

LEPTOSPIROSIS EN EL PERU. I. IDENTIFICACION DE LAS CEPAS DE LEPTOSPIRAS PRESENTES EN EL PERRO Y EL GATO E INCIDENCIA DE LA INFECCION

ARÍSTIDES HERRER, JULIA LICERAS Y OSWALDO MENESES

División de Estudios Epidemiológicos e Investigaciones Especiales
del Instituto Nacional de Salud Pública, Lima, Perú.

INTRODUCCION

Durante los últimos años se ha venido concediendo cada vez mayor atención al estudio de la leptospirosis a través de todo el mundo, sobre todo al conocerse la importancia que tiene tanto en salud pública así como en veterinaria. Como resultado de este creciente interés en la investigación acerca de la leptospirosis se ha descubierto nuevas cepas patógenas para el hombre y los animales domésticos (ALEXANDER et al., 1955; BABUDIERI, 1955; WOLFF y BOHLANDER, 1958), se ha ideado nuevas técnicas de diagnóstico (BROWN, 1939; STOENNER, 1953 y 1954) o se han mejorado las ya existentes, se ha ensayado diversas drogas en el tratamiento (ALSTON y BROOM, 1944; BACHELOR y TODD, 1950; THIEL, 1957), del mismo modo que se ha abordado otros diversos aspectos igualmente importantes. Entre éstos está el esclarecimiento que se viene haciendo acerca de las relaciones epidemiológicas entre las diversas cepas patógenas, los animales que actúan de reservorio y diseminadores de las mismas, y la población humana expuesta a contraer la infección. Este aspecto de la leptospirosis varía tanto de unas regiones geográficas o otras, y aún de unas localidades a otras, que necesariamente obliga abordar su estudio en forma local en cada situación u oportunidad. Considerando en conjunto el aporte que durante los últimos 20 años se ha hecho al conocimiento de los diversos aspectos de la leptospirosis, resulta sorprendente el avance que se ha obtenido en dicho lapso.

En Europa, desde hace tiempo se ha esclarecido la importancia que tiene el perro como huésped habitual de la *Leptospira canicola* y su relación con las infecciones humanas debidas a esta cepa serológica (MINKENHOF, 1947). También en los Estados Unidos de Norte América, hace ya algunos años se logró poner de manifiesto la importancia veterinaria que tiene la leptospirosis canina (MEYER et al., 1939) y, más recientemente, al verificarse en el Estado de Georgia una pequeña epidemia debida a *L. canicola* que comprendió tanto al hombre como también al perro y el ganado vacuno y porcino (WILLIAMS et al., 1956), se puso de manifiesto la verdadera transcendencia del problema. En cuanto a América del Sur, de acuerdo a nuestras informaciones bibliográficas, no se habrían presentado situaciones semejantes, a pesar de haberse verificado la presencia de la *L. canicola* cuando menos en Argentina (SAVINO y RENNELLA, 1948) y Brasil (GUIDA, 1949). Sin embargo, es necesario tener presente que, debido a la falta de medios adecuados de diagnóstico, es posible hayan pasado desapercibidas. En el Perú, hasta la fecha parece que no se hubiera verificado aún la existencia de la *L. canicola*, no obstante la opinión de algunos veterinarios quienes han observado ciertas afecciones del perro, las que por sus manifestaciones clínicas podrían asimilarse a la leptospirosis canina. La única publicación al respecto (ROGGERO, 1946), da a conocer los resultados de una serie de reacciones de aglutinación-lisis realizadas con el suero de 30 perros de la ciudad de Lima, reacciones en las que se empleara como antígeno cultivo de algunas cepas de leptospirosis aisladas de ratas. Tres de las 30 muestras de suero (10%) reaccionaron a diluciones significantes (una a 1:100; otra a 1:200; y la restante a 1:400). Pero, desde que las cepas usadas como antígeno no habían sido identificadas, desgraciadamente no es posible saber a qué cepa serológica pertenecían los anticuerpos presentes en el suero de los tres perros mencionados.

A pesar de que también el gato suele ser infectado por algunas cepas de leptospirosis patógenas para el hombre, no cabe duda que tiene escasa importancia epidemiológica, por cuya razón no se le ha prestado mayor atención.

Considerando la transcendencia que tiene en cada país el conocimiento adecuado de los diversos factores que determinan y condicionan la infección a leptospirosis en la especie humana, en el Instituto Nacional de Salud Pública, Lima, Perú, desde 1955 se realiza detenidos estudios epidemiológicos en este sentido. Como resultado de tales investigaciones en ocasión anterior se dio a conocer la infección del perro por la *L.*

bataviae (HERRER et al., 1957); y en esta oportunidad se ofrecen los resultados obtenidos al tratar de determinar las cepas serológicas que en la ciudad de Lima y otras localidades de la Costa infectan al perro y al gato así como la frecuencia con que lo hacen y algunas otras particularidades epidemiológicas.

MATERIAL Y METODOS

1) *Procedencia de los animales*. El número total de perros utilizados es de 445. Por circunstancias especiales algunos de ellos no fueron objeto de todas las observaciones que se indican más abajo, lo que se especifica oportunamente al ofrecer los resultados de cada tipo de observación. Todos los animales utilizados en estos estudios fueron obtenidos a través de la Campaña Antirábica que realiza el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social del Perú. Una parte de los perros procedían de las ciudades de Lima, Callao y balnearios cercanos, donde fueron capturados por encontrarse vagando; el resto, así como todos los gatos, habían mordido a personas y por tal motivo fueron conducidos al Instituto de Salud Pública, División de Diagnóstico, para verificar la posible infección por la rabia, animales que una vez cumplido el respectivo período de cuarentena nos eran proporcionados. En este grupo se encontraban perros que habían sido enviados de algunas localidades alejadas, algunas de ellas distantes 200 a 300 kilómetros de la ciudad de Lima. Cuando no era posible conocer con seguridad la procedencia de los perros, como en el caso de los que fueran capturados vagando, se les consideraba en el grupo de "Procedencia desconocida". Salvo casos excepcionales, la edad de los perros y los gatos estudiados no fue posible conocer, por lo que se ha dejado de considerar este factor en relación con la incidencia de la leptospirosis.

