frecuentemente subvaluados, debido a que los pacientes pueden ser diagnosticados clínicamente de otras enfermedades (Laguna, 2000). La leptospirosis está anexada en la lista B de la OIE (OIE, 2004).

### **2.2.8 Patogenia**

Es incierta la forma en cómo las leptospiras causan lesiones y enfermedad. Mucha de la evidencia y factores de virulencia sugeridos se basan en conjeturas y en estudios no definidos. Se presume incluso que la patogenia sea similar para todos los serovares de *Leptospira* (Bolin, 2003; Bolin, 2000). Se han propuestos varios mecanismos patogénicos para el desarrollo de la leptospirosis, incluyendo motilidad y adhesión bacterial, uso de toxinas bacterianas, persistencia de la infección, daño tisular inmuno - mediado, o lesiones secundarias a la lesión capilar seguida de anoxia tisular. Probablemente intervengan varios mecanismos fisiopatológicos que actúan complementariamente (Laguna, 2000; Bolin, 2000).

La motilidad progresiva y adhesión de las leptospiras, así como su estructura de “tirabuzón” o “gancho” no han sido demostradas experimentalmente, pero probablemente dichas características les permite la entrada y diseminación en los tejidos de los hospedadores, aun en medios extremadamente viscosos (Bolin, 2000).

Las *Leptospiras* invaden el organismo después de penetrar por las mucosas expuestas, heridas o abrasiones de la piel. Después de un variable periodo de incubación (4 a 20 días), las *Leptospiras* circulan en la sangre alrededor de 7 días, empleando vasos sanguíneos y linfáticos (Laguna, 2000; MINSA, 1998). Entran en contacto con factores no específicos del hospedador, algunos producen el crecimiento de las leptospiras y otros activan los mecanismos de defensa. Los organismos sobreviven por evasión de la

fagocitosis, crecen exponencialmente en el flujo sanguíneo y los tejidos, Durante este periodo de bacteremia, las leptospiras ingresan y se replican en muchos tejidos, incluyendo, el hígado, riñón, pulmones, tracto genital y sistema nervioso central, produciéndose los signos clínicos de una leptospirosis aguda, que puede variar según el serovar infectante y su hospedero (Bolin, 2003; Bolin, 2000; Sandow y Ramírez, 2005).

Las leptospiras pueden adherirse de alguna forma a la superficie luminal de las células del epitelio renal, causando poco o algún daño a las células epiteliales. Probablemente debido a la fusión de las superficies de las membranas a través de sus lípidos. Las leptospiras se adhieren a fibroblastos, células renales y células endoteliales en cultivos. Las cepas virulentas se adhieren más rápido que las cepas menos virulentas (Bolin, 2000).

Durante el periodo de bacteremia y colonización tisular se producen los signos clínicos de la leptospirosis aguda. Los anticuerpos aglutinantes pueden ser detectados en el suero, tan pronto como se produce la leptospiremia. La presencia de anticuerpos coincide con la eliminación de las leptospiras de la sangre y muchos órganos. Como los microorganismos son eliminados de la sangre, hígado, riñón (exclusivamente en los túbulos), los signos clínicos de una leptospirosis aguda empiezan a manifestarse, aunque los animales pueden morir por el daño en los órganos (Bolin, 2003).

Las leptospiras permanecen en los túbulos renales de hospedadores accidentales y se diseminan en la orina por unos pocos días a varias semanas. En cambio, en los hospedadores de mantenimiento, la infección renal persiste y la diseminación en la orina es durante un largo tiempo. Si el animal está preñado, puede producirse la infección fetal, con subsecuente aborto, nacimiento de crías

débiles, crías prematuras o bien nacer una cría sana pero infectada (Sandow y Ramírez, 2005).

La primera lesión causada por las leptospiras es la rotura de las membranas de las células endoteliales, lo que provoca la rotura de capilares sanguíneos y focos de hemorragia. Probablemente por la acción de una toxina glicolipoproteica (GLP) presente en las leptospiras, cuya actividad se lleva a cabo mediante su larga cadena de ácidos grasos. La GLP es diferente a los lipopolisacáridos (LPS) en cuanto a su estructura y propiedades. LPS desempeña un importante papel en la inmunidad, pero no es tóxico. Las serovariedades de los serogrupos *autumnalis*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae* y *pomona* elaboran una hemolisina que probablemente sea la responsable de la aparición de hemoglobinuria en animales infectados con estas serovariedades (Vadillo *et al*, 2002).

La patogenicidad de leptospiras entre serovares y dentro de las mismas cepas, puede ser modificada por el medio ambiente o por una permanencia prolongada en el hospedador. Una gran proporción de infecciones permanece en forma subclínica, entre ellas infecciones con serovares *hardjo*, *sejroe*, *hebdomadis*, *pomona*, *icterohaemorrhagiae*, y *canícola*, en bovinos; siguiendo el patrón básico de la enfermedad, aunque algunos investigadores reportan diferencias clínicas entre serovares (Alfaro *et al*, 2004).

Tras la infección y posterior desarrollo de anticuerpos, la patogénesis de la leptospirosis empieza a diverger según el tipo de hospedador. En los hospedadores accidentales, la leptospira permanece a menudo en los túbulos renales sólo por un corto tiempo, durante el cual son eliminados por la orina durante algunos días hasta varias semanas. En los hospederos de mantenimiento, las leptospiras permanecen en los túbulos renales, en el tracto urogenital y menos frecuentemente en el sistema nervioso central y los ojos,

desde meses hasta años después de la infección. Las leptospiras son eliminadas por la orina y secreciones genitales de estos animales persistentemente infectados. Esta característica de la enfermedad en hospederos de mantenimiento es crítica y los califica como reservorios de leptospirosis dentro de un ecosistema (Bolin, 2000).

En los hospedadores de mantenimiento, las leptospiras se acantonan en lugares de difícil acceso para los anticuerpos: los riñones, el cerebro, la cámara anterior del ojo y el tracto genital (Bolin, 2000). Las leptospiras pueden multiplicarse en la luz de los túbulos contorneados renales, en la proximidad de las vellosidades, manteniendo por un determinado tiempo la eliminación de leptospiras en el hospedador, regulada por la respuesta inmune (Sandow y Ramírez, 2005; Bolin, 2000). Los roedores eliminan leptospiras durante toda la vida (Sandow y Ramírez, 2005).

La lesión central de la leptosirosis es el daño endotelial a los vasos sanguíneos pequeños como resultado del ingreso de las leptospiras. Ciertos tejidos son más susceptibles a los efectos de esta lesión, entre ellos el hígado, riñón, pulmón y la placenta. Las lesiones vasculares causan hemorragias, produciendo en los tejidos dañados cuadros de hipoxia. La presencia de un gran número de leptospiras puede causar mayor daño tisular (Bolin, 2000).

Las leptospiras producen fosfolipasa, que daña a los eritrocitos y a otras membranas celulares que contienen sustrato fosfolipídico específico. La presencia de algunos genes tales como la "hemolisina" en varias leptospiras sugiere una función para estas moléculas en el desarrollo, crecimiento o patogenicidad de las leptospiras. La composición fosfolipídica de los eritrocitos entre las especies hospedadoras es diferente, y la especificidad de los sustratos de las fosfolipasas leptospirales puede ayudar a explicar la presencia o ausencia de la hemólisis en

diferentes combinaciones de hospedador - serovar. La fosfolipasa esfingomielinasa ha sido estudiada extensamente, pero aun se desconoce si tiene una función significativa en la patogénesis (Bolin, 2000).

El lipopolisacárido asociado a leptospira (LPSL) tiene muchas características en común con los lipopolisacáridos de otras bacterias gram negativas. La presencia de LPSL en tejidos puede inducir un daño tisular inmune mediado, y es importante en el desarrollo del daño endotelial y agregación plaquetaria que permite la trombocitopenia en la leptospirosis aguda (Bolin, 2000; Laguna, 2000).

La persistencia de las leptospiras dentro del tracto genital femenino y masculino puede promover la infertilidad y las infecciones venéreas. Se desconoce la ubicación precisa de las leptospiras en estos tejidos, aunque han sido aislados de diferentes lugares del tracto genital así como de glándulas anexas, de machos y hembras persistentemente infectadas. Los fetos de los mamíferos parecen actuar de la misma forma que en los adultos, si ellos sobreviven a la infección aguda, las crías pueden nacer persistentemente infectadas (Bolin, 2000).

Cuando los animales son infectados con un gran número de leptospiras pueden morir dentro de 48 horas, sin bacteremia y con manifestaciones clásicas de una leptospirosis aguda. Los animales muestran signos de toxicidad, incluyendo fiebre, depresión, hemorragias petequiales difusas, y nefropatía tóxica, con muy pocos organismos observados en los tejidos. Estas observaciones son compatibles a los efectos de una toxina (Bolin, 2000).

Se han descritos cuadros de leptospirosis específicos para algunas especies; por ejemplo, la anemia hemolítica fatal asociada a leptospirosis en rinocerontes negros (*Diceros bicornis*) (Bolin, 2003). La persistencia de las leptospiras en el ojo, pueden permitir la inflamación crónica y cuadros periódicos

de uveítis, particularmente en caballos. Esta es una condición debilitante en los equinos conocida como oftalmia periódica o luna ciega, la cual es una causa de ceguera en caballos (Bolin, 2000).

### **2.2.9 Inmunidad**

Existe poca información sobre las características inmunológicas de la leptospirosis en mamíferos silvestres (Shotts, 1981). En cualquiera de los casos, la inmunidad es específica a un serovar y aparece después de la infección o inmunización (Alonso *et al*, 2001; Céspedes, 2005).

Las leptospiras no causan una respuesta inflamatoria aguda. Se ha observado en infecciones naturales o experimentales poca evidencia de infiltrado inflamatorio o celular en los tejidos. Las respuestas inflamatorias están más asociadas al daño tisular que al agente (Bolin, 2000; Bolin, 2003).

