

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN GENERAL DE CIENCIA ANIMAL



LEPTOSPIROSIS CANINA

MONOGRAFIA

POR

JULIO CESAR MAR ESQUIVEZ

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Mayo 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN GENERAL DE CIENCIA ANIMAL

LEPTOSPIROSIS CANINA

MONOGRAFIA
POR

JULIO CESAR MAR ESQUIVEZ

M.V.Z. CUAHUTEMOC FELIX ZORRILLA
ASESOR PRINCIPAL

M.C. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE
CIENCIA ANIMAL

Torreón, Coahuila, México

Mayo, 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN GENERAL DE CIENCIA ANIMAL

LEPTOSPIROSIS CANINA

MONOGRAFIA ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL
COMITÉ PARTICULAR Y APROBADA COMO REQUICITO
PARCIAL PAR OBTENER

EL TITULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

M.V.Z. CUAHUTEMOC FELIX ZORRILLA
PRESIDENTE DEL JURADO

MC. JOSE DE JESUS QUEZADA AGUIRRE
VOCAL

IZ. JORGE HORACIO BORUNDA RAMOS
VOCAL

IZ. HECTOR MANUEL ESTRADA FLORES
VOCAL SUPLENTE

Torreón, Coahuila, México

Mayo, 2008

AGRADECIMIENTOS

Principal mente un agradecimiento a mi profesor, asesor y amigo MVZ. Cuauhtemoc Félix Zorrilla, por todo su apoyo no solamente en esta etapa final si no en toda la carrera, y por el apoyo incondicional en la elaboración de este documento.

A el MVZ José de Jesús Quesada Aguirre también por su apoyo en la revisión y aprobación de este documento, y por su gran calidad de persona y sobre todo el apoyo en toda la carrera.

IZ. Jorge Horacio Borunda Ramos por participar en la terminación y aprobación de la monografía y apoyo brindado en las diferentes etapas de la carrera.

IZ. Héctor Manuel Estrada Flores por aceptar formar parte de este comité de grandes profesores y amigos que me supervisaron durante la elaboración de este documento y sobre todo que pasaran a ser parte importante en mi vida profesional porque por su apoyo se lograron mis metas.

A mi gran institución, mi Alma Terra Mater que fue y seguirá siendo parte de mi vida pero por haberme brindado un alojó durante este periodo de 5 años, y sobre todo la gran enseñanza que me brindo tanto como profesional como personal.

DEDICATORIAS

Principal mente a mi dios por dejarme vivir esta etapa tan hermosa que fue la Universidad por, por brindarme salud, armonía y sobre todo por ayudarme a tener o obtener un poco de nobleza y paciencia para lograr una etapa mas de mi vida.

A MIS PADRES. Humberto y Guadalupe por haberme dado la vida, vida que a su lado ha sido hermosa, por todo su apoyo desde que nací un poco complicado para ellos dado a los errores que e cometido, pero sobre todo el apoyo incondicional en esta etapa por cierto la mas importante para mi. Padres creo que las letras sobran pero en dos palabras les describo todo lo que creo y siento "LOS AMO".

A MIS HERMANOS. Carlos, Viridiana y Vladimir, sobra decir que la vida a su lado no la cambiaria por nada, les agradezco que pese a mis errores siempre han estado a mi lado y sobre todo con migo, hermanos les puedo decir que son un ejemplo para mi y gracias a ese ejemplo pude lograrlo, los amo y son lo mas importante en mi vida.

A MIS ABUELOS. En esta etapa tan importante asi como hay alegrías también hay tristezas unas de ellas y las mas grande fue la muerte de mis abuelitos: Mateo y Juan que en paz descansen que ahora con la cara mirando hacia el cielo les puedo gritar lo logre y gracias por la enseñanza y amor que me brindaron a mi y toda mi familia.

A MIS CHAPARRITOS. Carlos Axel y José Antonio por que llegaron en el momento mas indicado y sobre todo que llegaron a cambiar la vida de todo enanitos los amo y gracias por venir a este mundo y sobre todo en la familia Mar Esquivéz.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS. A todos mis compañeros por haberme aguantado tanto tiempo, mis amigos de San Luis, Rosendo (chendo) porque siempre a pesar de todo seguimos y seguiremos siendo amigos, a miguel quien también siempre a estado ahí apoyando y escuchando y sobre todo brindándome su amistad a ellos dos le puedo decir lo logramos amigos y ahora adelante, a mis amigos de la universidad, Jehová Sandoval quien a pesar de todo y como fuera siempre me apoyo y guió para que pudiera llegar hasta donde estoy, a mi amigo Rubén Herrera quien formo parte de esto llego después pero desde que llego fue una excelente persona y amigo, a mi amigo y entrenador Dionisio.

Y por supuesto no podía dejar de dedicar a mis amigos Homero y Ana, por su gran apoyo, Homero eres una magnifica persona y no puedo dejar de agradecerte porque sin tu apoyo en los momentos mas difíciles me supiste hablar y orientar sin tu apoyo no estuviera en donde estoy, gracias amigos los quiero.

A todos mis profesores que gracias a que nos trasmitieron un poquito de su conocimiento y ayudaron a formarnos como profesionistas.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
1. HISTORIA	2,3
2. SINONIMIAS	3,4
3. IMPORTANCIA ECONOMICA Y SANITARIA	4
4. TAXONOMIA	5
5. CLASIFICACION TAXONOMICA Y ESPECIES DE LEPTOSPIRA	5
6. CLASIFICACION SEROLOGICA	6
7. ETIOLOGÍA	6,7,8,9
8. RESISTENCIA DEL AGENTE ETIOLÓGICO	9,10,11
9. EPIDEMIOLOGIA	11
9.1 Hospedero De Mantenimiento	12,13
9.2 Hospederos Accidentales	13
10. FUENTES DE INFECCIÓN	14
10.1 Agua	15
10.2 Orina	15,16
10.3 Leche	16
10.4 Tejido Animal	16
10.5 Descargas Posparto	16
10.6 saliva	17
11. FACTORES ASOCIADOS A LA INFECCION	17
11.1. Dependientes del medio	17
A) Resistencia a Condiciones Medioambientales	17
B) Capacidad Infectante	18
11.2. DEPENDIENTES DEL HOSPEDERO	18
A) Edad	18
B) Gestación	18
C) Estado Inmunitario	18
D) Factores Genéticos	19
12. DEPENDIENTES DEL MEDIO	19
12.1. Infecciones Concurrentes	19
12.2. Vía De Transmisión	20
12.2.1. Horizontal Directa	20
a) Contacto Directo	21,22
b) Núcleos Goticulares	22

	Pág.
12.2.2. Horizontal Indirecta	22
a) Fomites	22
b) Vectores	23
12.2.3. Vertical	23
a) Transplacentaria	23
b) Galactofora	23
c) Vía Oral	23
13. SINTOMATOLOGIA	23,24
14. SIGNOS CLINICOS	24,25,26,27
15. RESPUESTA INMUNE	27,28
16. DIAGNOSTICO	28
16.1 Diagnostico Epidemiológico	28,29
16.2. Diagnostico Clínico	29
16.3. Diagnostico de Laboratorio	29,30
16.3.1. Técnicas Indirectas	31
A) MAT	31,32,33
B) Pruebas de Aglutinación con Antígeno Muerto	33
C) Fijación de Complemento (FC)	33,34
D) ELISA	34
E) Aglutinación Microscópica	34
F) Aglutinación en Micro Cápsula	35
G) Hemoaglutinación Indirecta (HA)	35,36
16.3.2. Técnicas Directas	36
A) Observación al Microscopio de Campo Oscuro	36
B) Tinción Argenica	36
C) Tinción Inmunohistoquímica	37
a) Inmunofluorescencia	37
b) Inmunoperoxidasa	37
c) Marcado de Partículas de Oro	37
D) Estudio de Ácidos Nucleicos	37,38
E) Aislamiento	38
17. TRATAMIENTO Y CONTROL	38,39
18. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	40.... 49

I. INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una enfermedad infecto-contagiosa, aguda y febril, causada por una bacteria del género *Leptospira* que afecta sobre todo a los animales salvajes y domésticos, los cuales sirven como fuente de infección para el hombre, presenta una epidemiología compleja y de distribución cosmopolita, en la que varias especies, principalmente los roedores actúan como hospederos de mantenimiento de muchas serovariedades en todo el mundo, siendo al hombre y los animales de explotación económica y social hospederos accidentales.

Las prevalencias y tasas de incidencias publicadas para esta enfermedad en el mundo varían notablemente según la zona y pueden llegar a alcanzar valores elevados en tiempos de inundaciones y en los países tropicales y subtropicales.

Además, presenta un importante aspecto socio-económico y sanitario, que radica principalmente en las pérdidas económicas de carácter reproductivo y productivo en la ganadería y en el hecho de que es una zoonosis (zoonosis).

La Leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, producida por una espiroqueta de las cepas patógenas del género *Leptospira*, que afecta tanto a los animales silvestres y domésticos así como al hombre, es caracterizada por: fiebre, mialgia, procesos hemorrágicos, ictericia, nefritis, hemoglobinuria, anorexia, náuseas, cefalea, etc.

Los países tropicales y subtropicales son los más afectados pues las condiciones climáticas como: precipitación, temperatura, humedad relativa así como el pH, estructura y la composición de suelo, son más favorables a su presentación.

1. HISTORIA

La Leptospirosis es una enfermedad infecto-contagiosa de carácter zoonótico (Hutyra et al., 1973), de distribución mundial, producida por cepas patógenas del género *Leptospira*, incluida en las especies *L. interrogans* (Ruiz, 1995); las cuales poseen las mismas características morfológicas (Jubb y Kennedy, 1973) y fisiológicamente uniforme, pero que serológica y epidemiológicamente son muy diversas (Muñoz, 1999); caracterizada por un estadio septicémico y otro lesional durante el cual pueden presentarse ictericia, hemorragias, albuminuria y meningitis, etc. (Adler et al., 1982); afectando varios órganos: riñón, ojo, cerebro, el aparato reproductor grávido y no grávido de los mamíferos (Kingskote, 1985).

Las primeras informaciones sobre la enfermedad de leptospira en los animales procedían de la leptospirosis humana, datan del 1852 en que Hofer describió una enfermedad de los perros antes desconocida que llamó Tyfus Seu Febris Nervosa Canum. (Adler et al., 1982).

Keff en 1898 cambió el nombre de esta enfermedad por la enfermedad de los perros de Stuttgart (Stuttgarte Handesenchue). Sin embargo, la etiología de esta enfermedad fue aclarada en 1922 por el Checoslovaco Lukes, el cual demostró que el agente era una espiroqueta. Pero en la realidad, la primera descripción de las *Leptospiras* como agentes productores de enfermedad en los animales se realizó en 1933, cuando Klarenbeck y Schuffner demostraron que la *L. canicola* era el agente etiológico de la enfermedad Stuttgart en los perros (vander Hoeden, 1958). Michin y Azinov (1935) fueron los primeros en notificar la afectación de leptospirosis en los bovinos en la antigua Unión de Republicas Socialistas Soviéticas (URSS), denominándola como “hemoglobulinuria infecciosa aguda”, y del agente aislado *L. icterohaemorrhagiae* bovina. Estudios posteriores apuntaron a *L. grippotyphosa* como responsable de aquella enfermedad.

Freund et al., (1941) y Jungherr, (1944) notificaron en esta misma especie tanto en Israel como en los Estados Unidos de América (E.U.A) respectivamente, quedando este último como la primera notificación en el continente Americano. Mientras el primer reporte en Gran Bretaña fue a cargo

de (Field y Wellers, 1950). Smith y Perry, (1952) divulgaron los primeros casos en Canadá.

Ramírez (1971) hace la primera notificación de la existencia de anticuerpos específicos de valor diagnóstico de *Leptospira bovina* en Cuba.

2. SINONIMIAS

La Leptospirosis se conoce por otros nombres tales como:

Enfermedad de Weil (*L. icterohaemorrhagiae*).

Fiebre de los arrozales (*L. bataviae*).

Enfermedad de los henequeneros, enfermedad de los porqueros (*L. pomona*).

Enfermedad de los manipuladores de pescados, ictericia enzootica, enfermedad de Stuttgart (*L. canicola* en Europa).

Ictericia hemorrágica, ictericia infecciosa, agua roja, fiebre de los 7 días (*L. hebdomadis* en Japón).

Fiebre otoñal japonesa (*L. autumnalis*).

Fiebre de los ratones, tífus canino, fiebre de cieno, fiebre de los pantanos (*L. grippotyphosa* en los trópicos).

Fiebre del agua, fiebre de los cosechadores, fiebre de los campos, etc.

Todas estas denominaciones han sido utilizadas para describir la enfermedad producida por leptospiras según sus características epidemiológicas, clínicas, territoriales, especies afectadas, estacionalidad, etc. (González et al., 1990; Ferguson, 1993; Bofill et al., 1996; Fresno, 1996).

3. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SANITARIA

La Leptospirosis considerada la epizootia más difundida en el mundo, tiene tanto importancia económica como sanitaria (Radostits et al., 1994). La repercusión económica más importante en la explotación, es el fallo reproductivo, secuela crónica de la enfermedad en las reproductoras, que causa mortinatos, abortos o nacimientos de animales débiles, disminución de la fertilidad. Resulta difícil estimar las pérdidas por este concepto en gran parte por las dificultades inherentes al diagnóstico de la enfermedad. (Ellis, 1994; Fernández, 1999).

La Leptospirosis es una zoonosis y a los efectos sobre la producción animal, se le añade un importante aspecto sanitario donde en el ser humano está considerada una infección accidental (Sullivan, 1974; Heath y Johnson, 1994). Algunas prácticas laborales como la minería, ganadería, agricultura, deportes acuáticos, trabajadores en mataderos, veterinaria etc. Así como ciertas actividades recreativas que implican contacto con aguas posiblemente contaminados de *Leptospiras* pueden provocar enfermedad en ellos además del riesgo sanitario, hay que tener en cuenta la vertiente económica derivada de los gastos originados por el cuidado médico de los pacientes, bajas laborales, pérdida de productividad y capacidad de trabajo, vigilancia y control de los lugares de trabajo, ropas especiales de protección, seguros médicos para el personal en riesgo, evaluación de vacuna, etc. (Martínez et al., 1993; Peña, 1999).

4. TAXONOMÍA

Las *Leptospiras* pertenecen a familia *Leptospireaceae*, segunda familia del orden *Spirochaetales* (Canale-Parola, 1984; Hartskeerl et al., 2000). En la edición del “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*” 1984, se reconoce como único género dentro de la familia *Leptospireaceae* al género *Leptospira*; dentro del cual se incluyen tres especies: *Leptospira interrogans*, *Leptospira biflexa* y *Leptospira illini*, esta última considerada de “estado taxonómica incierta” aislada de un buey en Illion, E.U.A (Johnson y Faine, 1984). En la última edición del “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*” 1994, ya se recoge como género independiente el *Leptonema*, cuya especie (y única especie del género) sería *Leptonema illini*. De esta forma, la familia *Leptospireaceae* está formada por dos géneros, *Leptospira* y *Leptonema* (Hovind-Hougen, 1979; Johnson y Faine, 1984b; Holt et al., 1994). En los últimos años y gracias a la utilización de nuevas herramientas y métodos de clasificación, se han reconocido varias especies del género *Leptospira* (Holt et al., 1994).

5. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y ESPECIES DE LEPTOSPIRA.

Familia: Leptospiraceae

Genero: Leptospira

Especies: L. Biflexa.- a) L. Biflexa, b) L. Wolbachii.

L. Interrogans.- a) L. Interrogans, b) L. Borgptersenii, c) L. Kirschneri, d) L. Noguchii, e) L. Santorosai, f) L. Weillii, g) L. Alexanderi.

L. Interrogans esta dividida en 23 serogrupos y más de 202 serovariedades. (Instituto pasteur, 2000)

6. CLASIFICACIÓN SEROLÓGICA

Antes del 1987, el género *Leptospira* fue dividido en dos especies, *L. interrogans*, que incluye todas las *Leptospiras* patógenas y/o de vida parasitaria, y *L. biflexa*, especie en la que engloban todas las saprófitas aisladas del medio ambiente (Johnson, 1950; Faine y Stallman, 1982). A pesar de que esta denominación es la que ha estado utilizando durante varios años, fue admitida oficialmente en 1986, cuando *L. interrogans* fue diferenciada de *L. biflexa* (Kmety y Dikken, 1993; Levett, 2001).

7. ETIOLOGÍA

El termino “*Leptospira*” procede del griego *lepto* (fino) y *spira* (espiral). Las *Leptospiras* son espiroquetas aerobios obligados, flexibles, muy finos, helicoidalmente enrollados, y de gran movilidad, de 5 a 20 μ m de largo por 0,1 a 0,5 μ m de ancho (Faine et al, 1999), ambos extremos semicirculares de forma de gancho, aunque a veces uno de los dos extremos está doblado y el otro se mantiene recto o ambos rectos (Hoeprich, 1980; Faine y Stallman, 1982; Hartskeerl et al., 2000). Poseen un movimiento activo flexuoso de rotación, ondulatorio y translucidación que se produce en ausencia de flagelos externos y depende de dos flagelos piroplasmáticos (filamento axial), que están insertados en ambos extremos de la bacteria. Son agentes tan finos que pueden pasar filtros que retienen otras bacterias (0,1- 0,45 μ m) (Baseman, 1990; Faine, 1991). Las *Leptospiras* solo pueden ser visibles por microscopía de campo oscuro o de contraste de fase, pero no por microscopía de luz de

campo brillante. No se tiñen con facilidad con los colorantes de anilina aunque son gram negativos; mas pueden impregnarse por plata (Fontana – Tribondeau, Levatidi, Rojo Congo, Tinta China), por fluoresceína, peroxidasa conjugada más reactivos coloreados o por hibridación del ADN con reactivos coloreados biotina–avidit (DAB) (Winn, 1998).

En medio de cultivo líquido, el movimiento de las Leptospiras es de rotación rápida sobre su eje longitudinal. En medios semisólidos, el movimiento es en serpentina y horadación y en medio sólidos reptan por la superficie (Ginebra, 2001).

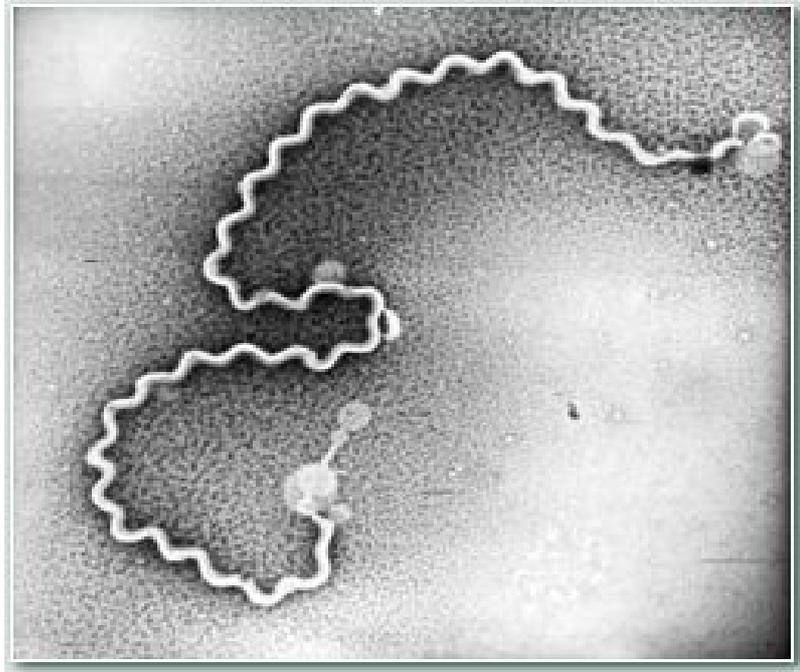


Al

microscopio electrónico se observa que están constituidas por: una membrana externa o envoltura (lípidos, proteínas) (esta envoltura externa es de gran importancia antigénica) que rodea la pared celular de peptidoglucano, dos flagelos periplasmáticos (filamentos axiales) situados entre la membrana externa y la pared celular fijos en ambos extremos de la bacteria, cuyos extremos libres se extienden hacia la parte media y no se superponen, un cilindro protoplasmático de forma helicoidal con el contenido celular-material nuclear, ribosomas, mesosomas y cuerpos de inclusión celular (Faine,1991; Haake, 2000; Harstkeerl et al., 2000).

Los cuerpos basales flagelares semejan los de las bacterias gram negativas, con la excepción de *L. illini*, una especie de ubicación incierta, los cuales son similares a los de las bacterias gram positivas. La denominación de

esta especie está basada en que el cuerpo basal del flagelo piroplasmático es similar a los de las bacterias gram positivas y a que poseen un mechón de túbulos citoplasmáticos, presentes en *Treponema* pero no en *Borrelia* (Russel et al., 1999; Ginebra, 2001).



Estos agentes poseen actividad oxidasa, catalasa, peroxidasa y esterase (Smibert, 1977; Dikken y Kmety, 1978); en condiciones de laboratorio crecen en medio cultivos simples a un pH de 7.2–7.6 y una temperatura de 15-18°C utilizando los ácido grasos de cadena larga como fuente de carbono y las sales de amonio como fuente de aminoácidos metabolizados por Beta Oxidación (Smibert, 1977). También estos medios son enriquecidos con Vit.B2 y B12 que estimulan el crecimiento (Benhnet y Plum, 1998). Además, necesitan fósforo y algunos iones metálicos durante un periodo de incubación entre 4-14 días, aunque para determinadas cepas o serovares puede ser superior a cuatro semanas (Faine y Stallman, 1982; Faine, 1991). El piruvato puede estimular el inicio del crecimiento en el caso de algunas cepas (Johnson et al., 1973; Faine, 1982).

8. RESISTENCIA DEL AGENTE ETIOLÓGICO

Las Leptospiras son microorganismos que su supervivencia depende ampliamente sobre variaciones del pH del suelo y las condiciones ambientales ya sea temperatura o humedad relativa. Particularmente, son muy sensibles a la desecación, luz solar directo, pH ácido y alcalino ya que un pH menor que 6 ó mayor que 8 tiene carácter inhibitorio sobre el microorganismo. Una temperatura $\leq 13\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $\geq 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ provoca la muerte rápidamente (Blood et al., 1982; Marga, 2004).

Además, existen distintas sustancias químicas de carácter leptospiricidas: fenol al 5%, alcohol al 70%, formol al 2%, ácido clorhídrico 2%, emulsión de creolina al 5%, sosa cáustica al 2%, durante 5 minutos, solución al 0,05% de ácido sulfúrico, en 5 minutos (Arzumania, 1970; Hellstrom y Marshall, 1978; Regalado et al., 1992).

Son muy sensibles a la solución hipertónica de sal común (2,8%), bilis, putrefacción y a la mayoría de los antibióticos in vitro o in vivo como la penicilina, estreptomycin, aureomicina y los grupos macrólidos (Thiermann, 1984).

Si la orina tiene una reacción ácida las Leptospiras presentes en ellas, pronto sucumben. Esta probabilidad es la principal razón por la cual la orina humana no disemina la infección, mientras no sea diluida, no tiene mucho riesgo (vander Hoeden, 1958). Pero las leptospiras viven en orina débilmente básica como: cerdo, vaca y equino durante diferente período, sin embargo, en orina ácida (carnívoros) mueren rápidamente (Halasa, 1967).

Para la supervivencia en el medio ambiente necesita una humedad alta del suelo, una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, con agua de un pH neutro o ligeramente alcalino y la presencia de materia orgánica (Timoney et al. 1988; Prescott, 1993). En suelo con todas estas condiciones, pueden vivir hasta 183 días y en suelo seco 30 minutos (Hellstrom y Marshall, 1978). En agua estéril pueden vivir hasta 3 meses o más, en aguas alcalinas por semanas, en lagunas varias semanas, en orina alcalina más de 16 días y en nitrógeno líquido 32 meses (Bombinbre y López, 1998). También hay reportes de sobrevivencia en leche refrigerada por los menos 3 días (Michna, 1970) y leche adulterada con agua puede sobrevivir hasta 60 días (vander Heoden, 1958). En tejidos no

contaminados y guardados a 4°C pueden sobrevivir a varias semanas, en sangre no coagulada y desfibrinada mantenida a temperatura ambiente (20–25°C) sobreviven durante semanas.

En las congelaciones rápida y a -70°C pueden mantenerse más de 5 años en cultivos, así como en sangre y tejidos contaminados (Ginebra, 2001). Se ha demostrado que las *Leptospiras* pueden sobrevivir: 9 días en músculo, 13 días en los riñones, 12 días en el hígado y 8 días en el bazo luego de la muerte del animal (Wesselinoff et al., 1962). Se han incluido las garrapatas en este campo ya que, Michna, (1970) pudo hallar que las *Leptospiras* son capaces de sobrevivir 518 días en el interior de *Ornithodoros turicata* y por lo menos 26 días en el intestino de moscas no hematófagos.

Las *Leptospiras* son resistentes al ácido nalidíxico, propiedad que puede utilizarse en la elaboración de medios de crecimiento para controlar la proliferación de otros microorganismos. Además no incorporan el 5-fluoracilo del medio, por lo que puede añadirse a los medios para el aislamiento a partir de muestras patológicas.

La tenacidad de este agente está avalada por algunas condiciones ambientales ya mencionadas.

Cuba, siendo un país subtropical no es excepción ya que (Cabezas et al., 1981) pudieron demostrar que la *L. canicola* superan los 10 días de supervivencia en orina de perros y aguas contaminadas, mientras en aguas naturales es superior a 20 días.