Como se deseaba determinar también la incidencia de la infección canina en relación con las estaciones del año, durante el transcurso de las investigaciones se trató de utilizar mensualmente un número adecuado de perros, de manera que al agruparlos por estaciones del año las cifras fueron comparables. En 1955, año en que se inició los estudios, éstos se realizaron tan sólo en los meses de abril, julio, octubre y diciembre, pero en 1956 y 1957 se efectuaron durante todos los meses del año. Desde que los animales habían sido capturados por personas extrañas y luego confinados en encierros rigurosos e incómodos para muchos de ellos, era difícil apreciar el estado de salud de los mismos al momento de ser sacrificados.

2) *Reacciones serológicas*. La presencia de anticuerpos contra las leptospiras en la sangre de los animales fue determinada por medio de la reacción de aglutinación-lisis (antígeno vivo), empleando las siguientes cepas serológicas de leptospiras: 1) *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg, 2) *L. canicola* Ruebush, 3) *L. autumnalis* AB Akiyama A, 4) *L. bataviae* Van Tienen, 5) *L. sejroe* Mallerdsdorf, 6) *L. pomona* S91, 7) *L. ballum* S102, 8) *L. hyos*, 9) *L. grippotyphosa* Moscow V, 10) *L. hebdomadis* y 11) *L. pyrogenes* Salinem. Todas estas cepas habían sido obtenidas del Leptospira Research Laboratory, Communicable Disease Center, Public Health Service, Chamblee, Georgia, en marzo de 1955 y desde entonces conservadas por nosotros en el medio Vervoort. Para emplearlas como antígeno en las reacciones de aglutinación-lisis, eran cultivadas en el citado medio a 30°C. durante 8 a 15 días. En algunas ocasiones, pero tan sólo con fines comparativos, se usó también cepas aisladas por nosotros y que habían sido identificadas como *L. canicola*.

De manera preliminar, para realizar las reacciones serológicas las muestras de suero eran diluídas a 1:10, 1:100 y 1:1,000 en suero fisiológico (solución de NaCl al 0.85%) estéril. De cada dilución se colocaba 0.1 c.c. en sendos tubitos de Kahn, al que se agregaba cantidad igual del antígeno. Después de agitar convenientemente la mezcla del antígeno con las diluciones del suero, se las dejaba en reposo durante 20 a 24 horas a la temperatura del laboratorio (18 a 26°C.). La observación de las reacciones se efectuaba al campo oscuro con un aumento microscópico de 120 diámetros, usando simplemente agua destilada entre el condensador y la lámina porta objetos. El grado de las reacciones se indicaba por medio de cruces, correspondiendo cuatro cruces (++++) a aquellas en las que todas las leptospiras habían sido aglutinadas o lisadas. Una cruz (+) correspondía a las reacciones débiles, en las que las leptospiras aglutinadas o lisadas se calculaban tan sólo en una cuarta parte en comparación con el respectivo control. De idéntica manera, dos (++) y tres cruces (+++) correspondían a reacciones en las que los microorganismos habían sido afectados en la proporción de la mitad o las dos terceras partes, respectivamente. Cuando existía duda acerca del grado de alguna reacción, se recurría al respectivo control (suero fisiológico más el correspondiente antígeno) que de manera rutinaria se hacía en todos los casos. Los sueros que en la prueba preliminar resultaban positivos, eran objeto de una titulación posterior. En estos casos dichos sueros se diluían a 1:100, 1:300, 1:1,000, 1:3,000.

1:10,000, y 1:30,000. En ninguna ocasión se hizo necesario usar mayores diluciones. Aunque rutinariamente se anotaban las reacciones que ofrecían las muestras de suero aún a diluciones de 1:10, se adoptó el criterio de considerar como positivas tan sólo a aquellas que ofrecían título de 1:100 o mayor con dos cruces.

3) *Aislamiento de las cepas y su identificación.* A fin de obtener sangre para los hemocultivos y las reacciones serológicas, en primer lugar los animales fueron sangrados, corrientemente de la vena yugular. Con unas cuantas gotas de esta sangre se inocularon dos tubos de cultivo, uno en el medio de Vervoort modificado (WOLFF, 1954) * y el otro en el de Noguchi para leptospiras en 113 de los perros estudiados, no así en los restantes ni en los gatos. Enseguida los animales eran sacrificados, inyectándoles aire en la vena; luego se extraía el riñón del que punzándosele con una pipeta Pasteur, se hicieron tres tubos de cultivo, uno en el medio de Noguchi y los otros dos en el de Vervoort. Los cultivos, incubados a 30°C., eran periódicamente revisados al campo oscuro cuando menos por espacio de un mes, empleando corriente-

* En el medio Vervoort que usamos, la peptona Witte se sustituye por la Proteosa peptona Nº 3, de la casa Difco, y el suero del conejo no se inactiva. Además, en la preparación de dicho medio la experiencia nos ha sugerido ligeras modificaciones al proceso que recomienda Wolff (1954). Lo preparamos en la siguiente forma:

- 1) Un gramo de Proteosa peptona Nº 3 se disuelve en un litro de agua destilada, haciendo luego que hierva ligeramente.
- 2) Se agrega 200 c.c. de solución Ringer y se calienta hasta que hierva.
- 3) Se agrega 100 c.c. de una mezcla de soluciones de fosfatos con pH 7.2 (27 c.c. sol. KH_2PO_4 al 9.075 por mil y 73 c.c. sol. Na_2HPO_4 al 11.870 por mil). Se calienta hasta que hierva.
- 4) Se agrega 2 c.c. de ácido fosfórico normal y se hace hervir cinco minutos.
- 5) Cuando la solución ha enfriado, filtrar a través de papel. Debe emplearse papel de filtro suficientemente fino como para retener todo el precipitado que ocasiona la adición del ácido fosfórico.
- 6) Se verifica el pH, que debe ser 7.2 a 7.4. De lo contrario ajustarlo usando soluciones decinormal de NaOH y HCl.
- 7) Esterilizar al autoclave.
- 8) Cuando está lo anterior alrededor de 20°C. agregar 10 por ciento de suero normal de conejo que contenga algo de hemoglobina.
- 9) Se reparte en tubos y se controla la esterilidad a 36°C. durante 24 horas.