La distribución de las leptospiras desde el flujo sanguíneo ocurre rápidamente seguido del desarrollo de anticuerpos específicos contra el lipopolisacárido leptospiral (LPSL). Los anticuerpos son aglutinantes, opsonizantes o asociados a serovares; pueden producirse reacciones cruzadas con serovares cercanamente relacionados, pero casi exclusivamente entre serogrupos. Las leptospiras opsonizadas son eliminadas por las células del sistema reticuloendotelial. Las leptospiras ingeridas pueden ser observadas en las vacuolas fagocíticas de las células de Küpfer en el hígado, los macrófagos en el bazo, y otros órganos. Los mecanismos de eliminación y digestión de las leptospiras dentro de los fagocitos son similares a otras bacterias (Bolin, 2000).

Los anticuerpos aglutinantes pueden ser detectados en suero durante la leptospirosis (Bolin, 2003). La presencia de anticuerpos coincide con la distribución de leptospiras desde la sangre, hígado y desde los túbulos renales,



causando al mismo tiempo los signos clínicos de una leptospirosis aguda (Bolin, 2003; Bolin, 2000). La eliminación de las leptospiras de la sangre y los órganos causan una desaparición de los signos clínicos en la leptospirosis aguda, aunque algunos animales puedan morir por el daño severo en algunos órganos (Bolin, 2003).

Muchas de las lesiones observadas en leptospirosis crónicas o persistentes parecen ser inmunomediadas. En el riñón, el infiltrado celular es asociado con antígenos leptospirales los cuales permanecen en los tejidos. Los infiltrados inflamatorios son predominantemente linfocíticos, con pocos macrófagos. Las lesiones crónicas contienen un gran número de células plasmáticas maduras y pueden organizarse en centros germinales. Se ha demostrado recientemente que el infiltrado inflamatorio está asociado con la localización de ciertos antígenos leptospirales en el intersticio renal (Bolin, 2000).

La autoinmunidad juega un papel importante en las lesiones renales encontradas en perros infectados con el serovar *canicola* y en las lesiones oculares las cuales pueden presentarse en caballos subsecuentemente a cuadros de leptospirosis. Existe evidencia para una reacción cruzada inmunológica entre un epitopo proteico de una córnea equina y un antígeno leptospiral los cuales pueden llevar a una autoinmunidad (Bolin, 2000).

Los anticuerpos IgM son producidos a partir del 5° día de la infección (Laguna, 2000; Sandow y Ramírez, 2005). Los anticuerpos IgM dificultan la multiplicación de las leptospiras pero no las destruyen, alcanzan sus picos máximos a las 3 ó 4 semanas. Los IgG específicos producen la lisis de las leptospiras, alcanzan sus máximos picos entre la 4 y 12 semana después de la infección y persisten por años en el animal (Sandow y Ramírez, 2005).

La proliferación de las leptospiras cesa con la aparición de anticuerpos específicos, los cuales permiten una rápida opsonización de las leptospiras y

distribución, o la muerte del hospedador. Los animales pueden morir también por los efectos de las lesiones causadas después de que las leptospiras han sido eliminadas del organismo (Bolin, 2000).

### **2.2.10. Signos clínicos**

La leptospirosis presenta diferentes cuadros clínicos, conforme al tropismo del agente, intensidad de la infección y posiblemente las condiciones inmunitarias del hospedero (Laguna, 2000). La mayoría de infecciones por *Leptospira spp.* cursan de manera sub clínica, aunque en algunas ocasiones puede darse el caso de enfermedad grave. La sintomatología es inespecífica y común a un gran número de afecciones, observándose ictericia, hemoglobinuria, hematuria, evidencias de daño renal, meningitis e incluso mortalidad; en todos los órganos, las características de las lesiones van a depender del serovar implicado (Alonso *et al*, 2001).

En los casos clínicos agudos de leptospirosis, los signos incluyen fiebre, anorexia, depresión, vómitos, diarrea, ictericia, falla renal, abortos, hemoglobinuria y muerte. La tasa de mortalidad por leptospirosis varía dependiendo de la dosis recibida del microorganismo y la susceptibilidad de las especies, pero generalmente más animales son infectados que los que desarrollan una enfermedad reconocible. Las infecciones subclínicas son comunes con algunas combinaciones hospedador/serovar (Bolin, 2003).

El cuadro clínico de esta enfermedad se caracteriza fundamentalmente por mialgias, cefaleas, escalofríos, pudiendo aparecer además ictericia, manifestaciones hemorrágicas, daño hepático y renal. El periodo de incubación oscila entre 2 y 26 días con una media de 10 días. El diagnóstico se basa en los antecedentes epidemiológicos (exposición a contaminantes), cuadro clínico, y los

resultados positivos de las pruebas serológicas (tomar en forma pareada con un intervalo de 15 días) (Hernández, 2003).

La leptospirosis es una típica enfermedad bifásica, presentándose una fase inicial o de leptospiremia con una duración de cuatro a siete días, caracterizada por la presencia de las Leptospiras en sangre y una segunda fase inmune o leptospiruria con una duración de 8 a 30 días donde se puede detectar anticuerpos específicos en circulación. Ambas fases son comunes a las dos formas clínicas de presentación: anictérica e ictérica (Céspedes, 2005).

El comportamiento bifásico de la leptospirosis se desarrolla en los dos tipos de presentaciones: la forma anictérica y la forma ictérica (Laguna, 2000).

La forma anictérica es la presentación más leve de la enfermedad. Se presenta de forma brusca y suele durar sólo una semana. Hay presentación de fiebre, cefalea, escalofríos, postración, mialgias, (en las pantorrillas y región lumbar), náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, artralgia, meningitis séptica, dolor ocular, procesos respiratorios, hepatomegalia y esplenomegalia (Sandow y Ramírez, 2005). Esta forma de presentación ha sido reconocida en el 90% de los casos de leptospirosis humana (Laguna, 2000)

La forma ictérica es la forma más severa de la enfermedad y está relacionada al serogrupo infectante. Se manifiesta con irritación conjuntival, irritación meníngea y rigidez en la nuca, insuficiencia renal, ictericia, manifestación hemorrágico intestinal o pulmonar, arritmia e insuficiencia cardíaca o disnea, algunas veces hemorragia generalizada (Sandow y Ramírez, 2005).

## **2.3 LEPTOSPIROSIS Y FAUNA SILVESTRE**

Muchas especies silvestres como ratones, ratas, castores, maras, (Derrell, 1986), primates no humanos, venados, ciervos, ardillas, zorros, mapaches, marsupiales, leones de mar y crotálidos, pueden ser hospederos reservorios o de mantenimiento de la bacteria (Laguna, 2000; Céspedes, 2005). Se han realizado trabajos de investigación en las especies silvestres mencionadas encontrando una variedad de serotipos de leptospira, aunque no ha sido reconocida una enfermedad clínica en hospederos reservorios. La infección en los roedores silvestres es subclínica o inaparente (Derrell, 1986; Bolin, 2003).

Virtualmente todos los mamíferos pueden llegar a infectarse con las formas patogénicas de *Leptospira*. En algunas regiones, existe determinada prevalencia de algunos serovares, los cuales están asociados con uno o más hospedadores reservorios (Bolin, 2003).

Existen diversos estudios sobre leptospirosis en animales silvestres realizados en el Perú. Entre mayo del 1955 y diciembre de 1957, Herrera, Liceras de Hidalgo y Meneses, realizaron estudios en ratas de desagües de Lima; además se empezaron a estudiar animales de la sierra y selva peruana encontrándose índices de infección de hasta 100% y muchos serovares nuevos. En 1973 y 1977 se estudió la infección en ofidios provenientes de Amazonas y Loreto, encontrándose dos crotálidos con anticuerpos para serogrupos *andamana*, *panama*, *pomona*, *australis* y *semaranga* (Laguna, 2000). Entre los roedores, los géneros *Rattus*, *Mus*, *Oryzomys*, *Peromyscus* y *Oligorizomys* han sido identificados como reservorios en distintos países de sudamérica (Shotts, 1981; Bunnell *et al*, 2000).

En la Amazonía peruana se ha identificado como reservorios a los marsupiales *Philander opossum* y *Didelphys marsupiales* (Bunell *et al*, 2000), se reporta también conversión serológica en ardillas (*Sciurus sp.*), conejos (*Silvilagus*

sp.), iguanas (*Tupinambis nigropunctatus*) (Liceras de Hidalgo, 1981), monos fraile (*Saimiri sciureus*) (Delgado, 1967) y crotálidos provenientes de la amazonía (Laguna, 2000).

En 1981 se aislaron leptospiras del serogrupo *ballum* en ratones albinos de laboratorio con índices de infección de 78%, demostrando que la manipulación de estos animales puede ser un factor de riesgo (Laguna, 2000).

En 1993, Macedo *et al*, realizaron un estudio bacteriológico y serológico en 22 roedores de la especie *Mus musculus*, capturados vivos en viviendas de Lima y Callao. Se determinaron anticuerpos mediante MAT frente a 17 serovares de leptospira, obteniéndose 10 (45%) de sueros positivos.

En el año 2000, Muñoz *et al* determinaron la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* en ronsocos (*Hydrochoerus hydrochaeris*) pertenecientes a un zocriadero de Iquitos. En el mismo año, Bunnell *et al*, diagnosticó la presencia de leptospirosis mediante el uso de PCR en roedores, marsupiales y quirópteros capturados en la Reserva Allpahuayo – Mishana, en la región Loreto.