9. EPIDEMIOLOGÍA

La Leptospirosis es considerada la zoonosis de gran distribución mundial (WHO, 1999). El estudio de la epidemiología es complejo, debido al gran número de factores que influyen en su presentación, lo cual dificulta la extra población entre las diferentes regiones geográficas y obliga el conocimiento individualizado de cada continente, país, región o zona. Las distintas cepas patógenas de *Leptospira* pueden afectar potencialmente a los mamíferos, donde algunos actuarán como hospederos de mantenimiento o accidental en función del serovar considerado.



9.1 Hospedero De Mantenimiento

Es aquel que asegura la perpetuación de una población determinada de parásitos, sin la intervención de ningún hospedero accidental. Por lo tanto, la población de mantenimiento será aquella especie animal que actúa como un reservorio continuo de un serovar, en un ecosistema determinado. Una o varias especies de mamíferos domésticos o salvajes actúan de hospederos de mantenimiento de cada serovar o serogrupo de *Leptospira* patógena, donde una especie animal puede ser reservorio de varios serovares y diferentes especies animales serlo de un mismo serovar (Trap, 1988).



La complejidad de la epidemiología de la Leptospirosis es basada sobre el gran número de especies de diversas familias de mamíferos (roedores, carnívoros, marsupiales, etc.), que tienen la capacidad de mantener una amplia variedad de serovares (Michna, 1970). Los hospederos de mantenimiento se caracterizan por los siguientes elementos:

Gran receptividad a la infección por el serovar frente al que mantiene como hospederos (dosis infectiva es menor)

Relativa baja patogenicidad del microorganismo en el hospedero.

Presencia de infección renal con leptospiruria prolongada.

Infección crónica

Transmisión eficaz de la infección a los animales de la misma especie por contacto directo.

En algunos hospederos, se mantiene la *Leptospira* en el tracto genital. (Timoney et al., 1988; Prescott, 1993)

La transmisión de la infección entre hospederos de mantenimiento se realiza independientemente de las condiciones climáticas y ambientales. Sin embargo, en el caso de la transmisión entre hospederos de mantenimiento y accidental o entre accidentales hace necesario la supervivencia del agente en el medio ambiente para poder efectuar la infección (Prescott, 1993; Ellis, 1994).

9.2 Hospederos Accidentales

Cualquier mamífero puede ser, potencialmente, hospedero accidental de las Leptospiras (Thiermann, 1984; Heath y Johnson, 1994). Las características de mayor importancia de un hospedero accidental durante la infección de leptospira son:

La transmisión es intraespecie y esporádica

Signos de forma aguda grave (hepatitis, crisis hemolítica)

Duración de la leptospiruria es apenas semanas

Muestra para el diagnóstico es el animal enfermo

Bajo porcentaje de animales seropositivos

10. FUENTES DE INFECCIÓN



La principal fuente de contagio para el hombre constituye, la orina de animales enfermos, reservorios naturales así como el contacto directo con estos animales. También las aguas contaminadas, leche cruda, descarga vaginal, feto de animales infectados, etc. La infección en granjeros, veterinarios, trabajadores de mataderos, médicos de inspección de carne, trabajadores de control de roedores (Terry et al., 2000)



Para los perros, constituye la orina de animales infectados, asintomáticos y portadores; también el agua, leche, forrajes, pastos, tejidos

de animales, descargas posparto, saliva, semen, instrumentos quirúrgicos así como vectores siendo los roedores (ratas y ratones) los más importantes por su condición de reservorio natural (vander Hoeden, 1958).

10.1 Agua

Para que ocurra la infección en el medio, las *Leptospiras* necesitan una supervivencia en este medio primero, la cual tiene una vinculación tremenda con la humedad relativa alta y la temperatura a su punto óptimo en el lugar de aparición.

La temperatura del agua tiene un efecto beneficioso, ya sea baja o alta. Las bajas disminuyen la multiplicación de los microorganismos, pero el tiempo de supervivencia aumenta y las altas temperaturas favorecen la multiplicación, pero con menos tiempo de supervivencia. Esto permite que las *Leptospiras* puedan sobrevivir y mantener sus capacidades infectantes en el agua durante 22 días y en el barro 5–6 días (vander Hoeden, 1958).

Como las infecciones por este agente ocurren principalmente en zonas con abundante cantidad de agua; en áreas pantanosas o de campo anegado, los brotes se frecuentan en épocas de lluvia y en climas templados (Prescott, 1993). A pesar de todo esto, no todas las aguas son favorables para la supervivencia de las *Leptospiras*, ya que éstas también se ve afectadas por el pH y la salinidad (vander Hoeden, 1958).

9.2 Orina

Muchas infecciones en última instancia se deben a la contaminación con la orina de los animales enfermos, portadores o reservorios; siendo el pH el factor determinante de la supervivencia de las *Leptospiras* en la orina (Michna, 1970). Ellas no pueden sobrevivir en pH ácido, por eso, algunos autores plantean que la orina del hombre y la de los ratones y ratas no son fuentes de excelencia para la infección al no ser que sean diluida por agua (van der Hoeden, 1958). La orina de los bovinos se considera como la de mayor excelencia para una fuente de infección ya que su orina es de pH alcalino lo que favorece la supervivencia del germen y en 1 ml de orina puede contener hasta 100 millones de microorganismos de *Leptospira* (Gillespie y Ryno, 1963). Además, la orina de muchos animales presenta aglutininas y lisinas

específicas, cuya presencia causan una disminución en el tiempo y del número de microorganismos (Ellis, 1994).

9.3 Leche

Los animales infectados, muchos eliminan *Leptospiras* a través de la leche (Thiermann, 1984; Songer y Thiermann, 1988; Prescott, 1993; Guijarro y Calvo, 1999). Debido a la presencia de sustancias antimicrobianas, la supervivencia en la leche cruda es muy corta (Amatredjo y Campbell, 1975). La infección humana por el consumo de la leche cruda de animales infectados y/o convalecientes hasta tres días después del ordeño ha sido notificada (Michna, 1970; Skillbeck y Millar, 1986; Levine, 1989).

9.4 Tejido Animal

El tiempo de supervivencia de las *Leptospiras* en los tejidos es dependiente del pH posmortem y el efecto antagónico que supone la contaminación con otras bacterias. Lo que avala la capacidad infectante de los tejidos del animal principalmente en los mataderos y al parto (Michna, 1970; Timoney et al., 1988).

9.5 Descargas Posparto

Ellis (1983) demostró que las descargas posabortos pueden mantener sus capacidades infectantes pasado 8 días de éste, mientras Guijarro y Calvo, (1999) diagnosticaron la posibilidad de infección por contacto con las descargas uterinas posparto y posabortos.

9.6 Saliva

Desde que fue comprobada la infección en el humano tras mordeduras de animales como la rata o el perro, la saliva ha sido considerada como posible fuente de infección. También se sospecha los lamidos de los perros a los niños, con la lengua contamina mecánicamente, podría ser una forma más (vander Hoeden, 1958).

10. FACTORES ASOCIADOS A LA INFECCIÓN

10.1. DEPENDIENTES DEL AGENTE ETIOLÓGICO

A. Resistencia a condiciones medioambientales:

La supervivencia del agente depende de la existencia de una humedad relativa alta, temperatura óptima entre 24-25 °C (Grell, et al., 1971), pH neutro o ligeramente alcalino y presencia de materia orgánica (van der Hoeden, 1958; Michna, 1970; Thiermann, 1984; Timoney et al., 1988; Prescott, 1993). Siendo estas condiciones indispensables para la existencia de la infección en una región geográfica. Por ello, las áreas con lagunas, riachuelos (bebaderos en general) donde se congregan un gran número de animales, son las que más frecuentemente están implicadas en los focos de Leptospirosis (Thiermann, 1984; Ellis, 1994). En este sentido, existen diferencias entre serogrupos o serovares como Pomona que es más capaz de sobrevivir mejor en zonas áridas (Elder et al., 1986).

Estos factores ambientales propicia la existencia de una cierta estacionalidad en la presencia de la enfermedad, siendo más frecuente en otoño en países templados y en invierno en los países tropicales y subtropicales; ambas épocas de lluvias (Sullivan, 1974; Thiermann, 1984; Carrol y Campbell, 1987; Millar et al., 1991; Prescott, 1993).

B. Capacidad infectante:

Los estudios han demostrado que la capacidad infectante y la patogenicidad varían en función del serogrupo o serovar en cuestión (vander Hoeden, 1958)

10.2. DEPENDIENTE DEL HOSPEDERO

A). Edad:

Los estudios realizado por Ellis y Michna, (1976) revelaron un 40 % de seropositividad con anticuerpos leptospirales en cachorros hasta un año de edad y 72 % en los adultos de hasta tres años de edad, donde ésta ha sido relacionada con el estado de portador renal en la última; mientras los animales pequeños se caracterizan por eliminar mayor cantidad de Leptospiras en su orina. En perros adultos, la morbilidad se calcula hasta 75% en los adultos y hasta 100% en los cachorros, donde en este último la letalidad es de 5 % (Fernández et al., 1991).

B). Gestación:

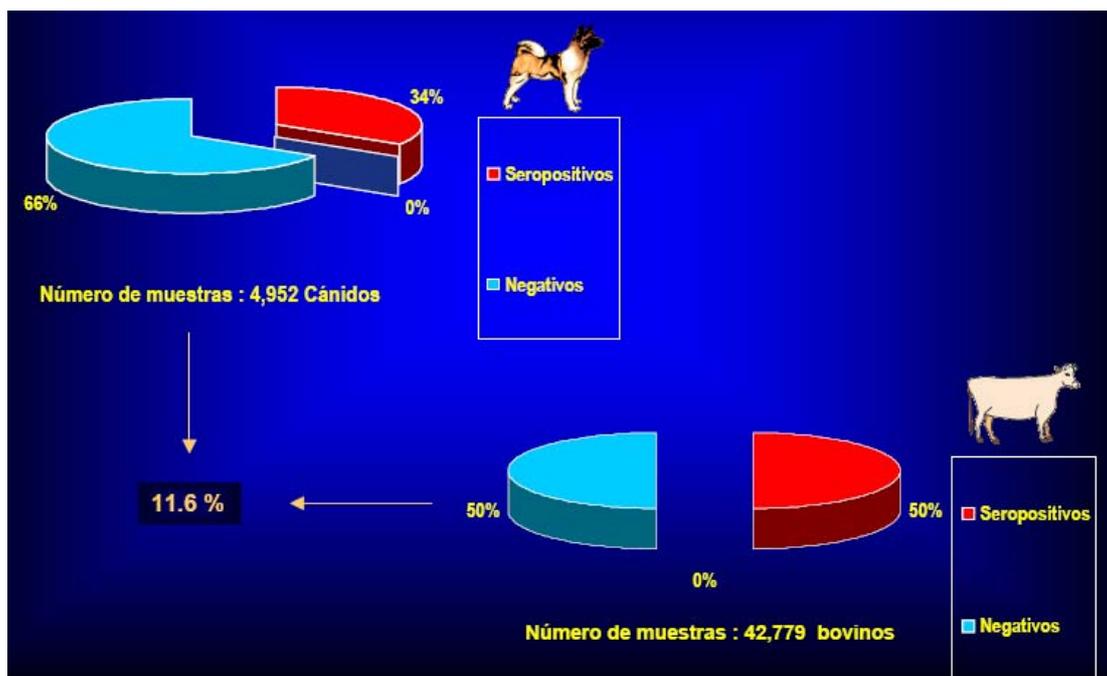
Las publicaciones disponible demuestra que el aborto por Leptospirosis se produce principalmente en los últimos estadios de la gestación, además, se supone que la infección parece producirse varias semanas antes, ya que el período de incubación en los casos de abortos suele ser largo, además el aborto casi siempre en la mayoría de las especies es provocado por serovares accidentales. (Ellis y Michna, 1977; Ellis, 1983)

C). Estado inmunitario:

En sentido general, un animal expuesto previamente, es refractario a la reinfección de este mismo serovar aunque los niveles de anticuerpos en sangre hayan bajado (Ellis, 1983). También tiene relación con el nivel de inmunoglobulina (IgA e IgG) ya que aumento de estos en la orina hace disminuir la cantidad de Leptospira que se elimina en ella (Leonard, et al., 1993).

D). Factores genéticos:

Van der Hoeden, (1958) plantea que algunas cepas de ratones parecen tener más resistencia a la infección siendo la letalidad baja en este grupo y la protección que se desarrolla es más duradera. También esta conclusión fue hecha en terneros de diferentes grupos donde algunos mostraron signos benignos transitorios mientras hubo letalidad en los otros.