El medio de Vervoort preparado en la forma antedicha lo venimos usando por espacio de tres años, obteniendo con regularidad resultados satisfactorios.

mente un aumento de 120 diámetros. Sólo en casos especiales se utilizó laminilla cubreobjetos y mayores aumentos microscópicos.

Para la identificación de las cepas aisladas, éstas, utilizadas como antígeno, fueron sometidas a reacciones de aglutinación-lisis con los sueros inmunes correspondientes a las 11 cepas serológicas de referencia. Al principio también los referidos sueros inmunes fueron proporcionados por el *Leptospira* Research Laboratory, Communicable Disease Center, Public Health Service, Chamblee, Georgia, pero posteriormente fueron preparados por nosotros utilizando las cepas provenientes del referido laboratorio. En la preparación de tales sueros inmunes se utilizó conejos y la técnica sugerida por WOLFF (1954).

4) *Observaciones al campo oscuro en busca de leptospiras en el riñón de los perros.* Después de haberse efectuado los cultivos del riñón, de éste se tomaron dos pequeños trozos. Uno era colocado en una solución de formol al 10 por ciento, para investigaciones ulteriores; y, el otro, se trituroó en una pequeña cantidad de suero fisiológico estéril, dentro de una placa Petri y simplemente con tijeras. De la parte flúida de tal triturado se extrajo una pequeña porción, la que fue observada al campo oscuro entre lámina y laminilla con un aumento de 360 liámetros.

RESULTADOS

A) *Perros.*

1) *Frecuencia de los perros con anticuerpos contra leptospiras y su distribución por localidades.* Se encuentran expuestos en el cuadro I los resultados generales obtenidos en las reacciones de aglutinación-lisis con el suero de 444 perros comprendidos en las observaciones serológicas. Se ha agrupado dichos resultados por localidades o zonas de procedencia de los perros, de manera que pueda obtenerse informaciones acerca de la presencia de los anticuerpos para dichas localidades.

De los 444 perros estudiados 206 (46.4%) presentaron anticuerpos contra leptospiras en la sangre, a título entre 1:100 y 1:30,000, anticuerpos que en la mayoría de los casos reaccionaron simultáneamente con más de una cepa serológica. En estos casos al confeccionar el cuadro I se ha considerado tan sólo la cepa frente a la cual la reacción ofrecía título más alto; y, en algunos casos, en los que la reacción cruzada mostraba igual título al mismo tiempo frente a *L. canicola* y algu-

CUADRO I.— Resultados generales obtenidos en las reacciones serológicas de aglutinación-lisis, agrupando los perros estudiados por zonas o localidades.

	Total de perros observ.	Presencia de anticuerpos para:						Total positivos	% positivos
		L. ictero.	L. canico.	L. autum.	L. batav.	L. ballum.	L. hyos		
Lima	184	10	62	1	1	1	1	76	41.3 %
Callao	36	2	15	1				18	50.0 "
Miraflores	40	1	21					22	55.0 "
San Isidro	10		5					5	50.0 "
Barranco, Chorrillos, Surco y Atocongo	37	2	15					17	45.9 "
Magdalena, San Miguel y Pueblo Libre	23x	1	7		1			9	39.1 "
La Molina, Vitarte y Chacabayo.	11	1	4		1			6	54.5 "
Chosica	17	1	9					10	58.8 "
Pucuzana, Mala, Cañete e Ica	9		5					5	55.5 "
Paján y Chepen	2		1					1	50.0 "
Puente Piedra, Ancón y Huaral	8		3					3	37.5 "
Procedencia desconocida	67	6	27		1			34	50.0 "
TOTALES	444	24	174	2	4	1	1	206	46.4 %
Porcentaje en relación al total de positivos		11.6	84.5	1.0	1.9	0.5	0.5		

x En este grupo se considera al perro Nº 337 del que se aisló una cepa de *L. bataviae*, lo que se ha comunicado en una publicación anterior (Herrer et al., 1957). En cambio no se toma en cuenta los seis perros de los que en aquella ocasión sólo se extrajera sangre para las reacciones serológicas y hemocultivos.

na otra cepa (Véase cuadro V, perros número 74, 321 y 403), para los fines del cuadro I se ha considerado tales anticuerpos como debidos a *L. canicola*. De esta manera se obtiene que, de los 206 perros con reacción serológica positiva, 174 (84.5%) lo fueron para *L. canicola*; 24 (11.6%) para *L. icterohaemorrhagiae*; y los 8 restantes (3.9%) para *L. autumnalis* (2), *L. bataviae* (4), *L. ballum* (1) y *L. hyos* (1). De los 206 perros con anticuerpos en la sangre a título de 1:100 o mayor, 66 (32%) reaccionaron simultáneamente frente a dos cepas diferentes y, 11 (5.3%), frente a tres cepas. Del total de 77 reacciones cruzadas, 60 (78.0%) comprendían a *L. ballum*, frecuentemente junto a *L. canicola*. Las otras cepas que intervinieron en las reacciones cruzadas, en orden de frecuencia son las siguientes: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. autumnalis*, *L. hyos*, *L. bataviae* y *L. pomona*.

No obstante de que el número de perros procedentes de cada localidad, en la mayoría de los casos es bastante reducido, resulta ilustrativo que en todas ellas existan especímenes con anticuerpos contra leptospiras en la sangre, y en proporciones notablemente semejantes (del 37.5 al 58.8%). Esto sin duda significa que la leptospirosis canina está extendida más o menos uniformemente en el Perú, siquiera a lo largo de la Costa, región donde están ubicadas todas las localidades consideradas en el cuadro I.

2) *Título de los anticuerpos presentes en la sangre de los perros.* Como se puede apreciar en el cuadro II, el 74.8 por ciento de las reacciones positivas lo fueron a título que varía entre 1:100 y 1:300. A 1:1,000 reaccionaron el 17.9 por ciento de los sueros positivos, y el 7.3 por ciento restante a título entre 1:3,000 y 1:30,000. Es de interés consignar que tan sólo en un caso se obtuvo reacción positiva a la dilución de 1:30,000, caso en el que resultó negativo el correspondiente cultivo del riñón. En cambio, los dos perros cuyo suero ofrecieron reacciones positivas a 1:10,000 proporcionaron cultivos positivos (P 128 y P 292, cuadro V).