En el 2003, Muñoz *et al*, realizó una búsqueda de anticuerpos contra diferentes serovares de *Leptospira interrogans* en cuatro especies de felinos silvestres adultos mantenidos en cautiverio, entre hembras y machos criados en las instalaciones del Zoológico del Patronato del Parque de las Leyendas. Para tal fin, se colectaron 19 muestras de suero, que fueron evaluadas con la prueba de microaglutinación empleando como antígeno vivo los serovares: *ballum*, *icterohemorrhagiae*, *pomona*, *wolffi* y *georgia*. Se obtuvo un 95% (18/19) de sueros positivos contra *L. icterohemorrhagiae* y *pomona* con títulos entre 1:100 y 1:200, y un 57.8% de los felinos (11/19) presentaron anticuerpos contra *L. icterohemorrhagiae* y *pomona* simultáneamente.

## 2.4 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la leptospirosis puede ser complicado, debido principalmente a las características de las leptospiras y a la epidemiología de la enfermedad. Es conveniente recabar información sobre una serie de datos que puedan orientar el diagnóstico (Bolin, 2003; Alonso *et al*, 2001).

Las técnicas utilizadas para el diagnóstico de leptospirosis se pueden dividir en dos grandes grupos. Las técnicas indirectas, basadas en la detección de anticuerpos contra leptospiras; y las técnicas directas que se basan en la detección de leptospiras o sus antígenos y/o ácidos nucleicos en los tejidos o fluidos corporales (Alonso *et al*, 2001).

Las técnicas serológicas son las pruebas de laboratorio más utilizadas tanto para el diagnóstico como para la realización de estudios epidemiológicos (Vadillo *et al*, 2002; Alonso *et al*, 2001). Su mayor desventaja es que los niveles de anticuerpos pueden mantenerse por años y alcanzar niveles indetectables. Además, en el caso de serovares adaptados, el animal puede no presentar una respuesta de anticuerpos detectable (Alonso *et al*, 2001).

La técnica de aglutinación microscópica con suspensión de leptospiras vivas y posterior lectura de las mismas por microscopia de campo oscuro, es la prueba gold estándar para el diagnóstico de leptospira, además es la prueba oficial para la exportación e importación de animales y de referencia internacional para la detección de anticuerpos específicos anti-leptospiras, también conocida por su sigla en inglés MAT (Microscopic Agglutination Test) (Bolin, 2002; Laguna, 2000; OIE, 2004). MAT es una prueba serológica que ofrece una elevada especificidad, utiliza un alto número de antígenos, de acuerdo a los numerosos serovares existentes y contemplados en este género (Vadillo *et al*, 2002).

Esta prueba se emplea para detectar anticuerpos anti-leptospiras en el suero, identificar los aislamientos, clasificar cepas y son usados como base para evaluar cualquier otro método serológico para el diagnóstico de la leptospirosis (Céspedes y Glenny, 2002). Esta prueba se ha empleado para la evaluar la presencia de anticuerpos en diferentes especies silvestres, como ratas, ratones (Al Saadi y Post, 1976; Macedo, 1993), cerdos salvajes (Ebani *et al*, 2003), cachorros de león marino californiano (Acevedo-Whitehouse, 2003; Colgaros-Schouten *et al*, 2002; Godínez *et al*, 1999), ardillas voladoras (Masuzawa *et al*, 2006), coyotes, zorros y venados (Cirone *et al*, 1978), sajinos (Mendoza, 2004) y ronsocos (Muñoz, 2000; Cueva, 2007).

La prueba de microaglutinación fue creada por Martin y Petit, consiste en la microaglutinación con antígenos vivos de leptospira. Se enfrentan diluciones sucesivas del suero del paciente (comenzando con 1:50), a un grupo de serovares seleccionados de leptospiras, que luego de incubados durante 60 minutos a 37°C en una estufa, para luego observarse en microscopio de campo oscuro para estimar el 50% de aglutinación como el punto final de la reacción antígeno-anticuerpo (Céspedes y Glenny, 2002).

La respuesta inmune de tipo IgM e IgG contra la leptospirosis puede evidenciarse mediante ELISA IgG, ELISA IgM, Microaglutinación (MAT) (Céspedes *et al*, 2002; MINSA, 1998), inmunoaglutinación (Laguna, 2000; Sandow y Ramírez, 2005). Los anticuerpos residuales en el suero se detectan a partir de infecciones previas o inmunizaciones: IgG alrededor de 2 años e IgM alrededor de 3 meses. (Laguna, 2000).

Cada serovar de leptospira presenta epítomos en la superficie de los LPS. La presencia de epítomos comunes en los diferentes serovares producen el fenómeno de reacción cruzada, co aglutinación o aglutinación simultánea. La reacción cruzada ocurre generalmente entre serovares pertenecientes al mismo

serogrupo y se observa en las etapas iniciales de la enfermedad (Farace, 2001). Los patrones de reactividad cruzada pueden influir en el diagnóstico serológico de la leptospirosis. La reacción cruzada parece variar geográficamente (Chappel, 2006).

El aislamiento de las leptospiras es para muchos autores la técnica más sensible para el diagnóstico de la leptospirosis aguda y crónica, tanto en medio de cultivo como por inoculación en animales de experimentación. Su mayor desventaja es que requiere mucho tiempo y laboratorios especializados (Alonso *et al*, 2001).

El uso de una combinación de pruebas permite una máxima sensibilidad y especificidad para establecer el diagnóstico. Las pruebas serológicas son recomendadas en todos los casos, combinadas con una o más técnicas para identificar los organismos en los tejidos o fluidos corporales (Bolin, 2003).

Las mayores dificultades diagnósticas se presentan en las formas anictéricas de la leptospirosis, que pasan desapercibidas y rotuladas como otros diagnósticos desde el punto de vista clínico (MINSAs, 1998). El diagnóstico de leptospirosis debe ser investigado en todo paciente con fiebre y mialgias, teniendo en cuenta que las manifestaciones clínicas son superponibles con otras enfermedades. La mayoría de los errores de diagnóstico pueden evitarse mediante la realización de una historia y examen físico detallados (Laguna, 2000).

## **2.4.1 Pruebas de diagnóstico**

### **2.4.1.1 Técnicas indirectas**



Son las pruebas que basan su diagnóstico en el hallazgo de anticuerpos contra leptospira. Estas técnicas son más empleadas con muestras de animales adultos, son más sencillas y tienen un bajo costo.

#### **a. Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT)**

Es la prueba estándar de referencia internacional para la confirmación serológica de una infección reciente y/o pasada de leptospirosis; emplea antígenos vivos, es de alta sensibilidad y especificidad al serovar infectante (WHO, 2003; Céspedes y Glenny, 2002; Laguna, 2000)

#### **b. Prueba de aglutinación microscópica con antígeno muerto (MSAT)**

Utiliza leptospiras formoladas y centrifugadas, resuspendida en un pool de antígenos de varios serogrupos. Se produce una aglutinación semicuantitativa que se puede leer a simple vista. Es una prueba de menos específica que MAT, menor nivel de títulos obtenido, mayor reacción cruzada.

#### **c. Fijación del complemento**

Emplea antígenos de Leptospira para la detección de animales con leptospirosis. Es útil para el diagnóstico rápido y menos laboriosa que el MAT.

#### **d. ELISA**

Es empleada para la detección de las leptospiras en tanque de leches o suero. Detecta inmunoglobulinas M durante la primera semana de la enfermedad, e inmunoglobulinas G que permite identificar infecciones

recientes o pasadas. Es una prueba de mayor sensibilidad que MAT, no diferencia anticuerpos vacunales y los no vacunales. Es una prueba muy eficaz.

#### **e. Aglutinación macroscópica**

Es una prueba con poca sensibilidad y no puede determinar el serovar. Fue desarrollada para evitar los inconvenientes derivados del mantenimiento de las cepas vivas.

#### **f. Aglutinación en microcápsula**

Se emplean antígenos lapetospirales transportados en microcápsulas de un polímero sintético. Es considerada una prueba muy sensible y específica.

#### **g Hemaglutinación indirecta**

Es una prueba género específica de alta sensibilidad que detecta solo inmunoglobulinas M. Emplea eritrocitos de oveja o del grupo sanguíneo O del humano.

### **2.4.1.2 Técnicas directas**

Basan su diagnóstico en la demostración de la presencia de leptospira o sus componentes en la sangre, tejido, secreciones y animales con signos de valor diagnóstico.

#### **a. Observación en microscopio a campo oscuro**

Se realiza para la observación de leptospiras en fluidos orgánicos. Es necesario que exista una gran cantidad de Leptospiras en la muestra para realizar una buena observación de las mismas.

#### **b. Tinción argéntica**

Se emplean para la identificación de leptospiras en los órganos de los animales presumiblemente muertos por leptospirosis. La presencia de leptospiras en fetos abortados y mortinatos son indicadores de una infección activa en ellos y crónica en la madre. Es una prueba de baja especificidad y sensibilidad.

#### **c. Técnicas de inmunohistoquímica:**

Son pruebas de baja sensibilidad y poco adecuadas para el diagnóstico crónico, dependen del número de antígenos en la muestra.

La inmunofluorescencia consiste en el marcado de inmunoglobulinas con colorantes fluorescentes, sin afectar su reactividad.

La inmunoperoxidasa emplea un marcador llamado peroxidasa de rábano, con las enzimas conjugadas a inmunoglobulinas o a antiglobulinas, se identifican antígenos específicos en cortes de tejido. El tejido marcado puede observarse en un microscopio de luz convencional.

El marcado de partículas de oro es similar a las anteriores, es poco sensible y requiere de un mayor número de antígenos.

#### **d. Detección y estudio de los ácidos nucleicos.**

Entre estas pruebas se encuentran el marcado con sondas de ADN, hibridación del ARN, marcado con radio y PCR, tienen mayor efectividad con muestras de orina.

#### **e. Aislamiento**

Es la técnica más sensible y confirma la presencia del antígeno en casos agudos y crónicos. Requiere de tiempo y laboratorios especializados.

La inoculación de animales de experimentación puede considerarse una forma especial de aislamiento y es considerada una técnica muy sensible.

#### **f. Otros métodos.**

La prueba de hemolisina (HL), contra inmuno electroforesis (CIE), inmunoabsorción magnética, hibridación de ADN, absorción de antígenos inmunomagnética, etc han sido empleadas para el diagnóstico de leptospirosis sin mayor relevancia (Sandow y Ramírez, 2005).