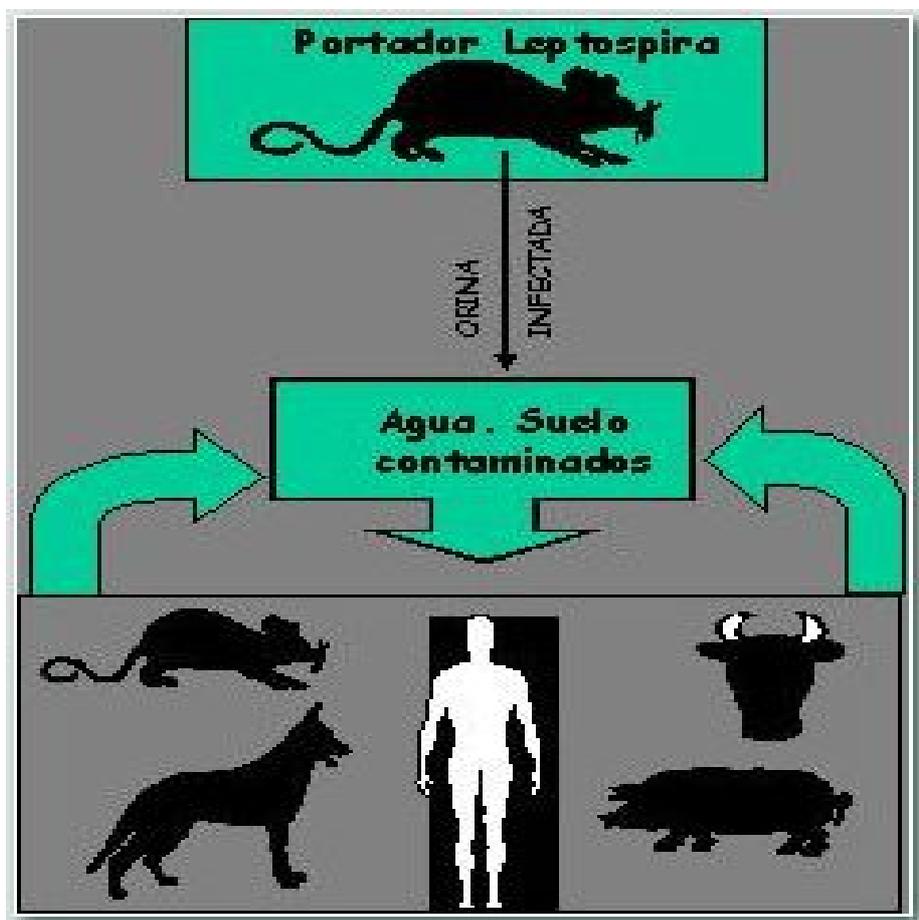
11. DEPENDIENTES DEL MEDIO.

11.1 Infecciones Concurrentes.

Ha quedado demostrado que después de una infección cualquiera, aumenta la receptividad de estos animales en contraer al leptospirosis, (Van der Hoeden, 1958).

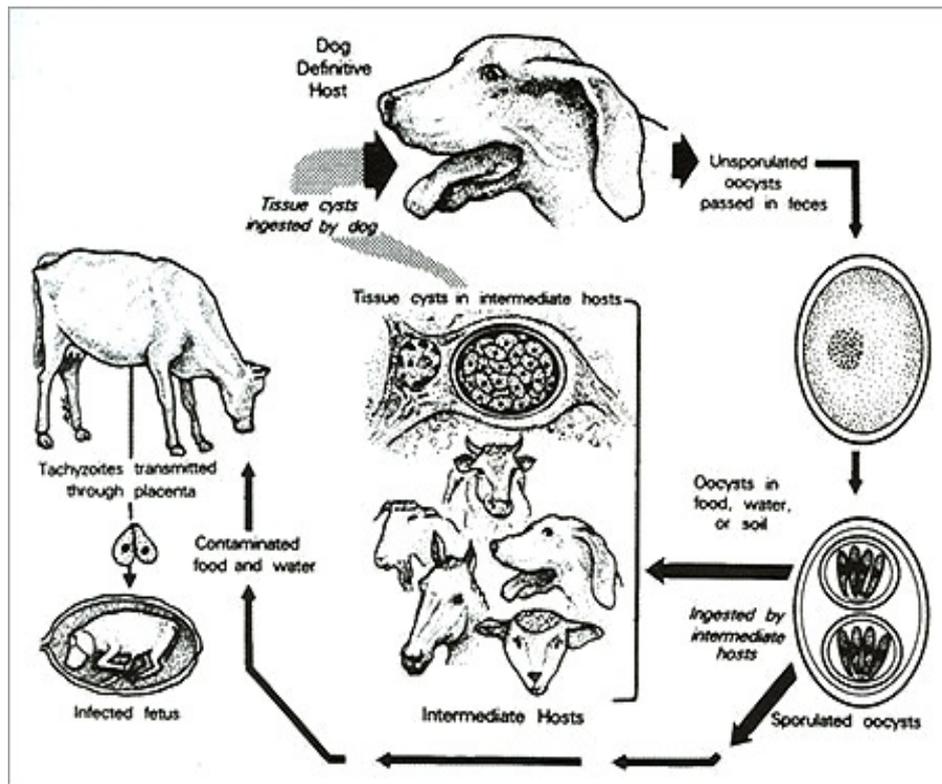
11.2 Vías De Transmisión

Las principales vías de transmisión se clasifican en: Directa e Indirecta (Ingraham e Ingraham 1998).



11.2.1 Horizontal directa

Esta forma de transmisión es la más frecuente en los casos de serovares adoptados (Ellis, 1994)



a) Contacto directo.

Esta vía es la más estudiada además de tener diversas formas. La forma venérea fue tomada en consideración después que fue demostrada la presencia de *Leptospira* en el semen de un toro (van der Hoeden. 1958). Se considera fundamental en algunas especies cuyo hábitat se encuentran en áreas de condiciones climáticas favorables o de densidad poblacional desfavorables para la transmisión de la enfermedad de otra manera como ocurre con la musaraña común en zonas de Polonia o Rusia, donde se han observados varia epizootias de Leptospirosis en estos animales; asociadas a las épocas más secas del año, que por lo general, coincide con la época de la reproducción (Little , 1986). En humanos se diagnosticó la infección de una mujer luego de contacto sexual con su pareja durante la fase de leptospiruria (van der Hoeden, 1958). Además de la venérea, la costumbre de los bovinos y perros de lamer los genitales y/o otras áreas corporales de sus compañeros, puede permitir también la transmisión de la infección (Amatredjo y Campbell, 1975).

b) Núcleos goticulares

Tienen importancia ya que las gotas de orina dispersan a varios metros del animal que orina (Michna, 1970; Amatrđjo y Campbell, 1975), pudiendo penetrar las Leptospiras procedentes de animales con leptospiuria, tanto por inhalación como por vía conjuntival (Amatedjo y Campbell, 1975; Thiermann y Haudsaker, 1985; Vanasco y Sequeiro, 2000).

11.2.2 Horizontal Indirecta

Está desempeña un papel fundamental en las infecciones accidentales ya que se produce tras la exposición al ambiente contaminado con material infectante (Ellis, 1994)

a) Fomites

El agua, alimentos, pastos y suelos contaminados pueden facilitar el contacto entre el animal-humano y el agente. La forma importante y más frecuente para la infección humana y animal es el contacto de la piel o las mucosas con aguas o barro contaminados con orina (Michna, 1970; Amatrđjo y Campbell, 1975) y el contacto con órganos de animales enfermos en el matadero (Terry et al., 2000). Los pastos contaminados juegan un papel importante para la transmisión intra e inter-especie (Amatrđjo y Campbell, 1975; Jiménez et al., 1996).

b) Vectores

Diversos autores han evaluado la hipótesis de que los artrópodos podrían jugar un papel relevante en la transmisión mecánica del agente (Michna, 1970).

11.2.3 Vertical

a) Transplacentaria

El agente puede atravesar la placenta durante el período de leptospiremia tal y como se ha demostrado en el ganado bovino, el cerdo y el ser humano (Coghlam y Bain, 1969; Michna, 1970; Faine et al., 1984). Un caso especial sería la posibilidad de la infección del feto en el momento del parto, si esto no ha ocurrido anteriormente durante la gestación (Ellis et al., 1983).

b) Galactófora

Puesto que la infección pueden producir una mastitis clínica, los microorganismos presentes en la glándula mamaria podrían ser excretados con la leche e infectar al ternero por vía oral (Amatredjo y Campbell, 1975). En caso del ser humano, esta forma de transmisión es poco estudiada, pero sí hay informes al respecto (Bolin, 1989)

c) Vía oral

En humano, por la ingestión de alimentos contaminados con la orina de animales enfermos o de reservorios. Antes se consideraba como una vía importante, pero hoy se le da poco valor como forma de transmisión (Acosta et al., 1994)

12. SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas son variables, desde la ausencia total de signos clínicos hasta un síndrome icterohemorrágico casi ausente en gatos, con la instalación repentina de hemorragia con fiebre de 3-4 días seguida por rigidez y mialgia en miembros posteriores, hemorragia en la cavidad bucal con tendencia a necrosis y faringitis. En una etapa posterior puede haber gastroenteritis hemorrágica y nefritis aguda (Perdomo y Garin, 2002).

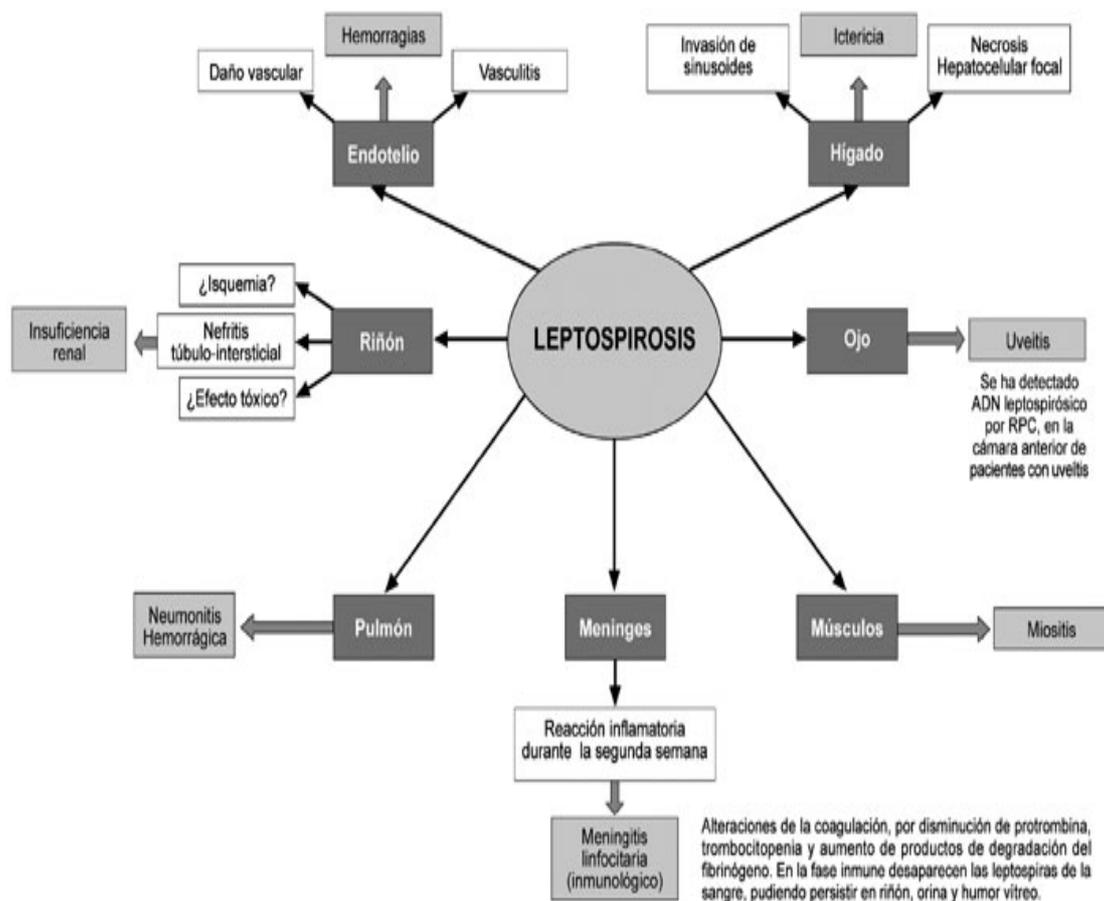
En la forma subaguda o crónica se desarrolla vómito, inapetencia, postración y anemia debido al fallo renal progresivo (Chamizo, 1998).

13. SIGNOS CLINICOS.

Durante los primeros 4 a 12 días seguido de la infección, el perro puede manifestar síntomas repentinos como fiebre alta, depresión, vómito, pérdida del apetito, conjuntivitis y dolor generalizado. Dentro de los siguientes dos días la fiebre puede bajar y puede presentarse un notable aumento de sed. Un cambio definitivo en el color de la orina a la par de ictericia o cambio en la pigmentación de la piel a amarillento puede ser la única indicación de la enfermedad. La intensidad del color de la orina puede variar de amarillo limón a un naranja oscuro, cambios que van en relación a la invasión de los tubulos

renales. La bacteria causa daño local en los vasos sanguíneos y esto resulta en hemorragias tempranas, daño renal (nefritis), hematuria (presencia de sangre en la orina), fiebre alta, vómito, anorexia y dolor debido al que se adopta usualmente una postura característica y rechazo a moverse. (Heath y Johnson, 1994).