Como ya se ha dicho, por lo general los sueros reaccionaron simultáneamente con dos y hasta con tres cepas serológicamente diferentes, reacciones en las que casi siempre intervenía *L. ballum*. Hubo ocasiones en las que ciertos sueros reaccionaron a igual título frente a *L. ballum* y *L. canicola*, siendo ésta la cepa infectante (P 74, P 321 y P 339, cuadro V). Por otro lado, el perro (P 367, cuadro V) del que se obtuviera en cultivo la cepa de *L. hyos*, ofreció en la reacción de aglu-

tinación-lisis título de 1:1,000 para *L. bataviae* y tan sólo de 1:300 para la respectiva cepa homóloga. Sin duda este es un caso de los que se conocen con el nombre de "reacción paradógica".

CUADRO II.— Título de los anticuerpos obtenidos en el suero de los perros.

Dilución del suero	Cepas serológicas con las que reaccionaron						Total	Porcentaje
	L. icteroh.	L. canicola	L. autumn.	L. bataviae	L. ballum	L. hyos		
1:100	8	66	1	2		1	78	37.9 %
1:300	14	60	1	1			76	36.9 ..
1:1,000	2	33		1	1		37	17.9 ..
1:3,000		12					12	5.8 ..
1:10,000		2					2	0.9 ..
1:30,000		1					1	0.5 ..
	24	174	2	4	1	1	206	

3) *Prevalencia de la leptospirosis en relación con las estaciones del año.* Este punto se trata de determinar utilizando las informaciones que proporcionan tanto las investigaciones serológicas así como los cultivos. En el cuadro III están expuestos los resultados obtenidos en la verificación de anticuerpos en la sangre de los perros, presentados en forma que sea posible observar la incidencia mensual durante los 12 meses del año; cosa idéntica se hace en el cuadro IV para los cultivos. Además, en la figura 1 se ofrece la representación gráfica, comparativa, de los resultados obtenidos por ambos métodos.

Al observar el cuadro III así como la gráfica correspondiente en la figura 1, se nota que la presencia de los anticuerpos contra las leptospiras en la sangre de los perros estudiados ha sido más o menos uniforme durante el transcurso del año, lo que parecería indicar que la incidencia de la leptospirosis canina, a diferencia de lo que acontece en muchas partes, en el Perú sería más o menos uniforme durante todo el año. Resultados idénticos se obtiene si se determinar la incidencia de los referidos anticuerpos en relación con las estaciones, ya que se obtiene lo siguiente:

CUADRO III.— Incidencia de los anticuerpos contra leptospiras en el perro en relación con los meses del año.

	1 9 5 5		1 9 5 6		1 9 5 7		1955 - 1957		
	Total	Posit.	Total	Posit.	Total	Posit.	Total	Posit.	Porcent.
	Enero			35	18	18	6	53	24
Febrero			34	17	20	9	54	26	48.1 "
Marzo			26	14	15	9	41	23	56.1 "
Abril	33	15	3	3	13	7	49	25	51.0 "
Mayo			30	14	5	2	35	16	45.7 "
Junio			21	8	11	4	32	12	37.5 "
Julio	7	4	16	8	7	1	30	13	43.3 "
Agosto			8	3	22	11	30	14	46.7 "
Setiembre			7	3	14	5	21	8	38.1 "
Octubre	16	9	11	6	13	5	40	20	50.0 "
Noviembre			16	5	14	7	30	12	40.0 "
Diciembre	3	0	19	9	7	4	29	13	44.8 "
T O T A L	59	28	226	108	159	70	444	206	46.4 %