### **2.4.2 Diagnóstico diferencial**

Las enfermedades en poblaciones humanas que en ocasiones tienen una presentación clínica indistinguible de la leptospirosis pueden ser sospechosas por la historia epidemiológica como la fiebre amarilla, dengue y la malaria, por sus características icterohemorrágicas, y de la hepatitis viral, meningoencefalitis, y malaria (Laguna, 2000).

Otras enfermedades pueden eventualmente ser confundidas con la leptospirosis como colecistitis, infecciones respiratorias, sarampión, rubéola, pielonefritis, brucelosis con ictericia, sepsis bacterianas graves con ictericia, endocarditis. Por lo que el examen clínico epidemiológico será de gran utilidad en el diagnóstico diferencial de esta enfermedad (Laguna, 2000).

Las enfermedades que cursen con petequias, fiebres e ictericias son las más complejas de diferenciar en poblaciones animales, tales como la babesiosis,

piroplasmosis, la Enfermedad de Aujeszky en cerdos, o la hepatitis canina (Bolin, 2000).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. POBLACIÓN Y AREA DE ESTUDIO

##### 3.1.1. Lugar de estudio

El muestreo para el presente estudio se realizó en el Zoológico Parque de Las Leyendas, en la ciudad de Lima, en el distrito de San Miguel, y la evaluación serológica en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

##### 3.1.2. Animales

La población de estudio está conformada por las ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) aparentemente sanos, entre juveniles y adultos, hembras no gestantes y machos, que habitan el Zoológico del Patronato del Parque de Las Leyendas “Felipe Benavides Barreda”. No se consideraron a las crías y las hembras gestantes.

No existen registros en el Zoológico Parque de Las Leyendas desde cuando se acogen a estos individuos, probablemente más de 5 años. La colección zoológica del Parque de Las Leyendas cuenta aproximadamente con 617 mamíferos agrupados en 80 especies, 60 géneros, 32 familias y 8 órdenes; que representan el 40% de toda la colección zoológica; además de aves, reptiles, peces y anfibios. La mayor cantidad de ardillas observada está en la zona selva, la que a su vez cuenta con 253 especies en exhibición, el cual representa un 16.19% de la colección zoológica (Censo enero 2008, PATPAL). Además de las ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*), se ha observado alrededor de 20

especies diferentes de aves silvestres en el zoológico, compartiendo el mismo ecosistema, así como roedores de similares hábitos alimenticios.

Se obtuvieron datos sobre sexo, peso, edad aproximada, así como la procedencia con respecto al área del zoológico en que había sido capturado el animal.

### 3.2. TAMAÑO MUESTRAL

Debido a las limitaciones éticas que implica la saca sanitaria de animales silvestres y con el objetivo de estimar un tamaño de muestra estadísticamente significativo para la frecuencia de anticuerpos contra *Leptospira sp* en ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) en el Zoológico Parque de Las Leyendas, se decidió usar la fórmula para determinar el tamaño de muestra cuando se trabajan sobre poblaciones infinitas y se asume una prevalencia mayor al 1%, la cual es la siguiente

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \times p \times q}{d^2}$$

Donde:

$Z_{\alpha}^2$  = Valor de tabla de z al 90%

**p** = prevalencia de la enfermedad

**q** = 1 – p

**d** = precisión

**n** = tamaño de muestra

Siendo los valores calculados:

$Z_{\alpha}^2 = 1.64$

**p** = 80% (Cock, 2005)

**q** = 20%

**d** = 0.1

**n** = 43.29

Es necesario recalcar que el proyecto fue remitido a las autoridades en fauna silvestre para su permiso correspondiente, y sólo se autorizó la toma de muestra con 35 animales, fijándose este valor (35 animales) en desmedro de la inferencia que podría hacerse con los datos encontrados.

### **3.2.1. Obtención de muestras**

#### **3.2.1.1. Captura**

En el marco de ejecución del Programa de Control y Erradicación de Roedores del Patronato del Parque de Las Leyendas “Felipe Benavides Barreda”, se capturaron ejemplares de ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*). Los animales fueron inmovilizados con Ketamina (50mg/Kg) y Xylazina (2mg/Kg) vía IM (Carpenter, 2005). Las zonas de captura se muestran en el Apéndice 5.

#### **3.2.1.2. Toma de muestra**

La muestra de sangre fue extraída mediante punción cardiaca en el quinto espacio intercostal izquierdo lateral al esternón, a razón de 1% del peso corporal obtenido (Al Saadi y Post, 1976; Bolin, 2003), utilizando agujas hipodérmicas y tubos vacutainers. Los tubos fueron centrifugados y el suero obtenido fue almacenado en viales rotulados y congelados a -20°C hasta su procesamiento.



### **3.3. MATERIALES**

#### **3.3.1. Captura:**

- (02) Trampas para mamíferos pequeños.
- 20m de cuerdas de nylon
- (01) jaulas metálicas de compresión 100cm x 50cm x 50cm.
- Cazamonos chico
- Guantes de cuero

#### **3.3.2. Recolección de muestras:**

- 100 agujas hipodérmicas descartables 21G x 1.5"
- 50 jeringas hipodérmicas descartables de 3ml
- 50 jeringas de tuberculina descartables de 1ml
- 01 frasco de Ketamina (100mg/ml)
- 01 frasco de Xylazina (50mg/ml)
- 100 pares de guantes quirúrgicos
- 50 mascarillas descartables
- 50 tubos tipo Vacutaner
- 500g de algodón
- 200ml de alcohol 70°
- Frascos estériles para conservación de muestras
- 1 gradilla
- 1 mesa
- 1 cinta métrica
- 1 calibrador o vernier

#### **3.3.3. Materiales de laboratorio:**

- Centrifuga
- Microscopio óptico

### **3.4. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Leptospira sp.***

Los anticuerpos fueron detectados mediante la prueba de microaglutinación (MAT). Para la detección de anticuerpos contra leptospira en las ardillas nuca

blanca se emplearán 21 diferentes serovares (antígeno vivo) descritos en el Apéndice 3, y se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el Manual de la OIE y disponible en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Apéndice 4).

### 3.5. ANÁLISIS DE DATOS

La frecuencia de la infección en la población muestreada fue expresada en porcentaje, empleando la siguiente fórmula:

$$P (\%) = \frac{\text{N}^\circ \text{ individuos seropositivos}}{\text{N}^\circ \text{ de animales muestreados}} \times 100$$

Los resultados son expresados en porcentajes con un intervalo de confianza del 95%, de acuerdo a la siguiente fórmula (Thrusfield, 1990).

$$P = p \pm z (95\%) \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico STATA 9.0 para determinar las asociaciones entre las variables edad, sexo, y procedencia, mediante la prueba de Chi cuadrado.

## IV. RESULTADOS

La frecuencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* fue 82.9 % (29/35 IC: 66.3 ± 93.4). Seis muestras reaccionaron a dos serovares y ninguna a más de dos serovares (Cuadro 1, Apéndice 4).

De los 29 animales positivos a anticuerpos, 6 muestras presentaron positividad a dos serovares: *canicola* – *icterohaemorrhagiae* y *georgia* – *icterohaemorrhagiae*, siendo ésta última asociación la más frecuente. En ambos casos los títulos estuvieron en un rango de 1/100 y 1/200 (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Número de ardillas nuca blanca del Zoológico Parque de Las Leyendas reactoras a cuatro serovares de *Leptospira sp.* y sus respectivos títulos de anticuerpos

N° Animales	Animales reactivos n (%)	Serovar detectado	Título de anticuerpos
35	1 (2.9 %)	<i>canicola</i>	1/200
	1 (2.9 %)	<i>canicola</i> - <i>icterohaemorrhagiae</i>	1/100
	13 (37.1 %)	<i>icterohemorrhagiae</i>	1/100
	2 (5.7 %)	<i>icterohemorrhagiae</i>	1/200
	2 (5.7 %)	<i>icterohemorrhagiae</i> - <i>georgia</i>	1/100
	2 (5.7 %)	<i>icterohemorrhagiae</i> - <i>georgia</i>	1/200 - 1/100
	1 (2.9 %)	<i>icterohemorrhagiae</i> - <i>georgia</i>	1/100 - 1/200
	5 (14.3 %)	<i>georgia</i>	1/100
	1 (2.3 %)	<i>georgia</i>	1/200
	1 (2.3 %)	<i>australis</i>	1/100
<b>Total</b>	29 (82.9%)		

Las muestras de los animales capturados correspondieron a 18 individuos machos y 17 hembras; de los cuales 20 ejemplares eran juveniles y 15 adultos (Cuadro 2, Apéndice 1).