Se puede observar un curso agudo y uno crónico de la Leptospirosis canina, pero la mayoría de las veces la enfermedad es subclínica (sin signos clínicos visibles). (Perdomo y Garin, 2002). En el curso agudo de la Leptospirosis canina, al comienzo hay una fuerte hipertermia, anorexia, vómitos y diarrea con sangre en ocasiones. La orina suele ser oscura. Puede haber dolor renal a palpación del perro acompañado de la posición característica de



encorvamiento del lomo hacia arriba (xifosis) debido al dolor. Luego pueden sumarse los signos de desorden renal con ulceraciones en la mucosa bucal y alimento ruinoso. Este curso agudo no se extiende mas de diez días y la mortalidad es del 70% al 90%. (Perdomo y Garin, 2002).

La Leptospirosis crónica presenta signos inespecíficos con deterioro general del paciente. Suele durar unas 3 a 4 semanas y culmina con la muerte del perro. (Perdomo y Garin, 2002).

En los casos donde la infección se encuentra muy avanzada, se observa también una profunda depresión, dificultad para respirar, temblores musculares y presencia de sangre en el vomito y las heces, signos que coinciden con el avance de la enfermedad hacia el hígado, el sistema gastrointestinal y otros órganos. Los síntomas siempre dependerán del tipo de serovariedad que este presente. La L.Icterohemorrágica se asocia con la infección del hígado y el sistema gastrointestinal, mientras que el fallo renal esta asociado con la serovariedad pomona. (Perdomo y Garin, 2002).

La enfermedad es casi idéntica en animales y en humanos, de manera que los síntomas son similares. La forma en que se desarrollan los síntomas depende de la especie y de la condición física en que se encuentra el animal.

En los animales la edad es muy importante de manera que los jóvenes, por poseer un sistema inmune débil y aquellos inmunosuprimidos por condiciones de transporte, hacinamiento y estrés son los más susceptibles. Aún así en adultos puede también presentarse la enfermedad.

Los animales preñados son otro grupo de importancia, debido a que el feto puede ser infectado a través de la placenta y esto lo convierte en portador capaz de diseminar la enfermedad a través de la orina o puede resultar en muerte fetal o animales que al nacimiento presentan graves daños en órganos internos. Por esto es de suma importancia que animales que van a ser preñados deben tener las vacunaciones al día, para que de esta manera se prevengan infecciones dentro del útero. (Perdomo y Garin, 2002).

14. RESPUESTA INMUNE

La mayoría de los estudios realizados se basa, únicamente, en la investigación de la inmunidad humoral (Thiermann, 1984; Heath y Johnson, 1994).

Tras la infección, inicialmente se produce una elevación de las IgM, que alcanzan niveles detectables a los pocos días de la desaparición del periodo febril que acontecen durante la fase de bacteriemia, es decir a los 2-5 días de la aparición de los signos de la enfermedad aguda. Los anticuerpos IgM dificultan la multiplicación de las leptospiras, pero no las destruyen (Heath y Johnson, 1994), disminuyen poco después de la aparición de las IgM, comienzan a detectarse las IgG específicos, que producen la lisis de las leptospiras (Heath y Johnson, 1994). Estos anticuerpos persisten durante años en el animal (Hanson, 1977; Timoney et al., 1988). Las IgM alcanzan su pico máximo a las 3- 4 semanas y las IgG a las 4- 12 semanas tras la infección (Leonard et al., 1992b; Smith et al., 1994).

Durante toda la fase de leptospiruria, los niveles de IgM pueden no detectarse en sangre (Hanson, 1977). En cambio, se puede detectar las IgG en orina, aproximadamente a las 6 semanas después de la infección. Además, los animales suelen presentar una respuesta inmune local, lo que provoca la aparición de IgA en la orina, hacia las 12 semanas de la infección. Esta presencia de IgA y la aparición de IgG en la orina, parece tener un efecto negativo sobre la variabilidad de las leptospiras en ésta, tal y como lo demostraron (Leonard et al., 1993).

En la mayoría de los casos, en el momento del aborto los niveles de anticuerpos son bajos, incluso negativos (Ellis, 1986). Esto redundaría en una dificultad a la hora de realizar el diagnóstico de los abortos por leptospiras.

15. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de los casos de Leptospirosis humana y animal puede ser complicado o difícil, debido, principalmente, a las características intrínsecas de las leptospiras y a la epidemiología (Ellis, 1994). En la actualidad, se cuenta con un gran número de técnicas de laboratorios distintos, pero su realización previa, es conveniente recabar información sobre una serie de datos que

puedan orientar en el diagnóstico. Para ello, se debe combinar las siguientes técnicas: el diagnóstico epidemiológico, clínico y de laboratorio.

El diagnóstico real debería basarse en el aislamiento, cultivo e identificación, pero las peculiares características de las leptospiras tales como crecimiento difícil y lento, hacen que esta metodología esté indicada en aquellos casos que otros más sencillos, como los serológicos, carecen de confiabilidad (Faine, 1991; Ellis, 1994)

En el caso de los estudios epidemiológicos, en los que se cuenta un gran número de muestras y el objetivo es la obtención de un resultado de prevalencia, las técnicas indicadas son, las serológicas, a pesar de que su interpretación es muchas veces subjetivas (Ellis, 1996).

15.1. Diagnostico Epidemiológico

En aquella aparición tanto humana como animal, en las que se encuentran con cuadros sintomatológicos compatibles con un caso de Leptospirosis, se debe enfatizar en las anamnesis de los aspectos siguientes:

1. Época del año en la que ha aparecido el brote, con especial atención a las climáticas: precipitación, temperatura, humedad relativa.

2. Aptitud del rebaño, manejo y estado sanitario de la explotación incluyendo, entrada de animales nuevos, manejo de la recría, alimentación, si hay monta natural o inseminación artificial etc.

3. Presencia de otras especies domésticas ejemplo. Ovejas, perros, cerdos etc.

4. Control de animales silvestres portadores.

5. Si el rebaño comparte el bebedero con otros animales silvestres.

6. Edad y sexo de los animales afectados.

7. Sintomatologías predominantes y características de los signos clínicos.

8. Antecedentes de leptospiras.

9. Si se realiza vacunación contra la Leptospirosis.

(Alonso–Andicoberry et al., 2001)

15.2. Diagnostico Clínico

Tiene un carácter presuntivo y se realiza fundamentalmente a través de los signos y síntomas que presenten los perros. Además las lesiones anatomopatológicas características de la enfermedad que aportan una gran

contribución (Schaeffer, 1951; Heath et al., 1965; Ellis, 1994; 1996; Kelley, 1998; Guijarro y Calvo, 1999).

15.3. Diagnostico de Laboratorio

Las técnicas bacteriológicas son las más complejas, pero nos brindan resultados muy importantes, tales como: la observación, el aislamiento y la identificación del microorganismo (Adler, 1986).

El diagnóstico debe basarse en el conocimiento de la patogenia del microorganismo, así como de sus propiedades. Estos métodos se pueden dividir en: técnicas indirectas, que detectan anticuerpos frente a las leptospiras y técnicas directas encaminadas a la detección de leptospiras o sus antígenos y/o ácidos nucleicos en los tejidos y/o fluidos corporales.

En caso de muestras procedentes de fetos, las técnicas directas están más indicadas que las indirectas, ya que el diagnóstico individual cobra mayor importancia. Para las muestras procedentes de animales adultos, las técnicas indirectas se utilizan más frecuentemente pues son más sencillas de realizar y su costo es menor (Ellis, 1996).

De los animales vivos, se envía sangre y leche en fase aguda de la enfermedad y orina en la crónica. De los fetos, los órganos de elección son: hígado, riñón, cerebro, glándula adrenal y pulmón, así como cualquier fluido interno (Ellis, 1996).

De los animales muertos y sacrificados, las muestras que se deben enviar son: cerebro, médula espinal, LCR y ojo cuando hay síntomas nerviosos, y la mayoría de los órganos parenquimatosos en los casos que cursan con ictericia (hígado, riñón, bazo etc.) (Ellis, 1986; Chamizo, 1997) y la vejiga y su contenido, humor acuoso, aborto y contenido estomacal (Bofill et al., 1996).

Las muestras posmortem más adecuadas son: riñón (parte cortical), hígado, bazo, así como sangre de corazón o líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, líquido peritoneal, cerebro, fetos abortados, semen y leche materna, deben preservarse congelados en glicerol a partes iguales (Ginebra, 2001).

Para propósitos epidemiológicos, pueden obtenerse muestras de agua y suelo, en caso de epidemias o epizootias: sangre, riñón e hígado de animales capturados (roedores u otros animales silvestres).

15.3.1 Técnicas indirectas

Los métodos serológicos nos brindan un diagnóstico en corto tiempo y son capaces de detectar anticuerpos antileptospirales (que pueden ser de la clase IgM e IgG), las que constituyen las técnicas de elección (Mazzonelli, 1994). Además, son las pruebas de laboratorio más utilizadas en el diagnóstico de la Leptospirosis, al igual que para la realización de estudios epidemiológicos. El mayor problema que presenta es los niveles de anticuerpos, aunque se mantengan durante años, alcanzan niveles tan bajos en animales y personas infectados crónicamente que no siempre se detectan, además en los casos de infección por serovares adaptados un porcentaje de los animales pueden no presentar respuestas con anticuerpos (Ellis, 1996).

Para el diagnóstico serológico se ha utilizado técnicas tales como: prueba de aglutinación microscópica (MAT), prueba de microaglutinación microscópica con antígeno muerto (MSAT), aglutinación macroscópica, prueba hemolítica, fijación de complemento, ensayo inmunoenzimático (ELISA) y PCR (Heinemann et al., 2000; Veloso et al.,2000; Arias et al., 2002; Fernández et al., 2002; Greenlee,2002).

A). MAT.

Es el método serológico de referencia a la hora de evaluar otras pruebas para el diagnóstico de Leptospirosis. Se emplea para detectar anticuerpos en sueros de sospechosos o enfermos (humanos y animales) donde el suero del paciente sospechoso o enfermo reacciona con antígenos vivos de leptospiras de 10 días de crecimiento en medio líquido de EMJH con enriquecimiento, y es el más utilizado cotidianamente (Ellis, 1986; Hartman, 1986; Timoney et al., 1988; Ellis, 1994; Heath y Jonson, 1994; Ellis, 1996). Además es la prueba oficial para la exportación e importación de animales (Ellis, 1996). El MAT fue ideado por Martin et al., en 1917 y en 1918, Martin y Pettit lograron describir el fenómeno de aglutinación y "lisis" con suero (Hartskeerl et al., 2000). Desde entonces, el método ha sido modificado y mejorado por (Schüffner y Mochtar, 1926; Borg-Peterson y Fagroeus, 1949; Wolff, 1954; Carbrey, 1960; Galton et al., 1965; Cole et al., 1973; Sulzer y Jones, 1973). Ellos trataron de estandarizar factores como: tiempo y temperatura de incubación, el punto de corte, la concentración del antígeno y la edad de siembra.

Antiguamente, era conocido como la prueba de aglutinación lisis por la formación lisis de las bolas (Schüffner y Mochtar, 1927) o lisis de glóbulos (van Thiel, 1948) de despojos o ruinas celular en la presencia de alto títulos de antisuero, pero Borg-Peterson, Wolff et al., (1954) demostraron que no se producía una lisis sino una aglutinación. En la actualidad, para obtener una adecuada sensibilidad, se recomienda utilizar cepas representativas de todos los serogrupos presentes en un lugar determinado concreto y de la especie objeto de estudio (Ellis, 1986; Prescott, 1993; Smith et al., 1994). También hay reportes de una sensibilidad y especificidad de MAT hasta 92% y 95%, respectivamente, con un valor predictivo positivo de 95% y negativo 100% (Hickey, 2002).

Para la realización de la prueba se utilizan cultivos de cuatro a ocho días de edad cuya suspensión produzca una transmitancia del 60-70% en un espectrofotómetro a 400nm de longitud de onda (Ellis, 1996). Además, es necesario determinar el punto de corte, título por debajo del cual es considerado que la aglutinación es debido a reacciones inespecíficas. El título de anticuerpos del suero será la dilución más alta en la cual aun encontramos 50% de aglutinación (Faine, 1982; Myers, 1985; Kmety y Dikken, 1993; Herrera, 2002). El punto de corte más recomendado para los perros, felinos, ovinos, suinos y equinos se considera positivo un resultado superior a 1:50 (Herrera, 2002).

A pesar de ser la prueba más recomendada y extendida, presenta una serie de desventajas: no distingue anticuerpos vacúnales de los de infección, resulta difícil su estandarización ya que su valoración es subjetiva, requiere el mantenimiento de cultivos de leptospiras y no siempre detecta a los animales infectados, en especial cuando el serovar implicado es *L. hardjo*, que presenta como características ser poco antigénico (Thiermann, 1984; Heath y Johnson, 1994).

B). Prueba de Aglutinación Microscópica con Antígeno Muerto (MSAT).