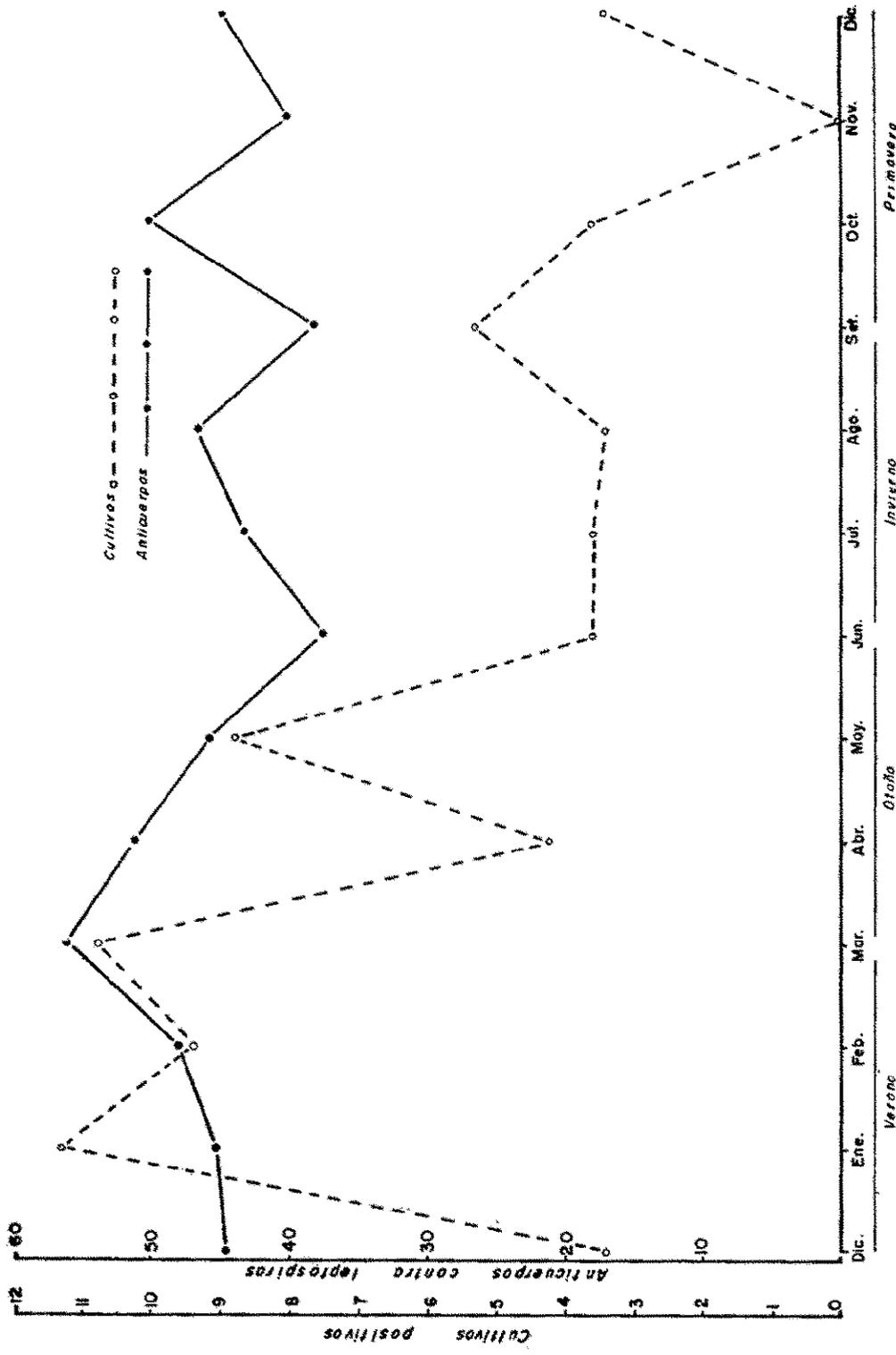


Fig. 1.—Representación gráfica de la prevalencia de la leptospirosis canina durante los 12 meses del año, determinada: a) por medio del cultivo de rifton, y b) serológicamente.

Verano (enero-marzo)	49.3 %
Otoño (abril-junio)	45.7 ..
Invierno (julio-setiembre)	43.2 ..
Primavera (octubre-diciembre)	45.4 ..

La uniformidad en la incidencia de los anticuerpos contra las leptospiras en la sangre de los perros estudiados, se debe a que el método serológico no es adecuado para verificar la incidencia estacional de la leptospirosis canina, puesto que, como es sabido, los anticuerpos contra las leptospiras permanecen en la sangre durante lapsos considerables, a veces por espacio de muchos años con título de 1:100 y 1:300. De esta manera muchos perros que ya han pasado la infección continúan ofreciendo resultados serológicamente positivos por considerable espacio de tiempo.

A diferencia de lo anterior, de acuerdo con el resultado de los cultivos hechos del riñón sí existe mayor incidencia de la leptospirosis canina durante los meses de verano (enero-marzo), lo que se puede apreciar en el cuadro IV y la respectiva representación gráfica en la figura 1. Agrupando los datos del cuadro IV por estaciones del año, los resultados son más expresivos aún, pues indican claramente que en el verano es mucho más alta la infección a leptospiras en el perro. La incidencia estacional, determinada por este método, es la siguiente:

Verano	10.5 %
Otoño	5.4 ..
Invierno	3.9 ..
Primavera	2.5 ..

Como se comprenderá, desde que el resultado positivo de los cultivos hechos del riñón indica infección actual por las leptospiras, esta técnica se presta bien para determinar la incidencia estacional de la leptospirosis canina. Sin embargo, hay que tener presente también que no siempre la presencia de leptospiras en el riñón del perro significa necesariamente una infección reciente, pues algunos investigadores han observado que puede haber leptospirosis canina, en algunos casos, hasta los tres años de haber adquirido el animal la infección (McINTYRE y MONTGOMERY, 1952). Con todo, es de suponer que tales casos han de ser excepcionales y, por consiguiente, carecen de importancia en estudios como el presente, en el que las observaciones se han realizado de manera sistemática cuando menos durante 1956 y 1957.

CUADRO IV. — Resultados de los cultivos hechos del riñón de los perros, tallados por meses.

	1955			1956			1957			1955 - 1957			
	Tot.	Pos.	Con.	Tot.	Pos.	Con.	Tot.	Pos.	Con.	TOTAL	FOSTI.	Cont.	Porcen.
Enero				35	5		18	1		53	6		11.3 %
Febrero				34	3	1	20	2		54	5	1	9.4 "
Marzo				26	2	3	15	2	1	41	4	4	10.8 "
Abril	33	1		3	1		13		1	49	2	1	4.2 "
Mayo				30	3	1	5			35	3	1	8.8 "
Junio				21		4	11		1	32	1	4	3.6 "
Julio	7		1	16	1	1	7			30	1	2	3.6 "
Agosto				8			22	1	1	30	1	1	3.4 "
Setiembre				7			14	1	2	21	1	2	5.3 "
Octubre	6			11	1	1	13		1	30	1	2	3.6 "
Noviembre				16		7	14			30		7	0.0 "
Diciembre	3			20	1	1	7			30	1	1	3.4 "
TOTAL	49	1	1	227	17	19	159	8	6	435	26	26	6.4 %

4) *Incidencia de la leptospirosis en relación con el sexo de los perros.* A juzgar por los resultados de las observaciones serológicas, como en otras partes aquí también los perros machos sufrían la infección con mayor frecuencia que las hembras. Así, de los 444 perros estudiados 330 eran machos y los 114 restantes hembras, verificándose la presencia de anticuerpos en la sangre del 50 por ciento (165) en los machos y tan sólo del 35.9 por ciento (41) en las hembras. La notable diferencia existente entre el número de perros de uno y otro sexo que se han estudiado no se debe a selección alguna por parte nuestra, sino más bien a la preferencia que la gente tienen por los perros machos. En este sentido, es costumbre sacrificar gran parte de las hembras cuando recién nacen, de manera que ordinariamente la población canina está constituida en gran parte por machos.

Es explicable que la leptospirosis sea más frecuente en los perros machos, desde que ellos se ponen en contacto con mayor frecuencia con la orina, de preferencia durante el periodo de celos de las hembras.

5) *Aislamiento de las cepas, identificación de las mismas y relación con el título de los anticuerpos en cada caso.* En 435 perros se consiguió realizar los cultivos del riñón y en 113 de ellos también hemocultivos, obteniendo resultados positivos tan sólo en los cultivos del riñón. Como resultado de estos cultivos fue posible aislar 26 cepas (6.4%), de las cuales se perdieron tres por contaminación antes de la identificación serológica. Las otras 23 fueron identificadas colocándolas frente a los respectivos sueros inmunes correspondientes a las 11 cepas serológicas de procedencia norteamericana y que las utilizáramos como referencia. En el cuadro V está expuesta la relación de los perros que ofrecieran cultivos positivos, así como el resultado de la identificación de las cepas aisladas y el título que se obtuviera en las reacciones de aglutinación-lisis con el suero de cada uno de los referidos perros. De acuerdo con el citado cuadro, de las 23 cepas identificadas 21 (91.3%) correspondieron a *L. canicola*, una (4.3%) a *L. bataviae* y la restante (4.3%) a *L. hyos*.