**Cuadro 2.** Relación entre el número de ardillas capturadas clasificadas por sexo y edad

	Juvenil	Adulto	Total
Hembras	8	9	17 (48.57%)
Machos	12	6	18 (51.42%)
Total	20 (71.42%)	15 (28.57%)	35 (100%)

De los 21 serovares empleados como antígeno se obtuvo positividad a 4 diferentes serovares: *icterohaemorrhagiae*, *georgia canicola*, y *australis*. El 60% (21/35  $\pm$  0.00672) de las ardillas fueron seroreactores al serovar *icterohaemorrhagiae* con títulos de 1:100 y de 1:200. Sólo un individuo fue seroreactor al serovar *australis* con títulos de 1:100 (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Frecuencia de anticuerpos contra las serovariedades de *Leptospira sp.* en las ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*)

Serovar	N° Positivos	Frecuencia	Intervalo de confianza
Icterohaemorrhagiae	21	60%	$\pm$ 0.00672
Georgia	11	31.4%	$\pm$ 0.0060
Canícola	2	5.7%	$\pm$ 0.0015
Australis	1	2.9%	$\pm$ 0.000778

El 86.7% (13/15) de las ardillas adultas y el 80% (16/20) de las juveniles presentaron anticuerpos contra *Leptospira sp.* No se encontró asociación entre la edad y la positividad a anticuerpos contra *Leptospira sp.* empleando la prueba de Chi cuadrado (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Asociación entre la presencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* y la edad de las ardillas nuca blanca del Zoológico Parque de Las Leyendas

<b>Edad</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Total</b>
<b>Juvenil</b> <i>N° animales</i>	04/20	16/20	20
<b>Adulto</b> <i>N° animales</i>	02/15	13/15	15
<b>Total</b> <i>N° animales</i>	06/35	29/35	35

Chi2 Pearson= 0.2682

El mayor porcentaje de ardillas seroreactoras fueron encontrado en la zona selva (70.59%) (12/17), seguidos de la zona sierra (85.71%) (6/7) y costa (100%) (7/7) e internacional (100%) (4/4) (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Asociación entre la frecuencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* y la zona de captura de las ardillas nuca blanca del Zoológico Parque de Las Leyendas

<b>Zona</b>	<b>Negativo (%)</b>	<b>Positivo (%)</b>	<b>Total (%)</b>
<b>Costa</b> <i>N° animales</i>	0/7	7/7	7
<b>Sierra</b> <i>N° animales</i>	1/7	6/7	7
<b>Selva</b> <i>N° animales</i>	5/17	12/17	17
<b>Internacional</b> <i>N° animales</i>	0/4	4/4	4
<b>Total</b> <i>N° animales</i>	6/35	29/35	35

Entre el total de los animales infectados 82.3 % (29/35) Se encontró que 15 (51.72%) eran hembras y 14 (48.28%) eran machos (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Asociación entre la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* sp. y el sexo de las ardillas nuca blanca del Zoológico Parque de Las Leyendas

		<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Total</b>
<b>Hembra</b>	N° animales	02/17	15/17	17
<b>Macho</b>	N° animales	04/18	14/18	18
<b>Total</b>	N° animales	06/35	29/35	35

## V. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio indican que existe una alta frecuencia (82,9%) de anticuerpos contra *Leptospira sp.* en ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) del Patronato del Parque de Las Leyendas “Felipe Benavides Barreda”.

Los serovares de mayor presencia fueron *icterohaemorrhagiae*, seguido por *canicola*, *georgia* y *australis*. La alta frecuencia del serovar *icterohaemorrhagiae* con títulos no mayores a 1/200 en las ardillas nuca blanca sugiere que la ardilla nuca blanca podría ser uno de los reservorios de este serovar. En un reservorio u hospedador de mantenimiento la *Leptospira sp.* usualmente no produce infección aguda ni altos título de anticuerpos en el animal, pero eliminan la bacteria por la orina, contaminando el medio ambiente (Sandow y Ramirez, 2005).

Aparentemente no existen reportes sobre evidencia de infecciones con *Leptospira sp.* en las ardillas nuca blanca en el mundo (Cubas, 2001). Las evaluaciones sobre leptospirosis están dirigidas principalmente a otras especies del orden rodentia, sobretodo ratas y ratones (Apéndice 6).

La presencia de roedores peridomésticos y la presencia de fuentes de agua son los puntos críticos para el mantenimiento de las leptospiras en el medio ambiente (Céspedes, 2005; Laguna, 2000). Estas características fueron observadas en las diferentes zonas de procedencia de los animales capturados; lo que podría contribuir al mantenimiento de las leptospiras en el medio ambiente y ser fuente de infección para estos animales.

La presencia de vertebrados silvestres como habitantes indeseables en zoológicos es muy frecuente, pudiendo encontrarse tanto mamíferos domésticos, como aves, insectos, y reptiles (Cubas, 2001).

Ayulo *et al* (1947) determinaron la presencia de *L. icterohaemorrhagiae* en 1000 ratas grises (*Mus norvegicus*) en la ciudad de Lima mediante examen histológico, obteniendo 28.3% (283/1000) animales positivos. Herrer y Liceras de Hidalgo (1981), evaluaron mediante métodos serológicos y cultivos bacteriológicos, la presencia de *Leptospira sp* en 600 ratas capturadas en la ciudad de Lima; encontrando 85.6% de prevalencia y títulos bajos (entre 1:100 y 1:300). Los estudios sobre presencia de leptospira en el orden Rodentia han sido realizados con mayor énfasis en roedores peridomésticos. En Lima, Macedo *et al* (1993), reportó la presencia de leptospiras en ratones domésticos (*Mus musculus*) de Lima y Callao, con una prevalencia de 45% (10/22) frente a 17 serovares de *Leptospira sp*.

Anticuerpos y antígeno de *L. kirscheneri serovar griptotyphossa* han sido detectados en personas expuestas a ardillas voladoras infectadas importadas de USA (Masuzawa *et al*, 2006).

La infección experimental en ronsocos (*Hydrochaeris hydrochaeris*) con *Leptospira serovar pomona* indicaron que los ronsocos pueden actuar como reservorios de leptospira contribuyendo al mantenimiento de la infección en ambientes rurales y silvestres (Marvulo *et al*, 2004). Cueva *et al* (2007), determinaron la endemidad de 4 serovares de *Leptospira sp* en un zocriadero de ronsocos en Iquitos.

Por otro lado, en el Zoológico Parque de Las Leyendas se determinó un 95% (18/19) la presencia de anticuerpos contra 5 serovares diferentes de *Leptospira sp*. en felinos silvestres *L. icterohemorrhagiae* y *pomona* lo más frecuentes con títulos entre 1:100 y 1:200 (Muñoz *et al*, 2003).

Estos resultados concuerdan parcialmente con lo obtenido en el presente estudio; indicando probablemente la permanente presencia de la bacteria en el



medio, donde la ardilla nuca blanca podría estar actuando como hospedador reservorio, al igual que otros roedores encontrados en el área.

La alta frecuencia de anticuerpos (82%) contra el serovar *icterohaemorrhagiae*, indica una potencial y riesgosa fuente de infección para el personal que labora en el zoológico, que realiza las labores de limpieza, mantenimiento y alimentación en los ambientes de exhibición, así como la posible infección para animales de la colección zoológica, que en su mayoría se encuentran en peligro de extinción.

La presencia de una muestra positiva a anticuerpos contra el serovar *autumnalis*, podría evidenciar una reacción cruzada con un miembro distinto del mismo serogrupo, al igual que la reacción simultánea a más de un serovar evidenciada en otras muestras (Céspedes y Glenny, 2002).

Aparentemente no existe influencia de la procedencia, edad o sexo de los animales con respecto a la presencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* Los títulos de anticuerpos obtenidos sugieren que los animales evaluados han tenido experiencia con la bacteria. La observación de posibles signos clínicos y la cinética de los anticuerpos en los animales infectados para determinar la seroconversión podrían dar mayores luces sobre la dinámica de la enfermedad en esta población de roedores.

Generalmente los estudios en otras especies de ardillas arborícolas están orientados hacia la evaluación de su impacto nocivo sobre otras poblaciones de animales silvestres y el medio ambiente. No se han realizado estudios de estas características en zoológicos en el Perú, sin embargo se ha reportado a las ardillas arborícolas como nocivas para la conservación de la biodiversidad en la áreas en que ha sido introducida por el desplazamiento de poblaciones y la depredación de los recursos alimenticios para la fauna nativa (CONAM, 2001).

## VI. CONCLUSIONES

- Existe una alta frecuencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* en las ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) provenientes del zoológico Parque de Las Leyendas.
- De los 21 serovares utilizados en la batería de antígeno se identificaron anticuerpos contra los serovares *canícola*, *icterohaemorrhagiae*, *georgia* y *australis*, con títulos entre 1/100 y 1/200.
- No hubo asociación estadística entre los animales con anticuerpos contra *Leptospira sp.* y las variables: zonas de captura, el sexo o edad, de las ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) muestreadas.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Deben realizarse evaluaciones serológicas en otros roedores de la colección zoológica y los cuidadores del zoológico.
2. Establecer un programa de control y erradicación de roedores, empleando métodos de control físicos y químicos, teniendo en cuenta los riesgos para la colección zoológica y el personal: mejoramiento de las barreras físicas en los ambientes de exhibición, modificación del hábitat de las ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) sin alterar el componente paisajístico del zoológico, remoción de nidos y lugares propicios para su reproducción y alimentación, entre otros.
3. Establecer un programa de control poblacional de ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) empleando métodos físicos de captura y evaluaciones sanitarias de las poblaciones.
4. Desarrollar un programa educativo sanitario entre los cuidadores y personal del zoológico, enfocados en el conocimiento de la enfermedad y uso adecuado de materiales empleados en las actividades diarias de manejo de animales.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. *Acevedo-Whitehouse, K., De la Cueva, H., Gulland, F., Auriolos, D., Arellano, F., Suarez, F.* 2003. Evidence of *Leptospira interrogans* infection in California sea lion pups from the Gulf of California. *J Wildlife Dis* 39 (1):145-151.
2. *Alfaro, C., Aranguren, Y., Clavijo, A., Díaz, C.* 2004. Prevalencia serológica de leptospiras en ganado de doble propósito del noreste de Monagas, Venezuela. *INIA – Zootecnia Tropical* 22 (02): 16-19
3. *Al Saadi, M., Post, G.,* 1976. Rodent leptospirosis in Colorado. *J Wild Dis* 12 (3) 315-317.
4. *Alonso, C., García, F., Ortega, L.* 2001. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión). *Invest. Agr.: Prod. Sanid. España.* 16 (2): 205 – 225.
5. *Bolin, C.* 2000. Leptospirosis. En: *Emerging diseases of animals.* Brown C., Bolin C. Ed. ASM Press Washington DC. pp 185 – 197.
6. *Bolin, C.* 2003. Leptospirosis. En: *Zoo & wild animal medicine: current therapy 5.* Saunders Publishers. Fowler, M. (Ed). USA. 982p.
7. *Bunnell, J., Hice, C., Watts, D., Montrueil, V., Tesh, R. Vinetz, J.* 2000. Detection of pathogenic *Leptospira spp.* infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. *Am J Trop Med Hyg.* 63 (5-6): 225-258.
8. *Carpenter, J.* 2005. *Exotic animal formulary.* 3° Ed. p565. Elsevier Saunders Company. Philadelphia.
9. *Céspedes, M.* 2005. Leptospirosis: enfermedad zoonótica emergente. *Rev Perú Med Exp Salud Púb.* [acceso 29 de septiembre de 2008] Disponible en: [www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342005000400008&Ing=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342005000400008&Ing=es&nrm=iso)
10. *Céspedes, M., Balda, L., González D., Tapia, R.* 2005. Situación de la leptospirosis en el Perú 1994 – 2004. *Rev Perú Med Exp Salud Púb.* [acceso 29 de septiembre de 2008]. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342006000100009&Ing=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342006000100009&Ing=es&nrm=iso).