Utiliza leptospiras formoladas y centrifugadas, resuspendidas a una cierta densidad estándar, con un "pool" de antígenos de varios serogrupos. La aglutinación que se produce es semicuantitativa y puede leerse a simple vista. Esta reacción es menos específica que MAT, menor nivel de títulos obtenido,

mayor reacción cruzada (Wolff, 1954; Manev, 1976; Sulzer y Jones, 1973; Faine, 1982), los antígenos son estables a 4⁰C por lo menos un año, es especie específica y de la misma forma que MAT, no diferencia reacción entre anticuerpos de la infección reciente y tardía, pero tiene una buena reacción temprana de la enfermedad que MAT. (Myers, 1985; Harskeerl et al., 2000)

C. Fijación del Complemento (FC).

Es una prueba género-específica que emplea como antígenos de *L. biflexa*, considera tan fiable como el MAT para la detección de animales con leptospiuria, pero, detecta infección reciente, es útil en el pesaje de grandes cantidades de sueros ya que puede semiautomatizarse. Es una herramienta epidemiológica para diagnóstico rápido, menos laboriosa que el MAT. Las desventajas son las sustancias anticomplementarias del suero, la corta vida e inestabilidad del antígeno, no permite la diferenciación de serovares y no detecta niveles bajos de anticuerpos (Ellis, 1986; Smith et al., 1994; Ginebra, 2001).

D. ELISA

Las deficiencias que permite el MAT ha obligado a los científicos emplear esta técnica que ayude a la detección de anticuerpos tanto en el tanque de leche (Guijarro y Calvo, 1999) como en el suero. Ella es capaz de detectar la IgM durante la primera semana de la enfermedad (Adler et al., 1980; Edelweiss y Mailloux, 1982; Watt et al., 1988) y la detección tardía de IgG que permite diferenciar infecciones recientes de pasadas (Smith et al., 1994). La detección de anticuerpos específicos IgM con una sola muestra es confirmatoria de una infección reciente por leptospirosis. Además, se considera como más sensible que MAT (Thiermann, 1983; Thiermann y Garret, 1983; Ribeiro et al., 1994; Winslow et al., 1997; Wooward et al., 1997; Cumberland et al., 1999), es fácil de estandarizar los antígenos, pueden almacenar durante meses, no tiene ningún riesgo para los técnicos (Hartmann, 1986) y poca reacciones cruzadas (Thiermann y Garret, 1983), tampoco diferencia los anticuerpos vacunales de las infecciones (Thiermann, 1983). A pesar de que es una prueba muy eficaz, aun no está considerada como prueba oficial.

E. Aglutinación macroscópica

Se desarrolló para evitar los problemas derivados del mantenimiento de cepas vivas de leptospiras en el laboratorio. Poco autores la recomiendan debido a su falta de sensibilidad y porque no es capaz de determinar el serovar (Faine, 1982; Elli, 1986)

F. Aglutinación en micro cápsula

Es una técnica que se presentó como posible opción a las utilizadas habitualmente. En ella, se utiliza antígeno leptospiral transportado en micro cápsulas de un polímero sintético. Los autores la consideran como una prueba muy específica y sensible (Arimitsu et al., 1982). En una evaluación internacional fue más sensible que MAT o ELISA-IgM en la fase aguda de la enfermedad (Arimitsu et al., 1994), pero no puede detectar infecciones causada por otros serovares (Arimitsu et al., 1994; Sehgal et al., 1997). Se puede trabajar sin la modificación del suero de otra especie animal.

G. Hemoaglutinación indirecta (HA)

Es una prueba serológica género-específica de alta sensibilidad y solamente detecta las IgM (Sulzer, 1975). Utiliza eritrocitos de ovejas o del grupo sanguíneo O humano. A pesar de que siempre se ha considerado de utilidad, no ha llegado a desplazar al MAT y de hecho, se utiliza de manera paralela a él. Resulta del valor para el cribado de sueros y para la detección de infecciones recientes (Faine, 1982).

Es técnica desarrollada por CDC (Sulzer y Jones, 1973), reveló una sensibilidad y especificidad de 92 % y 95 % comparado con MAT respectivamente (Sulzer et al., 1975). Por estos altos valores en el territorio cubano es la técnica elegida para el diagnóstico de Leptospirosis humana (Obregón et al., 2001). Además, al inicio demostrara una sensibilidad de 92-100% durante la fase aguda y de convalecencia y 95-97% de especificidad

(Levett, 1999; Effler et al., 2000; Hickey, 2002), pero algunos autores obtuvieron una sensibilidad de 81% al séptimo día (Adler y Faine, 1978) de media y al 100% al octavo día de promedio. Estos niveles contradice lo obtenido por Effler et al., (2000) el 15% de sensibilidad al 14 día y 68% de convalecencia después de 14 día.

15.3.2. Técnicas Directas

La demostración de la presencia de Leptospiras, o sus componentes en la sangre, tejidos y/o leche de animales y humanos con signos clínicos es de gran valor diagnóstico (Ellis, 1996)

A. Observación en Microscopio de Campo Oscuro

Este método se realiza para la observación de leptospiras en los fluidos orgánicos. Es difícil debido al gran número de artefactos que, por su parecido con las leptospiras, pueden crear confusión (Ellis, 1986; Ellis, 1994). Además precisa que haya un gran número de microorganismos en las muestras (Ellis, 1986, Timoney et al., 1988; Ellis, 1994).

B. Tinción Argénica

Dentro de este grupo podemos considerar diferentes técnicas, como: la técnica de Warthing-Starry y sus modificaciones y la técnica de Steiner y Steiner (Faine, 1982). Se utiliza para la demostración de Leptospiras en los órganos de animales presumiblemente muertos por leptospiras (Amatredjo y Campbell, 1975; Ellis, 1996). La presencia de leptospiras en fetos abortados y mortinatos son indicadores claros de que es una infección activa en el feto y crónica en la madre, considerando de valor diagnóstico (Ellis, 1996). Además de su baja especificidad y sensibilidad (Baskerville, 1986; Ellis, 1996), presenta las mismas inconveniencias que la anterior.

C. Técnicas de Tinción Inmunohistoquímica.

Tienen baja sensibilidad, por lo que son poco adecuados para el diagnóstico de portadores crónicos, lo que depende del número de microorganismos en la muestra (Ellis, 1996)

a. Inmunofluorescencia:

Es más adecuada para la detección de leptospiras que las anteriores (Torten et al., 1966; Baskerville, 1986; Ellis, 1986; Timoney et al., 1988; Appassakij et al., 1995). Casi siempre se utiliza en el diagnóstico para los casos de abortos (Ellis, 1986; Timoney et al, 1988, Ellis, 1994) y de la presencia de Leptospiras en sedimentos de orina (Timoney et al., 1988). Su mayor desventaja es que requiere la producción de antisueros poli clónales de buena calidad y necesita la utilización de microscopio de fluorescencia. (Ellis, 1986 y 1994)

b. Inmunoperoxidasa

Es más rápida y accesible que la anterior ya que no precisa de un microscopio de fluorescencia (Ellis, 1983 y 1986; Terpstra et al., 1986).

c. Marcado de partículas de oro

Al igual que las anteriores, depende del número de microorganismos y poco sensible (Ellis, 1994 y 1996).

D. Técnicas de detección y estudio de ácidos nucleicos

Son pruebas relativamente modernas que aun precisan más estudios sobre su efectividad y utilidad (Ellis, 1996). Comprende: marcado con sondas de ADN, hibridación de ARN, marcado con radio y PCR con mayor efectividad en la orina (van Eys et al., 1989; Arimitsu et al., 1994; Brown et al., 1995; Zuerner et al., 1995; Wagenaar et al., 2000).

E. Aislamiento

Para muchos autores, es la técnica más sensible para el diagnóstico de leptospirosis, además es la que confirma la presencia del germen, tanto en casos agudos como crónicos (Thiermann, 1983 y 1994; Ellis, 1986; Timoney et al., 1988, Ellis, 1996), a pesar de que requiere mucho tiempo y de laboratorios especializados (Thiermann, 1983; Ellis, 1994).

La inoculación en animales de experimentación puede considerarse una forma especial del aislamiento y está considerada como la técnica más sensible por algunos científicos (Timoney et al., 1988).

También hay existido otros métodos pero no de amplio uso en mundo como: Prueba Hemolítica (HL), Contra inmunoelectroforesis (CIE), Inmunoabsorción Magnética, Hibridación de ADN., Absorción de antígeno inmunomagnético etc. (Thiermann, 1983; Ellis, 1994).

16. TRATAMIENTO Y CONTROL

El propósito ó fin del tratamiento de casos agudos de leptospirosis canina es el control de la infección antes de que se produzcan los daños irreparables al hígado y riñones, y suprimir la leptospiuria. Casos severos y agudos requieren un alto grado de cuidados de soporte para la supervivencia; la pronta administración de fluidos es esencial. El pronóstico es reservado para pacientes con falla renal aguda y/o enfermedad hepática.

Los dueños deben ser advertidos de que la leptospirosis es una enfermedad zoonótica que se disemina principalmente por orina de perros infectados. La zona de habitación y áreas externas de un perro infectado necesitan ser tratadas con desinfectantes apropiados. Además, los perros deben evitar, aguas estancadas lodosas y roedores. El control de roedores debe instituirse. La vacunación se recomienda en áreas endémicas.

Los perros usualmente se recuperan después de 2 semanas, si son tratados prontamente con antibióticos y fluidos endovenosos. Sin embargo, si el daño renal ó hepático es severo la infección puede ser fatal.

Un tratamiento exitoso depende de una evaluación de la severidad de la enfermedad del perro. La terapia antimicrobiana inicial, donde hay evidencia de disfunción renal y/o leptospiremia, debería incluir el uso de penicilina G procaína (40,000 a 80,000 unidades por kg, IM, una vez al día, ó en dosis divididas, dos veces al día) hasta el retorno de la función renal.

También pueden utilizarse fármacos alternativos en lugar de penicilina, como ampicilina ó amoxicilina. La eliminación de leptospiras del tejido intersticial renal a fin de controlar el estado portador se logra mejor utilizando dihidroestreptomicina (10 a15 mg per kg, IM, dos veces al día por 2 semanas) ó estreptomicina; sin embargo estos fármacos no están disponibles en los Estados Unidos para una terapia de rutina. La doxiciclina no está formalmente aprobada, pero una administración oral de 5.0 mg por kg una vez al día ha sido propuesta. Los aminoglicósidos no pueden utilizarse en pacientes hasta que se restablezca la función renal.

Por lo tanto los métodos de control deberían incluir vacunación, especial atención a sanidad de perreras para eliminar el contacto con fuentes potenciales de orina infectada; conocimiento de que los perros en mayor riesgo son las razas de caza, perros de exhibición, y otros perros con acceso a aguas como lagunas; instituir un control sobre roedores en toda la vivienda y en las perreras. (Zuerner et al., 1995; Wagenaar et al., 2000).

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, H., Hugo. M. C. y Viáfara, D. 1994. Leptospirosis. Revisión de tema. Colombia Médica, 25:36-42.
2. Adler, B. and Faine, S. 1978. The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. J. Med. Microbiol. 11:387-400
3. Adler, B., Murphy, A. M., Locarnini, S. A. and Faine, S. 1980. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid phase enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 11:452-457
4. Adler, B., Chappel, R. J. and Faine, S. 1982. The sensitivities of different immunoassays for detecting leptospiral antigen. Zentbl. Bakteriol. 252:405-413.
5. Adler, B. 1986. Development of an improve selective medium for isolation of leptopires from clinical material. Vet. Microbiol. 121:377-381.
6. Alonso- Andicoberry, C., García-Peña, F.J., Pereira Bueno, J., Costas, E. and Ortega-Moral, M. 2001. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. Prev. Vet. Med. 52:109-117.
7. Alonso- Andicoberry, C., García-Peña, F. J., Pereira Bueno, J., Costas, E.y Ortega-Moral, M. 2001. Epidemiología, diagnóstico y control de la Leptospirosis bovina (Revisión). Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. 16(2): 1-34.
8. Amatredjo, A. and Campbell, R.S.F., 1975. Bovine leptospirosis. Vet Bull 43: 875-891.
9. Appassakij, H., Silpapojakul, K., Wansit, R. and Woodtayakorn, J. 1995. Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human **Leptospirosis**. Am. J. Trop. Med. Hyg. 52:340-343
10. Arias, R., Obregón Ana y Fernández Carmen. 2002. Taxonomía de las Leptospiras. XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias Habana, Cuba.
11. Arimitsu, Y., Kobayashi, S., Akama, K. and Matuhasi, T. 1982. Development of a simple serological method for diagnosing Leptospirosis: a microcapsule agglutination test. J. Clin. Microbiol. 15:835-841.
12. Arimitsu, Y., Fukumura, K. and Shintaki, Y. 1989. Distribution of **Leptospirosis** among stray dogs in the Okinawa Islands, Japan: comparison of the microcapsule and microscopic agglutination tests. Br. Vet. J. 145:473-477.
13. Arimitsu, Y., Kmety, E., Ananyina, Y., Baranton, G., Ferguson, I. R. , Smythe, L. and Terpstra, W. J. 1994. Evaluation of the one-point microcapsule agglutination test for diagnosis of **Leptospirosis**. Bull. WHO 72:395-399.
14. Arzumanian, G.R. 1970. Leptospirosis. Acad. Cienc. Cuba, 1-30.
15. Baseman, J.B. 1990. The spirochetes. En: Davis, B.D, Dulbecco, R., Eisen H.N., Ginsberg, H.S. with 29 additional contributors: Microbiology, 4th ed. Chapter 37. Washington D.C: American Society for microbiology.645-656.
16. Baskerville, A.1986. Histological aspects of diagnosis of Leptospirosis. In: Ellis W.A., Little T.W.A.(Eds.) Present state of Leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, 33-43.
17. Benhnet, C. J. y Plum, F. 1998. Leptospirosis. Tratado de Medicina Interna: 1984-1985. (CECIL).
18. Blood, D.C., Radostits, O.M. and Henderson, J.A. 1982. Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses.6 Eds. ELBS, 675-685.