A semejanza de lo determinado por medio de las reacciones serológicas, también en los perros con cultivo positivo es posible observar una amplia distribución en cuanto se refiere a los lugares de procedencia. De esta manera, los resultados de los cultivos ratifican la presunción hecha a base de los anticuerpos observados en la sangre de los perros, en el sentido de que la leptospirosis canina esté presente en la mayoría de las localidades de donde procedieran los perros estudiados.

CUADRO V.— Relación de los perros con cultivo positivo para leptospiras, identificación de las cepas aisladas, y resultados de las reacciones serológicas en cada caso.

Número del perro	Procedencia	Cepas con las que reaccionaron los sueros					Cepa identificada como:
		L. icteroh.	L. canicola	L. bataviae	L. ballum	L. hyos	
P 32	Miraflores		3,000		300		L. canicola
P 69	Pueblo libre		1,000		300		"
P 74	Lima		100		100		"
P 75	Barranco		300		100		"
P 84	Chosica		1,000		300		"
P 94	Callao		1,000		300		"
P 100	Lima		1,000		100		"
P 115	"	100	3,000		300		"
P 128	Miraflores		10,000		1,000		"
P 130	Magdalena		3,000		1,000		"
P 133	Desconocida		1,000		300		"
P 156	"		3,000		300		"
P 166	Pucusana		1,000		100		"
P 176	Miraflores	100	3,000		300		"
P 178	Callao	100	1,000		300		"
P 224	Desconocida		1,000		100		"
P 248	Lima		100		100		"
P 271	Chosica		1,000		300		"
P 292	Desconocida		10,000		1,000		No identificada
P 321	"		300		300		L. canicola
P 322	Lima	300	3,000		1,000		"
P 337	San Miguel			300			L. bataviae
P 339	Lima	300	3,000		3,000		L. canicola
P 367	La Molina			1,000		300	L. hyos
P 393	Chorrillos	100	1,000		300		No identificada
P 403	Chosica		100		100		"
26 perros		6	24	2	22	1	

De acuerdo con el cuadro V, en lo que respecta a los resultados de las reacciones de aglutinación-lisis efectuados con el suero de los 26 perros con cultivo positivo, se aprecia lo siguiente: a) que, con sólo tres excepciones (P 166, P 248 y P 337), todos los demás sueros ofrecieron reacciones cruzadas, de preferencia con *L. ballum*, y a veces al mismo título que el de la respectiva cepa homóloga (P 74, P 321 y P 403); y b) que 20 (76.9%) de los perros con cultivo positivo presentaron anticuerpos en la sangre con título que fluctuó entre 1:1,000 y 1:10,000; y los seis (23.1%) restantes, con título de 1:100 y 1:300. Cabe recordar aquí que el único perro cuyo suero reaccionara a una dilución de 1:30,000 ofreció resultado negativo al cultivo del riñón. Excepción hecha de este caso, se puede apreciar cómo los perros con infección actual tienen anticuerpos en la sangre con título relativamente alto.

Aunque de manera rutinaria se hicieran los cultivos simultáneamente en el medio Vervoort y el de Noguchi para leptospiras, tan sólo en tres ocasiones se logró aislar las respectivas cepas en el citado medio de Noguchi. Contrasta con esto los resultados obtenidos con el medio de Vervoort, pues en éste se aisló las leptospiras en todos los casos (26) con cultivo positivo. Además, también la contaminación fue mucho más frecuente en el medio de Noguchi.

6) *Observaciones al campo oscuro.* En 432 perros fue posible realizar observaciones al campo oscuro del triturado del riñón, logrando observar leptospiras en seis (1.4%) de ellos. Estos seis perros también proporcionaron cultivos positivos, cinco de cuyas cepas fueron identificadas como *L. canicola*; la restante se perdió por contaminación antes de su identificación. Los sueros de los perros positivos al campo oscuro reaccionaron frente al antígeno de *L. canicola* a títulos que variaron entre 1:1,000 y 1:10,000, presentando al mismo tiempo reacciones cruzadas con *L. ballum*.

B) Gatos.

De los 34 gatos estudiados tan sólo uno fue positivo, tanto serológicamente como al cultivo del riñón. Se aisló de dicho animal una cepa de leptospira, la que fue identificada como *L. canicola*. La reacción de aglutinación-lisis con el suero de dicho gato fue positiva a un título de 1:1,000 frente al antígeno de *L. canicola* Ruebush y no ofreció reacción cruzada con ninguna otra cepa.

El haber verificado la infección de un gato por la *L. canicola* y no por la *L. icterohaemorrhagiae*, como sería de suponer, seguramente no tiene mayor trascendencia. Por lo demás, dado el pequeño número de gatos estudiados no es posible deducir nada acerca de la incidencia de la leptospirosis en dicho animal doméstico. Con todo, hay que suponer que no desempeña gran rol como reservorio o diseminador de cepas patógenas para el hombre. En efecto, por un lado su número siempre es reducido; y, por otro, tiene hábitos que no le permiten estrecho contacto con otros animales de donde podría adquirir la infección.

DISCUSION

Incidencia de la leptospirosis canina y su relación con los casos humanos observados en el Perú. Los resultados tanto de las investigaciones serológicas así como de los cultivos, indican con claridad que es considerablemente alta la incidencia de la leptospirosis canina en la ciudad de Lima y las demás localidades de donde procedían los animales estudiados. En efecto, de 444 perros motivo de estudio, en 206 (46.4%) se observó anticuerpos en la sangre a título que fluctúan entre 1:100 y 1:30,000; y, de 435 perros en los que se hiciera cultivo del riñón, en 26 (6.4%) se logró aislar sendas cepas de leptospiras. Hay que suponer que esta alta incidencia leptospirósica en un animal que mantiene cotidiano contacto con el hombre, como es el perro, forzosamente ha de alcanzar también en el Perú a la especie humana, tal como sucede en otros países (HAUNZ y CARDY, 1952). El no haberse citado hasta ahora la infección del hombre por *L. canicola*, se explicaría recordando que esta cepa serológica con frecuencia da lugar en la especie humana a infecciones benignas, las que pueden pasar desapercibidas. Además, no ofrece los mismos síntomas que las infecciones debidas a la *L. icterohaemorrhagiae*, siendo por consiguiente posible que los médicos le presten poca atención. Con todo, cabe la posibilidad de que siquiera algunos de los casos diagnosticados en el Perú como leptospirosis, ya sea a base del aislamiento del parásito o simplemente por la sintomatología que presentaran los respectivos pacientes, pueden haberse debido a la *L. canicola*, pues de acuerdo a nuestras informaciones en tales casos no se ha tratado de identificar serológicamente la cepa infectante.