11. Cirone, S., Riemann, H., Ruppner, R., Behymer D., Franti, C. 1978. Evaluation of the hemagglutination test for epidemiologic studies of leptospiral antibodies in wild mammals. J Wild Dis 14: 193-201.
12. Colgaros-Schouten, A., Mazet, J., Gulland, F., Miller, M., Hietala, S. 2002. Diagnosis and seroprevalence of leptospirosis in california sea lions from Coastal California. J. Wildlife Dis. 38(1): 7-17.
13. Consejo Nacional del Ambiente-CONAM, Instituto Nacional de Sanidad Agraria-SENASA Museo de Historia Natural-Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Asociación Peruana para la Conservación de la Naturaleza-APECO, 2003. Las especies exóticas invasoras en el Perú – Informe nacional. [acceso 29 de septiembre de 2008] Disponible en:  
[http://www.conam.gob.pe/chm/Archivos/Posi\\_Nacio/LAS\\_ESPECIES\\_EX\\_TICAS\\_INVASORAS\\_EN\\_EL\\_PER\\_.doc](http://www.conam.gob.pe/chm/Archivos/Posi_Nacio/LAS_ESPECIES_EX_TICAS_INVASORAS_EN_EL_PER_.doc)
14. Cox, T., Smythe, L., Leungm K. 2005. Flying foxes as carriers of pathogenic leptospira species. J Wild Dis 41(4): 753–757.
15. Cueva, E. 2007. Incidencia de infección por *Leptospira* sp. en ronsocos (*Hydrochaeris hydrochaeris*) en cautiverio del zoológico Biodiversidad Amazónica (BIOAM) de la ciudad de Iquitos [Tesis Bachiller] Facultad de Medicina Veterinaria: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 55p
16. Delgado, E. 1967. Leptospirosis en monos *Saimiri sciurus* en la Amazonía peruana [Tesis Bachiller] Facultad de Medicina Veterinaria: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 17p.
17. Derrell, C. 1986. Rodents. En: Zoo & wild animal medicine. Fowler, M. (Ed). Second Edition. WB Saunders Company. USA. 1127: 728 – 747.
18. Ebani, V., Cerri, D., Poli, A., Andreani, E. 2003. Prevalence of leptospira and brucella antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy. J Wild Dis 39 (3): 718 – 722.
19. Eisenberg, J., Redford, K. 1989. Mammals of the neotropic: the central neotropics. The University of Chicago Press. USA. Vol 3.
20. Emmons, L. 1991. Neotropical rainforest mammals. A field guide. University Of Chicago Press. pp. 170-171.

21. Farace, M. 2001. Epidemiología, diagnóstico y control de leptospirosis. Manual del servicio de bacteriología sanitaria. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Argentina. 28p.
22. Garrity, G. M.; Bell, J.A.; Lilburn, T.G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. Second Edition. Release 5.0. p 305.
23. Godínez, C., Zelaya de Romiyo, B., Aurióles-Gamboa, D., Verdugo-Rodríguez, A., Rodríguez-Reyes, E., De la Peña-Moctezuma, A. 1999. Antibodies against *Leptospira interrogans* in California sea lion pups from Gulf of California. J Wild Dis 35(1): 108–111pp.
24. Hernández, G. Guzmán, C. 2003. Experiencia en el tratamiento de la leptospirosis. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias – Maracay, Venezuela. Rev Ciencias Médicas La Habana 9 (2): 16 - 21
25. Karaceva, E. V. 1971. Características serológicas de los mamíferos hospederos de *L. grippityphosa* y su rol en los focos naturales de leptospirosis. Fauna y ecología de los roedores. 7ª Ed (en ruso).
26. Laguna, V. 2000. Leptospirosis, módulos técnicos. Serie: Documentos monográficos N°2. OGE - INS. Perú. 56pp. [acceso 29 de septiembre de 2008] Disponible en: [www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/M%C3%B3dulo%20T%C3%A9cnico%20%20leptospirosis.pdf](http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/M%C3%B3dulo%20T%C3%A9cnico%20%20leptospirosis.pdf)
27. Licerías de Hidalgo, J. 1981. Leptospirosis en Tingo María - Departamento de Huánuco. Perú II: Estudio en animales silvestres. Bol Ofic Sanit Panam 91 (1): 47-54
28. Macedo, S. Valencia, E. Cuadra, A. 1993. Leptospirosis en *Mus musculus*: aislamiento y serología. Rev Per Med Trop UNMSM. 7(1): 27 – 34.
29. Masuzawa, T., Okamoto, Y., Une, Y., Takeuchi, T., Tsukagoshi, K., Koisumi, N., Kawabata, H., Ohta, S., Yoshikawa, Y. 2006. Leptospirosis in squirrel imported from United States to Japan. J Emerging Infectious Dis 12(7). [acceso 29 de septiembre de 2008]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol12no07/06-0370.htm>
30. Márvalo, M., Ramos, J., Marques, P., Morais, Z., Micke, A., Arruda, S., Soares, J. 2004. Experimental leptospirosis in capibaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). Proceedings AAZV, AAWV, WDA Joint conference USA p311.

31. *Mendoza, P. 2004. Presencia de anticuerpos contra Leptospira spp. en sajinos (Tayassu tajacu) mantenidos en cautiverio en la Amazonía peruana [Tesis Bachiller] Facultad de Medicina Veterinaria: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 50p.*
32. *MINSA-Ministerio de Salud del Perú, 1998. Manual de vigilancia y control de leptospirosis. Lima - Perú. pp36.*
33. *Muñoz, K., Cornejo, C., Rivera, H. 2000. Anticuerpos contra Leptospira spp. en capibaras (Hydrichoerus hidrocaheris) de un zocriadero de la Amazonía peruana. En Rev Inv Vet Perú; 11(2): 167 - 169.*
34. *Nowak, R. 1999. Walker's mammals of the world. Johns Hopkins University Press. 6a. Ed. Vol II. p 457.*
35. *OIE, 2004. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. United states department of agriculture – National Veterinary Service Laboratory. USA. [acceso 29 de septiembre de 2008]. Disponible en: [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A\\_00043.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00043.htm)*
36. *Ramiro, C. 2001. Wild animals and public health. En: Biology medicine and surgery of south american wild animals. Fowler, M (Ed). Iowa state University Press. First edition. 493 - 4495 pp.*
37. *Sainsbury, A. 2003. Rodents. En: Zoo & wild animals medicine. Fowler, M. (ed). 5 ed. pp420 - 442*
38. *Sadow, K. Ramirez, W. 2005. Leptospirosis. Revista electrónica veterinaria. Vol VI (6). [acceso 29 de septiembre de 2008]. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060605/060501.pdf>*
39. *Shotts E. 1981. Leptospirosis. En: Infectious disease of wild mammals. Davis, J., Karstad, L., Trainer, D. (Ed). The Iowa State University Press. Iowa. USA. 446: 323 – 331.*
40. *Thrusfield M. 1990. Epidemiología veterinaria. Editorial Acribia, S. A. España. 339.*
41. *Tirira, D. 1999. Mamíferos de Ecuador. Museo de zoología. Centro de biodiversidad y ambiente. Pontificia Universidad Católica de Ecuador. Sociedad para la Investigación y Monitoreo de la Biodiversidad Ecuatoriana. Impreso en Ecuador. 392pp: 87 -88pp.*

42. Valdés, M. 2003. Las ardillas de México. Biodiversitas N° 51. 16p. [acceso 29 de septiembre de 2008]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/otros/biodiversitas/doctos/pdf/biodiv51.pdf>
43. Vadillo, S., Píriz, S., Mateos, E. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. Ed. McGraw-Hill Interamericana. España.
44. WHO, 2003. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: pp110. [acceso 29 de septiembre de 2008]. Disponible en: [http://libdoc.who.int/hq/2003/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002.23.pdf](http://libdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf) Visualizado el 29/09/2008.