19. Bofill, P., Rivas, A., Ramírez, W. Montañez, J., Martínez, A., Quincoses, T., Reinaldo, L. y Fuentes, E. 1996. Manual de Enfermedades Infecciosas. Tomo # 1. Talleres Gráficos de la Dirección de Publicaciones y Materiales Educativos del Instituto Politécnico Nacional, México, 139-187.
20. Bolin, C.A. 1989. Human to human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. J. Infect. Dis. 159:246-247.
21. Bolin, C.A., Thiermann, A.B., Handsaker, A.L. and Foley, I.W. 1989. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* infection in pregnant cattle. Am. J. Vet. Res 50, 161-165.
22. Bolin C.A., Cassells, J.A., Phil B., Zuerner, R.L. and Trueba, G. 1991. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* vaccine on type *hardjo-bovis* infection of cattle. Am. J. Vet. Res. 52: 1639-1643.
23. Bolin, C.A. 2000. **Leptospirosis**, 185-200. In :C. Brown, and C. Bolin (ed.), Emerging diseases of animals. ASM Press, Washington, D.C.
24. Bombinbre, T.R. y Lopez R. Teresa. 1998. Leptospirosis en unidades intermedias. Rev. Higiene y Epidemiología 36(2):105-112.
25. Borg-Peterson, C. and Fagroeus, A. 1949. The influence of the antigen density and other factors on the serum titre in the agglutination-lysis-test for leptospirosis. Acta Path. XXVI:4.
26. Brenner, D. J., Kaufman, A.J., Sulzer, K.R., Steigerwalt, A.G., Rogers, F.C. and Weyant, R.S. 1999. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *L. alexanderi* sp. Nov. and four new *Leptospira* genomospecies. Inter. J. of Systematic Bacteriology, 49,839-858.
27. Brown, P. D., Gravekamp, C., Carrington, D. G., Van de Kemp, H., Hartskeerl, R. A., Edwards, C. N., Everard, C. O. R., Terpstra, W. J and Levett, P. N. 1995. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of **leptospirosis**. J. Med. Microbiol. 43:110-114.
28. Cabezas, H., Sosa, G., Alaza, M., Vrtiak. O.J. y Kapitanichik. 1981. Supervivencia de los serogrupos *L. pomona* y *L. canicola* en la orina de cerdo, aguas naturales y residuales. Rev. Cubana Cienc. Vet. 12: 221-228.
29. Cabrey, E.A. 1960. The relative importance of variable factors in the agglutination-lysis-test. 64th Annual Proceedings United States Livestock Sanitary Association.
30. Canale-Parola E., 1984. Order I. Spirochaetales Buchanan 1917, 163a. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol I. Krieg N.R. y Holt J.G. (Eds.) Williams & Wilkins, Ed. Baltimore, USA. 38-39.
31. Carpio, M.M. and Iverson, J. O. 1979. Leptospirosis. Can. Vet. J., 20,127.
32. Carrol A.G. and Campbell R.S.F. 1987. Reproductive and leptospiral studies on beef cattle in central Queensland. Aus. Vet. J. 64, 1-5.
33. Cole, J. R., Sulzer, C. R. and Pursell, A.R. 1973. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. Appl. Microbiol. 25:976-980.
34. Colin, J.R., Trujillo, B. y Caballero, S. 2002. Seroprevalencia a leptospirosis en trabajadores de un rastro de la ciudad de Colima. "Leptospirosis Habana- 2004" Segundo taller internacional y segunda reunión científica. Cuba, Mayo.

35. Cumberland, P. C., Everard, C. O. R. and Levett, P. N. 1999. Assessment of the efficacy of the IgM enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute **Leptospirosis**. Am. J. Trop. Med. Hyg. 61:731-734.
36. Chamizo, E. 1997. Patología orgánica y enfermedades de los animales domésticos. Ed. Felix Varela. 52.
37. Chamizo, E. 1998. Manual de Patología Veterinaria Especial. Ed. ISCAH. 269-271.—
38. Dikken, H. and Kmety, E. 1978. Serological typing methods of leptospire, 11, 259-307. In: T. Bergan, and J. R. Norris (ed.), Methods in Microbiology, vol. 11. Academic Press, London, U.K.
39. Dikken, H. 1986. Serological identification using the classical cross-agglutinin method and the factor sera method. En: Ellis, W.A. y Little, T. W. A. (Eds.) Martinus Nijhoff Publishers. The Present states of leptospirosis diagnosis and control.
40. Edelweiss, E. L. and Mailloux, M. 1982. The curve of immunoglobulins in human **leptospirosis**. Int. J. Zoonoses 9:51-55.
41. Effler, P.V., Domen, H.Y., Bragg, S.L., Aye, T. and Sasaki, D.M. 2000. Evaluation of indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii. J. Clin. Microbiol. 38:1081-1084.
42. Ellis, W.A. and Michna, S.W. 1976. Bovine leptospirosis: a serological and clinical study. Vet. Rec., 99,387-391.
43. Ellis, W.A. and Michna, S.W. 1977. Bovine leptospirosis: experimental infection of pregnant heifers with strain belonging to the Hebdomadis serogroup. Res. Vet. Sci. 22, 229-236. Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. Vol. 16 (2).
44. Ellis, W.A. 1978. Bovine Leptospirosis: infection by the Hebdomadis serogroup. Vet. Annu., 18:60-66.
45. Ellis, W.A., O'Brien, J. J. and Cassells J., 1981. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype *hardjo* infection in North Ireland. Vet. Rec. 108: 555-557.
46. Ellis, W.A., O'Brien, J.J., Nelly, S.D. y Hanna, J. 1982. Bovine Leptospirosis: serological findings in aborting cows. Vet. Rec., 110:178-180.
47. Ellis, W.A. 1983. Recent developments in bovine Leptospirosis. Vet. Annu., 23: 91-95.
48. Ellis, W.A. 1986. The diagnosis of Leptospirosis in farm animals, In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) Present state of Leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, 13-31.
49. Ellis, W.A., Thiermann, A.B., Montgomery, J., Handsaker, A., Winter, P.J. y Marshall, R.B. 1988. Restriction Endonuclease Analysis of leptospira interrogans serovar hardjo isolates from cattle. Res. Vet. Sci, 44:375-379.
50. Ellis, W.A. 1992. Strategies for the control of Leptospirosis in cattle. British Cattle Veterinary Association Proceedings, 1991-1992. 185-190.
51. Ellis, W.A. 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet. Clin. North. Am., Food Anim. Pract. 10:463-478.
52. Ellis W.A. 1996. Leptospirosis. OIE Manual: Amedment I, 1-8.
53. Faine, S. 1982. Guidelines for the control of leptospirosis. Faine S. (Ed.). WHO Offset Publication, 67. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
54. Faine, S. and Stallman, N.D. 1982. Amended descriptions of the Genus *Leptospira*

55. Faine, S., Adler, B., Christopher, W. and Vaklentine, R. 1984. Fatal congenital human leptospirosis . Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg. 2:257-548.
56. Faine, S. 1991. The genus *Leptospira*, In: Barlows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H.(Eds.) The prokariotes. Springer-Verlag, 2nd edition. 3568-3582.
57. Faine, S. 1994. *Leptospira* and leptospirosis. CRC Press, Boca Raton, Fla
58. Faine, S., Adler, B., Bolin, C. and Perolat, P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis, 2nd ed. Med. Sci. Melbourne, Australia.
59. Ferguson, I. R. 1993. Leptospirosis surveillance: 1990-1992. Communicable Disease Report; 3: 47-48.
60. Fernández, L. J., De La Peña, M. A. y Reyes, V. V. 1991 Detección de antígenos contra *Leptospiras interrogans* en bovinos de hatos lecheros en el valle de Atlixco, Puebla mediante la prueba de aglutinación microscópica. En: Memorias del XVI Congreso Nacional de Buiatria, 321-325 .
61. Fernández, L. H. 1999. Leptospirosis. Manual de salud de cerdo. Tomo 1:34-39
62. Fernández, M, Carmen, Obregón, F. Ana Margarita, Rodríguez, J., Rodríguez, G. I., et al. 2002. Nuevas tecnologías desarrolladas e incorporadas en el diagnostico de la Leptospirosis humana en Cuba. XVIII Congreso PANVET. Habana, Cuba. [Resumen].
63. Field, H. and Wellers, K.C. 1950. Bovine leptospirosis . Vet. Rec. 62: 311-313.
64. Fresno, C. Caridad. 1996. Leptospirosis. Una aproximación al tema. Control Nacional de Información de Ciencias Médicas. Departamento de servicios especiales de información. C. Havana.
65. Freund, S., Trainin, D. and Malkin, E. 1941. Contagious jaundice in cattle. Palest. Vet. Bull., 8:153, 1941.
66. Galton, M. M., Sulzer, C. R., Santa Rosa, C. A. and Fields, M. J. 1965. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. Appl. Microbiol. 13:81-85.
67. Gill, O. N., Coghlan, J. D. and Calder, I. M. 1985. The risk of Leptospirosis in United Kingdom fish farm workers. J. Hyg. 94:81-86.
68. Gillespie, R.W. and Ryno, J. 1963. Epidemiology of Leptospirosis Am. J. Pubic Health. 53:950-955.
69. Ginebra, G. A. Olga. 2001. Microorganismos Espirales. En: Llop H. Alina, Valdés-Dapena V. M., Zuazo, S.J. Microbiología y Parasitología Médicas Tomo 1. Ed. Ciencia Médica Ciudad de La Habana. 37:388-415.
70. González, G. J. A. 1989. Leptospirosis. Monografía Univ. Central de Las Villas, Cuba.
71. Gonzáles G., J. A., Tamayo, S. y Machado, A. 1990. Leptospirosis. Ed. Centro de información y Documentación Agropecuaria. La Habana.
72. Greenlee, J.J. 2002. The diagnosis and description of experimental Leptospirosis in dogs. Memorias XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias . Habana, Cuba.
73. Guijarro, R. y Calvo, E. 1999. Tratamiento y control de leptospirosis bovina. Producción Animal, 146:27-36.
74. Haake, D. A. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiology 146:1491-1504.

75. Hanson, L.E. 1977. Immunology of bacterial diseases with special reference to leptospirosis. JAVMA, 170:991-994
76. Hartskeerl, R.A. and Terpstra, W.J., 1996. Leptospirosis in wild animals. Supplement 3 of Vet. Q. 18/S3,S159-S160.
77. Hartskeerl, R., Smith, H., Korver, H., Goris, M. and Terstra, W. 2000. International Course on Laboratory Methods for diagnosis of Leptospirosis. Royal Institute. Amsterdam, Holland.
78. Heath, C. W., Alexander, A. D. and Galton, M. M. 1965. **Leptospirosis** in the United States: 1949-1961. N. Engl. J. Med. 273:857-86, 915-922.
79. Heath S.E. and Johnson, R. 1994. Leptospirosis. JAVMA 205, 1518-1523.
80. Heinemann, M.b., Garcia, J.F., Monjas, C.M.Las, Gregori, F., Higa, Z. M., Vasconcellos, S.A. y Richtzenhain, L.J. 2000. La detección y diferenciación de *Leptospira* sp. Serovares en la esperma vacuna por reacción en cadena polimerasa y la restricción fragmenta longitud polymorphism. Microbiol. Vet. 73(4):261-267.
81. Hellstrom, J.S. and Marshall, R.B. 1978. Survival of *Leptospira interrogans* serovar pomonain an acid soil under simulated New Zealand field conditions Rev. Vet. Sci., 25, 29-33.
82. Herrera Blanca. 2002. Diagnostico de Laboratorio. En: Guia de Control y Manejo de Leptospirosis. OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.27-34.
83. Hickey, W. P. 2002. Leptospirosis. Disponible en: <http://www.emedicine.com/PED/topic1298.htm>.
84. Holt, J.G., Hrieg N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, Ed., Baltimore, USA. 9th edición. 27-37.
85. Hutyra, F., Marek, J., Manninger, R., Mocsy, J. 1968. Patología y Terapéutica Especiales de los Animales domésticos. Tomo 1. Ed. Labor (Barcelona), 309-314.
86. Hutyra, F., Marek, J., Manninger, R., Mocsy, J. 1973. Patología y Terapéutica Especiales de los Animales domésticos". 3ra. Ed. Edit. Labor, S.A., 1, 308-312.
87. Johnson, D. W. 1950. The Australian leptospirosis. Med. J. Aust. 2:724-731
88. Johnson, R. C., Walby, J., Henry, R. A. and Auran, N. E. 1973. Cultivation of parasitic leptospire: effect of pyruvate. Appl. Microbiol. 26:118-119.
89. Johnson, R. C. and Faine, S 1984a. *Leptospira*, 62-67. En: N. R. Krieg, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
90. Johnson, R.C. and Faine, S. 1984b. Family II. *Leptospiraceae* Pillot 1965, 79a. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol I. Krieg N.R. y Holt J.G. (Eds.) Williams & Wilkins, Ed. Baltimore, USA. 39-66.
91. Jungherr, E.1944. Bovine Leptospirosis. J.A.V.M.A. 105, 27.
92. Kingscote, B. 1985. *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in cattle in the South Okanagan District of British Columbia. Can. Vet. J. 26, 328-332.
93. Kingscote, B. 1988. Leptospiral antibodies in cattle in Albert and evidence of an emerging serovar. Can. Vet. J., 29:647-653.