Cepas serológicas presentes en el perro. Por otro lado, el haber aislado en cultivo *L. bataviae* y *L. hyos*, a partir del riñón de los perros, igualmente indica que tales cepas están en condiciones ecológicas de infectar al hombre en las localidades de donde procedieran los

respectivos animales infectados. Teniendo en cuenta la manera como se disemina la *L. bataviae* en países como Italia, donde constituye una enfermedad ocupacional de los obreros dedicados al cultivo del arroz (BABUDIERI, 1953), hay que suponer que en el Perú puedan existir situaciones semejantes.

El aislamiento de las cepas de *L. bataviae* y *L. hyos* a partir del cultivo de riñón de los perros y la verificación, por los autores (datos aún no publicados), de anticuerpos en el suero de varias personas tanto para *L. canicola* así como para *L. bataviae* obligan tener en mente estos hechos en los casos humanos que se sospecha de leptospirosis en el Perú. Por esto, en el diagnóstico serológico de tales casos, además de la *L. icterohaemorrhagiae* debería usarse las cepas *L. canicola*, *L. bataviae*, *L. hyos* y *L. pomona*. Aunque hasta la fecha en el Perú no se ha aislado la *L. pomona*, de acuerdo con estudios que tenemos en prosecución es frecuente la presencia de anticuerpos para esta cepa en el ganado vacuno y el porcino de los establos que se hallan en las inmediaciones de la ciudad de Lima.

Relación entre las cepas serológicas predominantes y la procedencia de los animales infectados. Los estudios cuyos resultados se exponen en esta oportunidad permiten observar cierta relación entre determinadas cepas y la procedencia del animal infectado. Así, el perro del que se obtuviera en cultivo la *L. hyos* provenía de una zona rural (Hda. Monterrico Chico), donde existe abundante ganado vacuno, conocido huésped natural de dicha cepa. El cultivo de la *L. bataviae* se obtuvo de un perro que cuatro meses atrás había sido traído del departamento de Lambayeque, región donde se ha verificado alta incidencia de anticuerpos para dicha cepa en la población obrera de una hacienda. El huésped habitual de la *L. bataviae* parece variar un poco de acuerdo con las regiones, y en el Perú faltaría determinarlo. Por otro lado, los resultados serológicos (cuadro I) muestran como en los perros de "procedencia desconocida" la incidencia de anticuerpos para *L. icterohaemorrhagiae* es relativamente alta. A este respecto conviene informar que tales perros casi en su totalidad habían sido capturados vagando, muchos de ellos en basurales, lo que supone se trataba de animales que tenían la oportunidad de alimentarse de ratas, huésped habitual de la *L. icterohaemorrhagiae*.

Esta serie de hechos no hace más que recordar el que cada cepa patógena de leptospira tiene corrientemente un huésped habitual o principal, pero que bajo determinadas circunstancias puede infectar a otros animales y aún al hombre.

SUMARIO

Durante 1955 a 1957 se han realizado investigaciones acerca de la leptospirosis en el perro y el gato en la ciudad de Lima con la finalidad de determinar las cepas serológicas que infectan a dichos animales y la incidencia de la infección en relación con diversos factores. Todos los gatos y la mayoría de los perros estudiados procedían de la ciudad de Lima y sus inmediaciones; el resto de los perros, habían sido enviados a Lima procedentes de diversas localidades que se hallan a lo largo de la Costa. Las investigaciones efectuadas en dichos animales consisten en: a) reacciones serológicas de aglutinación-lisis, en las que se empleó 11 cepas diferentes de leptospirosis; b) cultivos de la sangre y el riñón; y c) observaciones al campo oscuro del triturado de riñón. Los principales resultados obtenidos son los siguientes:

1. De 444 perros en los que se realizaron las reacciones serológicas, en 206 (46.4%) se ha verificado la presencia de anticuerpos a título que varió entre 1:100 a 1:30,000. Los anticuerpos verificados correspondieron casi en su totalidad a *L. canicola* Ruebush (84.5%), y *L. icterohaemorrhagiae* AB Winjberg (11.6%).

2. De los 206 perros con reacción serológica positiva, 66 (32%) reaccionaron simultáneamente frente a dos cepas y 11 (5.3%) frente a tres. En tales reacciones cruzadas la cepa *L. ballum* fue la que ofreció resultados positivos con mayor frecuencia (78.0%).

3. En cuanto al título de los anticuerpos, en 154 casos (74.8%) fue entre 1:100 y 1:300; en 49 (23.8%), entre 1:1,000 y 1:3,000; y en los tres restantes (1.4%), entre 1:10,000 y 1:30,000.

4. A semejanza de lo que sucede en otras partes, la incidencia de la leptospirosis canina es mayor durante los meses de temperatura más elevada (enero-marzo); del mismo modo, la incidencia es más alta en los animales machos (50%) que en las hembras (35.9%). Ambos datos han sido obtenidos a base de los cultivos de riñón.

5. En 435 perros se hicieron cultivos de riñón y, en 113, tanto de riñón como también de la sangre, consiguiendo en 26 casos aislar las respectivas cepas, todas las cuales procedieron tan sólo del cultivo de riñón. De estas cepas, 23 fueron identificadas, correspondiendo 21 a *L. canicola* y las dos restantes a *L. bataviae* y *L. hyos.* respectivamente.

6. Seis (1.4%) de los 432 perros en los que se realizara la observación al campo oscuro del triturado de riñón ofrecieron resultados positivos.