**APÉNDICE 1.** Registro de los individuos capturados por zona de procedencia,  
peso, sexo y edad.

<b>N°</b>	<b>Zona</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad</b>
01	Selva	550	M	Juvenil
02	Selva	450	H	Adulto
03	Selva	350	M	Juvenil
04	Selva	470	M	Adulto
05	Selva	390	M	Juvenil
06	Selva	420	H	Juvenil
07	Selva	310	M	Juvenil
08	Selva	250	H	Juvenil
09	Internacional	530	H	Adulto
10	Selva	550	H	Adulto
11	Internacional	500	H	Adulto
12	Selva	470	M	Adulto
13	Selva	450	M	Juvenil
14	Internacional	400	H	Juvenil
15	Selva	470	H	Adulto
16	Costa	420	M	Juvenil
17	Selva	500	H	Juvenil
18	Costa	470	H	Adulto
19	Costa	380	M	Juvenil
20	Costa	560	M	Adulto
21	Internacional	530	H	Adulto
22	Costa	300	H	Juvenil
23	Sierra	460	M	Juvenil
24	Sierra	450	H	Juvenil
25	Costa	510	M	Adulto
26	Sierra	250	M	Juvenil
27	Costa	530	H	Adulto
28	Sierra	270	M	Juvenil
29	Sierra	250	M	Juvenil
30	Sierra	520	H	Adulto
31	Sierra	530	M	Adulto
32	Selva	470	M	Juvenil
33	Selva	350	H	Juvenil
34	Selva	560	M	Adulto
35	Selva	330	H	Juvenil

**APÉNDICE 2.** Serovares empleados en la Prueba de Aglutinación Microscópica para el diagnóstico de Leptospirosis en ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*)

<b>Especie</b>	<b>Serogrupo</b>	<b>Serovar</b>	<b>Cepa</b>
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Ruebush*
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohemorrhagiae	RGA
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhagen	1118
<i>L. interrogans</i>	Gryptotiphossa	Gryptotiphossa	Moskva V
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Bratislava
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjo
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. borgepetersenii</i>	Ballum	Ballum	Mus 127*
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolfi	3705
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman*
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Mankarso	Mankarso*
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami
<i>L. interrogans</i>	Panama	Panama	CZ214K*
<i>L. santarosai</i>	Mini	Georgia	Lt 117
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. santarosai</i>	Pyrogenes	Alexi	Hs 616
<i>L. borgepetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi (hyos)	Perepelicyn
<i>L. kischneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3222C
<i>L. weilli</i>	Celledoni	USA REF Celledoni	Celledoni
		FRENCH STRAIN Parental	

**APÉNDICE 3.** Protocolo de la Prueba de Microaglutinación (MAT) en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria – UNMSM

Objetivo:

- Determinar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira sp.* a través de la cuantificación de las aglutinaciones observadas en microscopía de campo oscuro.

Materiales:

- Placas de poliuretano con pocillos (12 x 8)
- Solución salina balanceada (PBS) ó Suero Fisiológico 5%
- Micropipetas (50 uL, 10uL)
- Pipetas Pasteur
- Tips
- Antígeno (serovares de leptospira)
- Guantes
- Láminas porta objetos
- Microscopio de campo oscuro (10x, 100x)
- Cámara de flujo laminar
- Mandil, chaquetas

Procedimiento:

**a) Tamizaje**

- En una placa de poliuretano previamente esterilizada, se coloca de forma ordenada 245 uL de la solución PBS o suero fisiológico.
- Se coloca 50uL del suero problema positivo en la segunda fila de la placa.

- Se coloca 5uL de suero problema en la primera fila, luego se homogeniza y se extraen 50uL de esta solución para ser agregado en el pocillo siguiente.
- Una vez completados los pocillos se procede a la inoculación del antígeno vivo en la cámara de flujo laminar, colocando 50uL de antígeno vivo en cada pocillo.
- La placa es colocada en la estufa a 28 - 30°C durante 2 horas.
- Pasado el tiempo de incubación se retira la placa de la estufa. Con una micropipeta, se extrae una gota (0.7uL) de la dilución de cada pocillo y se coloca en una lámina porta objeto, la cual es observada en el microscopio de campo oscuro a 10x para la lectura.
- Se determina la positividad al observarse más de un 50% de aglutinaciones por campo en cada muestra por pocillo.
- Al finalizar la lectura en el microscopio, se deben dejar las láminas porta objetos empleadas y tips empleados en la extracción de las muestras y antígenos, sumergidos en una solución desinfectante (lejía o detergente). Así mismo se debe desinfectar el ambiente usado, y el microscopio sin residuos de aceite.

## **b) Titulación**

- En la placa de poliuretano previamente esterilizada y de forma ordenada, se coloca en la primera fila 245 uL de la solución PBS o suero fisiológico. Las filas siguientes recibirán sólo 50uL del PBS o suero fisiológico.
- Se coloca 5uL del suero problema positivo en la primera fila de la placa.
- Con una micropipeta múltiple se homogeniza la primera fila de la placa, unas 10 a 15 veces.

- Se extrae 50uL de la primera fila y se deposita en la segunda fila, repitiendo la homogenización. Se extrae nuevamente de la segunda fila 50uL y se coloca en la tercera fila, repitiendo este procedimiento hasta la sexta fila. La última fila es empleada como control. Con este procedimiento se obtiene pocillos con diferentes concentraciones de suero problema (1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600).
- Una vez completados los pocillos se procede a la inoculación del antígeno vivo en la cámara de flujo laminar, colocando 50uL de antígeno vivo en cada pocillo.
- La placa es colocada en la estufa a 28 - 30°C durante 2 horas.
- Pasado el tiempo de incubación se extrae la placa de la estufa. Con una micropipeta, se extrae una gota (0.7uL) y se coloca en una lámina porta objeto, la cual es observada en el microscopio de campo oscuro a 10x para la lectura. Se observan las muestras de los pocillos correlativos, de acuerdo al orden de concentración de cada uno sobre los sueros problema, determinando la positividad al observarse más de un 50% de aglutinaciones en cada muestra por pocillo.
- Al finalizar la lectura en el microscopio, se deben dejar las láminas porta objetos leídas y tips empleados en la extracción de las muestras y antígenos, sumergidas en una solución desinfectante (lejía o detergente). Así mismo se debe desinfectar el ambiente usado y el microscopio sin residuos de aceite.

### **Observaciones**

- El número de pocillos a emplear está en función al número de serovares que serán enfrentados a la muestra problema.

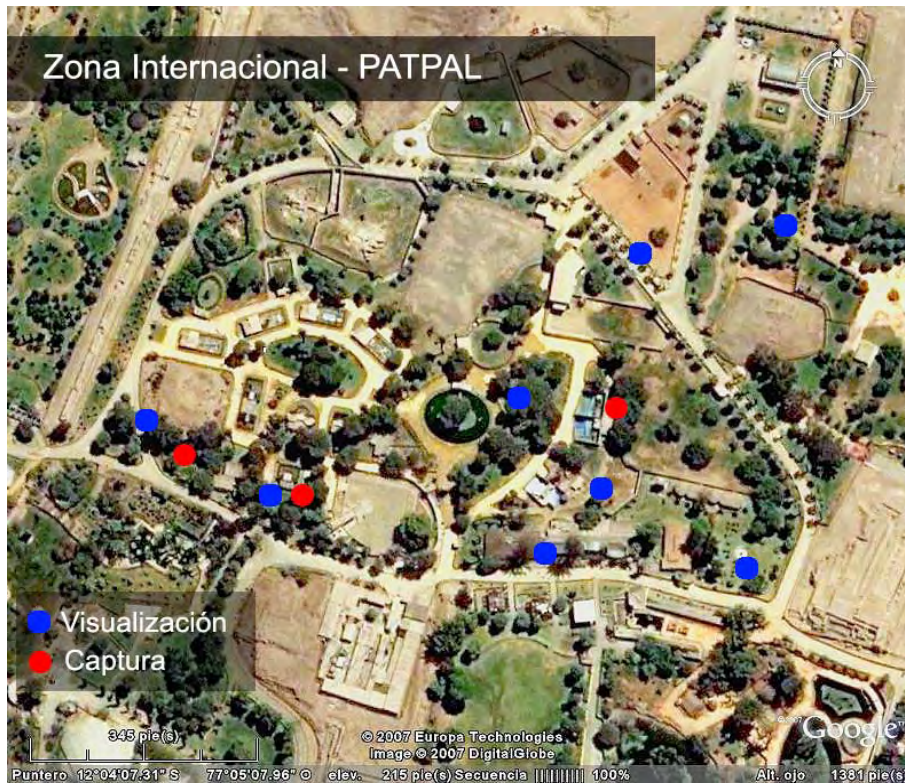
- Las placas, pipetas, tips y láminas son previamente desinfectados y esterilizados en autoclave y/o estufa.
- Cada serovar de antígeno vivo empleado en la prueba debe monitoreado previamente para determinar su viabilidad. Los antígenos son conservados en estufa y no deben estar expuestos por mucho tiempo a condiciones adversas.
- Todos los materiales empleados en el procedimiento deben ser posteriormente desinfectados.

**APÉNDICE 4.** Títulos de anticuerpos contra *Leptospira sp.* detectados en las ardillas nuca blanca (*Sciurus stramineus*) estudiadas

N°	SEROVARES			
	<i>canicola</i>	<i>icterohemorrhagiae</i>	<i>georgia</i>	<i>australis</i>
4	-	-	1/100	-
5	1/100	1/100	-	-
6	-	1/200	1/100	-
7	-	1/100	1/100	-
9	-	1/200	-	-
10	-	-	-	1/100
11	-	1/100	-	-
12	-	1/100	-	-
13	-	1/100	-	-
14	-	1/100	-	-
15	-	1/100	-	-
16	-	1/200	-	-
17	-	1/100	-	-
18	-	1/100	-	-
19	-	1/100	-	-
20	-	1/100	-	-
21	-	1/100	-	-
22	1/200	-	-	-
23	-	1/100	-	-
24	-	-	1/100	-
25	-	1/100	-	-
26	-	-	1/100	-
27	-	-	1/100	-
29	-	-	1/200	-
30	-	-	1/100	-
31	-	1/100	1/100	-
32	-	1/200	1/100	-
33	-	1/100	1/200	-
35		1/100		

## APÉNDICE 5. Áreas de captura de las ardillas nuca blanca en el zoológico

### MAPA 1: Zona Internacional



### MAPA 2: Zona Costa





### MAPA 3: Zona Sierra y Selva

Nota: Los puntos azules indican áreas de visualización frecuente de ardillas nuca blanca. Los puntos rojos indican los puntos de trampeo. (Imágenes Google Earth). El mapa (03) incluye el área de estacionamiento y camping del zoológico.