94. Kmety, E. and Dikken, H. 1993. Classification of the species of *Leptospira interrogans* and history of its serovars. University Press Groningen. Groningen, The Neatherlands.
95. Leonard, F.C., Quinn, P.J., Ellis, W.A. y O'Farrel, K. 1992a. Duration of urinary excretion of leptospires by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira Interrogans* serovar hardjo. Vet. Rec., 131:435-439.
96. Leonard, F., Quinn, P.J. and Ellis, W.A. 1992. Possible effect of pH on the survival of leptospires in cattle urine. Vet. Rec. 131, 53-54.
97. Leonard, F., Quinn, P.J. and Ellis, W.A. 1993. Association between cessation of leptospiruria in cattle and urinary antibody levels. Res. Vet. Sci. 55, 195-202.
98. Levett, P. N. 1999. Leptospirosis : re-emergin or re-discovered disease. J Med Microbiol., ;48:417-418.
99. Levett, P. N. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbio. Rev., 14(2):296-326.
100. Levine, D. F. 1989. **Leptospirosis** in the milking parlour. Br. J. Hosp. Med.
101. Little, T.W.A., Parker, B. N. J., Stevens, A.E., Hathaway, C. and Markson, L. M. 1981. Innaparent infection of sheep in Britain by leptospirosis of the Australis serogroup. Res. Vet. Sci., 31:386-387.
102. Little T.W.A., 1986. Changes in our understanding of the epidemiology of leptospirosis. In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) Present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, 149-173.
103. Little T.W.A., Hathaway, S.C., Broughton, E.S. and Seawright, D. 1992. Control of *Leptospira hardjo* infection in beef cattle by whole herd vaccination. Vet. Rec. 131, 90-92.
104. López Ofelia, Vignolo, J. y Hernández Silvia. 2002. Situación Epidemiológica en el ser Humano. En: Guía de control y manejo de Leptospirosis. OPS/HCP/HCV/URU.ZOO. 5-10.
105. Marga Goris, 2004. Microbiology of Leptospires. "Leptospirosis Habana-2004" II taller internacional y II reunión científica. Cuba, Mayo.
106. Martínez, S. R., Cruz de la Paz, R. y López, C. 1993. Algunas consideraciones sobre el comportamiento de leptospirosis humana en Cuba. Rev Cub de Hig y Epidemiol 45(1):20-27.
107. Martínez, M. G., Matos, K. T., Da Silva, M. V and. Abreu. M. T. de. 1998. Ocular manifestations in the acute phase of **leptospirosis**. Ocul. Immunol. Inflamm. 6:75-79.
108. Mazzonelli, J. 1994. Tecnicas actuales de laboratorio de diagnostico de leptospirosis. Rev. Lab. 77(457):9-18.
109. Merck, Manual de Veterinaria, El. 2000.5ta ed. Barcelona, España. Ed. Océano Grupo, 532-533.
110. Michna S.W.1970. Leptospirosis. Vet. Rec. 86, 484-496
111. Millar, D.A., Wilson, M.A. and Beran, G.W., 1991. Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. Am. J. Vet. Res 52, 1761-1765.
112. Muñoz, M. E. 1999. Leptospirosis: revisión bibliográfica y análisis de la enfermedad en Costa Rica. Tesis de licenciatura. Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional. Costa Rica.
113. Myers, D. M. 1985. Leptospirosis Manual of laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. Pan Am Health Org. Tec. Not,(30):5-36.

114. Perdomo, E. y Garin, A. 2002. Leptospirosis animal. En: Guía de Control y Manejo de Leptospirosis. OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.24-26.
115. Pérez Vigueras, I. 1943. Notas sobre la presencia en Cuba de la *Leptospira canicola* y consideraciones acerca de la leptospirosis canina y su tratamiento. Med. Cir. Hab., 48:470-480.
116. Radostits, O.M., Leslie, K. E. and Fetrow, J. 1994. Herd Health: Food animal production medicine. Ed. W.B. Saunders Company, USA. 2nd Ed.
117. Ramírez, W. 1971. Comunicación de Leptospirosis al I.N.M.V., 21, 4. 1
118. Ribeiro, M. A., Assis, C. S. N. and Romero, E. C. 1994. Serodiagnosis of human **Leptospirosis** employing immunodominant antigen. Serodiagn. Immunother. Infect. Dis. 6:140-144.
119. Ruiz, L. O. 1995. Enfermedades zoonóticas en Venezuela. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto, Ven. 44-61.
120. Russell, R. W. R. 1958. Treatment of Leptospirosis with oxytetracycline. Lancet ii:1143-1145.
121. Russell, C.J. and Northion Hughes, C.A. 1999. Spirochetes. En: Howard, B.J., Keiser, I.F., Smith, T. F et al. Clinical and Pathogenic Microbiology. 2nd ed. Washington, 529-540.
122. Sehgal, S. C., Vijayachari, P. and Subramaniam, V. 1997. Evaluation of leptospira micro capsule agglutination test (MCAT) for serodiagnosis of leptospirosis. Indian J. Med. Res. 106:504-507.
123. Skilbeck, N.W. and Miller, G.T. 1986. A serological survey of leptospirosis in Gippsland dairy farmers. Med. J. Aust. 144:565-567.
124. Skilbeck, N.W. and Chappel, R.J. 1987. Inmonoglod silver staining for visualization of leptospire in histologic sections. J. Clin. Microbiol., 25:85-86.
125. Smibert, R. M. 1977. The Spirochaetales, 195-228. In: Laskin, A. I. and Lechavelier, H. A. (ed.), CRC handbook of microbiology, 2nd ed, vol. 1. CRC Press, Cleveland, Ohio
126. Smith, D. T. L. and Perry, D.A. 1952. Bovine Leptospirosis. Can. Jour. Comp. Med., 16, 294-299.
127. Smith C.R., Ketterer P.J., McGowan M.R. and Corney, B.G., 1994. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in cattle. Aus. Vet. J. 71, 290-294.
128. Smith, C.R., Comey, B.G., McGowan, M.R., McClintock, C.S, Ward, W. and Ketterer, P.J. 1997. Amoxicillin as an alternative to dihydristreptomycin sulphate for treating cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo*. Aus. Vet. J., 75:818-821.
129. Smyth, L., Dohnt, M., Symonds, M., Barnett, L., Moore, M., Brookes, D. and Vallanjon. M. 2000. Review of leptospirosis notifications in Queensland and Australia: January 1998-June 1999. Commun. Dis. Intell. 24:153-157.
130. Songer J.G. and Thiermann, A.B. 1988. Leptospirosis. JAVMA 193, 1250-1254.
131. Sullivan, N.D. 1974. Leptospirosis in animals and man. Aus.Vet.J. 50, 216-223.
132. Sulzer, C. R. and Jones, W. L. 1973a. A modified semi-micro method for the test for leptospirosis. Health Lab. Sci. 10:13-17.
133. Sulzer, C. R. and Jones, W. L 1973b. Evaluation of a hemagglutination test for human Leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 26:655-657.

134. Sulzer, C.R. Glosser, J. W., Rogers, F., Jones, W. L. and. Frix, M. 1975. Evaluation of Indirecta Hemagglutination test for diagnosing of human Leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 2(3):218-221.
135. Terpstra, W.J., Schoone, G.J., Ligthart, G.S. and ter Schegget, J. 1987. Detection of *Leptospira interrogans* in clinical specimens by in situ hybridization using biotin-labelled DNA probes. J. Gen. Microbiol. 133:911-914.
136. Terry, J., Trent, M. and Bartlett, M. 2000. A cluster of Leptospirosis among abattoir workers. Commun. Dis. Intell. 24:158-160.
137. Thiermann, A. B. 1981. Use of solid medium for isolation of leptospire of the hebdomadis serogroup from bovine milk and urine. Am J Vet Res, 42-12, 2145-2145.
138. Thiermann, A.B. 1982. Experimental leptospiral infection in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. Am. J. Vet. Res. 43: 780-784.
139. Thiermann, A.B. 1983. Bovine leptospirosis: bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. Am. J. Vet. Res 44, 2244-2245.
140. Thiermann, A.B. and Garret, L.A. 1983. Enzyme-linked inmunoabsorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars *hardjo* and *pomona* in cattle. Am. J. Vet. Res. 44, 884-887.
141. Thiermann, A.B. 1984. Leptospirosis: current developments and trends. JAVMA 184, 722-725.
142. Thiermann, A.B. and Handsaker, A.L. 1985. Experimental infection of calves with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*: conjunctival versus intravenous route of exposure. Am. J. Vet. Res., 46:329-331.
143. Timoney, J..F., Gillespie, J.H., Scott, F.W. and Barlough, J.E. 1988. The Spirochetes, In: Hagan & Bruner's Microbiology and infectious diseases of domestic animals. Comstock Publishing Associates, Ithaca, USA, 8th edition, 45-57.
144. Torten, M., E. Shenberg, and J. van der Hoeden. 1966. The use of immunofluorescence in the diagnosis of human Leptospirosis by a genus-specific antigen. J. Infect. Dis. 116:537-543.
145. Trap, D. and Gaumont, R. 1986. Leptospirosis in domestic animals in France: current situation, In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) Present state of Leptospirosis diagnosis and control . Martinus Nijhoff Publishers, 179-184.
146. Trap, D. 1988. Les petits mammifères sauvages, source de leptospirose. Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz. 7, 885-892.
147. Vanasco Norma y Sequeiro, G. 2000. Descripción de un brote de Leptospirosis en la Ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril,1998. Rev Pan. de la Salud Pública. 7(1):35-40.
148. Van der Hoeden J. (1958). Epizootiology of Leptospirosis. Adv. Vet. Sci. 4, 278-339.
149. Van Thiel, P. H. 1948. The leptospirosis. University of Leiden, Leiden, The Netherlands.
150. Veloso, I. F., Corre, M. T., Salas, C.E. y Moreira, C.E 2000. Una comparación de tres procedimientos extractivos de AND con *Leptospira* para polymerase análisis de reacción en cadena. Memorias Haze Instituto Oswaldo Cruz. 95(3):339-343, Brazil.

151. Wagenaar, J., Zuerner, R. L., Alt, D. and Bolin, C. A. 2000. Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* in urine of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 61:316-20.
 152. Watt, G., Alquiza, L. M., Padre, L. P., Tuazon, M. L. and Laughlin, L. W 1988. The rapid diagnosis of leptospirosis: a prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stages of illness. *J. Infect. Dis.* 157:840-842.
 153. Watt, G.P., Padre, L., Tuazon, M. and Calubaquid, C. 1990. skeletal and cardiac muscle involvement in severe, late Leptospirosis. *J Infect Dis.* 162:266-269.
 154. Wesselinoff, W., Deltscheff, Chr. and Bailösoff, D. 1962. Über die lebensdauer der leptospiren in tierischen gewebe. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 75:184-18.
 155. Wilmaers, L. and Renaux, E. 1917. Quarante-sept cas de spirochétose ictéro-hémorragique. *Arch. Med. Belg.* 70:115-207.
 156. Winn, W.C. (Jr.), 1998. Spirochetal Diseases. En: Koneman ,E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R. (Jr.), Smmers, H.M. *Diagnostics Microbiology.* 3rd ed. Chap.
 157. Wolff, J. W. 1954. The laboratory diagnosis of Leptospirosis. Thomas, C. C. Publishers, Springfield, Ill. USA.
 158. Woodward, M.J., Swallow, C., Kitching, A. , Dalley, C. and Sayers, A.R. 1997. *Leptospira hardjo* serodiagnosis: A comparison of MAT, ELISA and Immunocomb. *Vet. Rec.*
- Zuerner, R. L., Alt, D. and Bolin, C. A. 1995. IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato. *J. Clin. Microbiol*