7. Tan sólo 34 gatos fueron estudiados, de los cuales uno ofreció resultado positivo tanto serológicamente como también al cultivo de riñón. La reacción de aglutinación-lisis con el suero de dicho animal tuvo un título de 1:1,000 frente al antígeno de *L. canicola* Ruebush. La cepa aislada también fue identificada como *L. canicola*.

8. Como resultado de las investigaciones realizadas se sugiere la conveniencia de emplear las cepas *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. bataviae*, *L. pomona* y *L. hyos* en aquellos casos humanos sospechosos de leptospirosis que se presenten en el Perú.

SUMMARY

During 1955-57, investigations were conducted on leptospirosis in dogs and cats of Lima and the adjacent costal region, for the purpose of determining: a) the incidence of infection, and b) the type of strains present in these animals. All cats and a majority of the dogs were collected from Lima, the remaining dogs being obtained from outlying areas. The results were as follows:

1. 444 sera of dogs were examined by the agglutination-lysis reaction. Leptospiral antibodies were observed in 206 specimens (46.6%), and indicated infections with *L. canicola* Ruebush (84.5%), *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg (11.6%), *L. bataviae* Van Tienen (2.0%), *L. autumnalis* AB Akiyama A (1.0%), *L. ballum* S102 (0.5%), and *L. hyos* (0.5%).

2. Of the serologically positive dogs, 66 (32.0%) showed cross reactions to two other strains, and 11 specimens (5.3%) gave cross reactions with three strains, with *L. ballum* being the most frequent cross reacting type (78.0%).

3. The titers of antibodies in the 206 dogs sera ranged from 1:100 to 1:300 in 154 specimens (74.8%), and from 1:1,000 to 1:3,000 in 49 specimens (23.8%). In only two instances were titers of 1:10,000 observed, and in one sample 1:30,000.

4. In 435 dogs were made cultures of kidney and in 113 from the blood and kidney, obtaining 26 leptospiral strains all from the kidney.

Twenty three of these strains were identified, 21 as *L. canicola* and the other two as *L. bataviae* and *L. hyos*, respectively.

5. These studies confirmed previous observations in which the incidence of infection in dogs was highest during the summer months, and appeared in males more frequently (50%) than females (35.9%).

6. Only 6 (1.4%) positive dark field observations were made of 432 dogs examined.

7. Thirty four cats were examined and only one positive leptospirosis infection was observed (kidney isolate of *L. canicola*, and a serum antibody agglutinating titer of 1:1,000).

8. The results of these studies suggest the use of *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. bataviae*, *L. pomona*, and *L. hyos* as the predominant types in the serological investigation of suspected human cases of leptospirosis in the Lima area.

REFERENCIAS

- ALEXANDER, A. D., WETMORE, P. W., EVANS, L. B., JEFFRIES, H., y GLEISER, C.
 1955 Classification of leptospiral isolates from Malaya, Thailand and North Borneo. *Am. J. trop. Med.*, 4: 492-506.
- ALSTON, J. M., y BROOM, J. C.
 1944 The action of penicillin on leptospira and on leptospiral infections in guinea-pigs. *Brit. med. J.*, 2 (4378): 718-719.
- BARUDIERY, B.
 1953 Epidemiology of leptospirosis in italian rice-fields. En "Advances in the control of zoonoses", World Health Organization, Serie monográfica No. 19: 117-126.
 1955 Studio sierologico dei ceppi europei di *Leptospira ballum*. *Rend. Inst. Sup. San.*, 18: 57-64.
- BATCHELOR, T. M., y TODD, G. M.
 1950 Aureomycin and penicillin therapy in leptospirosis (Weil's disease). *J. A. M. A.*, 143: 21-22.
- BROWN, H. C.
 1939 A rapid presumptive serological test for Weil's disease. *Brit. med. J.*, 2 (4119): 1183-1184.
- GUIDA, V. O.
 1949 Estudios sobre a leptospirose canina. IV. Pesquisas sobre los caracteres antigénicos de una cepa isolada de cao. *Arq. Inst. Biol.*, 19: 150-152.
- HAUNZ, E. A., y CARDY, J. D.
 1952 Canicola fever. Report of nine cases in one family, with the abstract of world literature. *A. M. A. Arch. Int. Med.*, 89: 978-993.

- HERRER, A., BATTISTINI, G., y LICERAS, Julia.
1957 Presencia de la *Leptospira bataviae* en el Perú. *Rev. Med. exp.*, Lima, 11: 29-33.
- MCINTYRE, W. I. M., y MONTGOMERY, G. L.
1952 Renal lesions in *Leptospira canicola* infection in dogs. *J. Path. Bact.*, 64: 145-160.
- MEYER, K. F., STEWART-ANDERSON, B., y EDDIE, B.
1939 Canine leptospirosis in the United States. *J. A. V. M. A.*, 95: 710-729.
- MINKENHOF, J. E.
1947 Febris canicularis, een zeldzame zoonose?. *Nederl. tijdschr. geneesk.*, 91 (3): 1938-1946.
- ROGGERO, P.
1946 La leptospirosis icterigena. *Rev. San. Policía*, Lima, 7: 7-27.
- SAVINO, E., y RENNELLA, E.
1948 Estudios sobre *Leptospira*. XI. La leptospirosis humana como enfermedad profesional. *Rev. Inst. Bact. Carlos Malbran*, Buenos Aires, 13: 315-319.
- STOENNER, H.
1953 A capillary-tube test for leptospirosis. *Am. J. Hyg.*, 57: 316-327.
1954 Application of the capillary-tube test and newly developed plate test to the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Am. J. Vet. Res.*, 15: 434-439.
- THIEL, P. H. VAN.
1957 The treatment of leptospirosis especially leptospirosis icterohaemorrhagica with some antibiotics. *Doc. Med. geo. trop.*, 9: 309-324.
- WOLFF, J. W.
1954 Laboratory diagnosis of leptospirosis. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois.
- WOLFF, J. W., y BOHLANDER, H. J.
1958 Serological classification of pathogenic leptospire. Analysis and comparison of six strains related to serotypes of the *hebdomadis*. *Trop. geo. Med.*, 10: 37-45.
- WILLIAMS H. R. et al.
1956 An epidemic of canicola fever in man with the demonstration of *Leptospira canicola* infection in dogs, swine and cattle. I. Clinical and epidemiological studies. *Am. J. Hyg.*, 64: 46-58.