**APÉNDICE 6.** Identificación de hospedadores silvestres según la literatura  
encontrada

<b>Nombre común</b>	<b>Nombre Científico</b>	<b>Serovar</b>	<b>Lugar</b>	<b>Referencia</b>	<b>Año</b>	<b>Observación</b>
Zorrillos listados	<i>Mephitis mephitis</i>	pomona, ballum	Georgia, USA	McKeever	1958	Aislamiento
Zorrillos listados	<i>Mephitis mephitis</i>	Mini georgia, atlantae	USA	Galton et al	1957, 1960	Aislamiento
Zorrillos listados	<i>Mephitis mephitis</i>	pomona, tarassovi, ballum, canicola, icterohaemorrhagiae, mini georgia, grippotyphosa, australis.	Lousiana, USA	Roth et al.	1963	Aislamiento
Zorrillos listados	<i>Mephitis mephitis</i>	pomona	Canadá	Abdulla et al.	1962	Reporte
Zorrillos	<i>Spilogale putorius</i>	ballum	Georgia	McKeever et al.	1958	Aislamiento
Mapaches	<i>Procyon lotor</i>	mini georgia, autumnalis, paidjan, canicola, bakeri, grippotyphosa.	Lousiana, USA	Roth et al.	1964	¿Cultivo?
Mapaches	<i>Procyon lotor</i>	icterohaemorrhagiae, pomona	Pennsylvania, USA	Clark et al.	1961	
Mapaches	<i>Procyon lotor</i>	pomona	Canadá	Abdulla et al.	1962	
Mapaches	<i>Procyon lotor</i>	ballum, pomona, australis, grippotyphosa, autumnalis, hebdomadis, mini georgia, tarassovi	Georgia, USA	Gorman, et al. McKeever et al.	1962 1958	
Mapaches	<i>Procyon lotor</i>	grippytyphosa	Georgia, USA	Shotts et al.	1975	
Mapaches	<i>Procyon lotor</i>	grippytyphosa, australis	North Carolina, USA	Galton et al.	1959	Aislamiento
Zarigüeyas	<i>Didelphis marsupialis</i>	pomona, autumnalis, ballum, paidjan, grippytyphosa, mini georgia, icterohaemorrhagiae, tarassovi, atchafalaya	USA	Roth et al.	1964	Se evaluaron 500 zarigüeyas. Cultivo
Zarigüeyas	<i>Didelphis marsupialis</i>	pomona, autumnalis, ballum, atlantae, grippytyphosa, mini georgia, icterohaemorrhagiae, tarassovi, atchafalaya	Georgia, USA	Gorman, et al. McKeever et al.	1962 1958	

Zarigueyas	<i>Didelphis marsupialis</i>	ballum	Georgia, USA	Shotts et al.	1975	
Zarigueyas	<i>Didelphis marsupialis</i>	ballum	Virginia, USA	Yager et al.	1953	Un ejemplar
Zarigueyas	<i>Didelphis marsupialis</i>	icterohaemorrhagiae	Marylan, USA	Evans et al.	1962	
Zarigueyas	<i>Didelphis marsupialis</i>	ballum, pomona	Pennsylvania, USA	Clark et al.	1961	Aislamiento
Ratas noruegas	<i>Rattus norvegicus</i>	icterohaemorrhagiae	Baltimore, USA	Noguchi et al.	1917	
Ratas noruegas	<i>Rattus norvegicus</i>	icterohaemorrhagiae	Lousiana, USA	Roth et al.	1967	
Ratas noruegas	<i>Rattus norvegicus</i>	icterohaemorrhagiae	Pennsylvania, USA	Clarck et al.	1961	
Rata de algodonaes	<i>Sigmodon hipidus</i>	ballum	Georgia, USA	Brown and Gorman	1960	
Rata	<i>Rattus rattus</i>	ballum	Georgia, USA	Brown and Gorman	1960	
Ratas noruegas	<i>Rattus norvegicus</i>	Icterohaemorrhagiae, ballum	Canadá Hawaii, USA	McKiel Minette	1961 1964	
Ratón doméstico	<i>Mus musculus</i>	ballum	USA	Clark et al Gorman	1961 1962	
Ratón doméstico	<i>Mus musculus</i>	Icterohaemorrhagiae, ballum	Pennsylvania, Hawaii USA	Minnette	1964	Aislamiento
Viejo ratón de campo	<i>Peromyscus polionatus</i>	ballum	Georgia, USA	Gorman	1962	
Ratón algodonero	<i>Peromyscus gpssypinus</i>	ballum	Georgia, USA	Shotts et al	1975	
Ratas almizcleras	<i>Ondatra zibethica</i>	icterohaemorrhagiae	Pennsylvania, USA	Clark et al	1961	Aislamiento
Ratas almizcleras	<i>Ondatra zibethica</i>	grippotyphosa	USA?	Sulzer	1975	
Ratón de campo occidental	<i>Reithrodontomys megalotis</i>	ballum, grippotyphosa	Pennsylvania, USA	Hubbert, Rossen	1966	
Nutria	<i>Myocastor coypus</i>	paidjan, zanoi, myocastoris, orleans, icterohaemorrhagiae, miembros del serogrupo australis	Louisiana, USA	Roth et al.	1964	Se evaluaron 150 nutrias, 12 fueron positivas
Armadillo de nueve bandas	<i>Dasypus novencinctus</i>	canicola, pomona, lousiana, miembros del serogrupo australis	Louisiana, USA	Roth et al.	1964	Se evaluaron 200 armadillos

Castor	<i>Castor canadensis</i>	Miembros del serogrupo australis	Louisiana, USA	Roth et al.	1964	
Zorro gris	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	ballum	Georgia, USA	McKeever et al	1958	Aislamiento
Zorro gris	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	australis	North Carolina, USA.	Galton et al	1959	Aislamiento
Zorro gris	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	icterohaemorrhagiae	Pennsylvania, USA	Clark et al	1961	
Zorro rojo	<i>Vulpes fulva</i>	grippytyphosa	North Carolina, USA	Galton et al	1959	
Zorro rojo	<i>Vulpes fulva</i>	pomona, ballum, icterohaemorrhagiae	Pennsylvania, USA	Clark et al	1961	
Marmota	<i>Marmota monax</i>	pomona, icterohaemorrhagiae	Pennsylvania, USA	Clark et al	1960	
Marmota	<i>Marmota monax</i>	pomona	Canadá	Abdulla et al	1962	
Ratón campestre de pradera	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	ballum	USA?	Clark et al	1961	
Musarañas	<i>Blarina brevicauda brevicauda</i>	ballum	USA?	Clark et al	1962	
Lince	<i>Lynx rufus</i>	pomona, ballum, grippytyphosa	Georgia, USA	McKeever et al Shorts et al	1958 1975	Infección artificial
Lince	<i>Lynx rufus</i>	pomona	Lousiana, USA	Roth	1964	Reporte
Conejo cola de algodón	<i>Silvilagus floridanus</i>	ballum	Georgia, USA	McKeever	1958	Infección artificial
Conejo cola de algodón	<i>Silvilagus floridanus</i>	ballum	Lousiana, USA	Roth	1964	Infección artificial
Conejo cola de algodón	<i>Silvilagus floridanus</i>	pomona	Canadá	Galton	1966	Infección artificial
Conejo cola de algodón	<i>Silvilagus floridanus</i>	grippytyphosa	Mississippi, USA	Shotts et al	1971	Reservorio
Conejo de pantanos	<i>Silvilagus aquaticus</i>	grippytyphosa	Mississippi, USA	Shotts et al	1971	Reservorio
Ardilla negra	<i>Sciurus niger</i>	grippytyphosa	Minessota	Diesch et al	1968	Infección artificial
Ardilla negra	<i>Sciurus niger</i>	grippytyphosa	Georgia, USA	Shotts et al	1975	
Ardilla gris	<i>Sciurus</i>	ballum	Georgia, USA	Shotts et al	1975	

	<i>carolinensis</i>					
Mangosta	<i>Herpestes auropunctatus</i>	Icterohaemorrhagiae, canicola, sejroe	Hawaii, USA	Minette	1964	Fue infectada
Venados cola blanca	<i>Odocoileus virginianus</i>	pomona	Illinois, USA	Ferris et al	1961	Muestreo serológico
Venados cola blanca	<i>Odocoileus virginianus</i>	pomona	Minnesota	Wedman, Driver	1957	Muestreo serológico
Venados cola blanca	<i>Odocoileus virginianus</i>	pomona	Wisconsin, USA	Trainer, Hanson	1960	Se evaluaron a 1256 venados
Venados cola blanca	<i>Odocoileus virginianus</i>	grippotyphosa	Illinois, USA	Ferris et al	1961	
Venados cola blanca	<i>Odocoileus virginianus</i>	pomona	New York	Reilly	1962	Aislado de un venado naturalmente infectado
Venados cola blanca	<i>Odocoileus virginianus</i>	pomona	Pennsylvania, USA	Clark et al	1962	Aislamientos
Venados cola blanca	<i>Odocoileus virginianus</i>	pomona	Louisiana, USA	Roth et al	1964	Aislamientos
Venados cola blanca	<i>Odocoileus virginianus</i>	pomona	Canadá	Abdulla et al	1962	Aislamientos
Venados cola blanca	<i>Odocoileus virginianus</i>	zanoni zanoni	Louisiana, USA	Roth et al	1967	Aislamiento
Serpiente nariz de gancho	<i>Henerodon platyrhimus</i>	ballum	Illinois, USA	Ferris et al.	1961	Aislamiento
Tortuga	<i>Pseudemus spp.</i>	tarassovi	Georgia, USA	Glosser, Winkler, et al	1974	Aislamiento
Rana	<i>Rana pipiens</i>	ranarum	Iowa	Babudieri	1972	Aislamiento
Goldfish	<i>Carassius auratus</i>	pomona, canicola	-	-	1962	Infección artificial
León marino californiano	<i>Zalophus californsonus</i>	pomona	-	McIhatten et al	1972	Aislamiento

Tomado de: Shotts E. 1981. *Infectious diseases of wild mammals*