



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. en la  
población de primates del género *Saguinus* de la  
Estación Biológica Los Amigos, Madre de Dios, Perú**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Gabriela Guadalupe ALIAGA SAMANEZ

**ASESOR**

Mg. Miryam Jeanette QUEVEDO URDAY

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

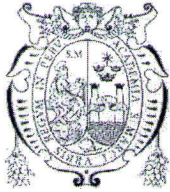
---

Aliaga, G Presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. en la población de primates del género *Saguinus* de la Estación Biológica Los Amigos, Madre de Dios, Perú [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2019.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

- CODIGO ORCID DEL AUTOR :  
<https://orcid.org/0000-0002-5838-8787>
- DNI DEL AUTOR :  
74219887
- CÓDIGO ORCID DEL ASESOR :  
<https://orcid.org/0000-0003-2852-6242>
- DNI DEL ASESOR :  
40064320
- GRUPO DE INVESTIGACIÓN :  
Biotecnología Aplicada a la Conservación, Sanidad y Producción Animal
- INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TALMENTE LA INVESTIGACIÓN  
Vicerrectorado de Investigación y Posgrado
- UBICACIÓN GEOGRAFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN. DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS AÑO O RANGO QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ.  
Estación Biológica Los Amigos, Madre de Dios (Perú).  
Coordenadas: Latitud: -12.6, Longitud: -70.08333  
Rango de Investigación: Junio 2018- Setiembre 2019



## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **viernes 06 de setiembre de 2019**, a las **10:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0170-EPMV/FMV-2019**, integrado por los siguientes profesores:

<b>Dr. Blg. Maturrano Hernández Abelardo</b>	<b>Presidente del Jurado</b>
<b>MV. Mg. Quevedo Urday Miryam Jeanette</b>	<b>Asesor de la Tesis</b>
<b>MV Mg. Siuce Moreno Juan José</b>	<b>Miembro del Jurado</b>
<b>MV. Sánchez Perea Nofre</b>	<b>Miembro del Jurado</b>

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **ALIAGA SAMANEZ, GABRIELA GUADALUPE** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

**“PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Leptospira* spp. EN LA POBLACIÓN DE PRIMATES DEL GÉNERO *Saguinus* DE LA ESTACIÓN BIOLÓGICA LOS AMIGOS (MADRE DE DIOS, PERÚ)”;**

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesora de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECINUEVE (19)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

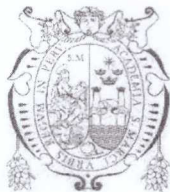
Siendo las **11:30 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Maturrano Hernández Abelardo: Dr. Blg. Prof. Principal. D.E.

Quevedo Urday, Miryam Jeanette: MV. Mg. Prof. Auxiliar D.E

Siuce Moreno Juan José: MV Mg. Prof. Auxiliar. D.E

Sánchez Perea Nofre: MV. Prof. Asociado. T.C



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**Facultad de Medicina Veterinaria**  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0170-EPMV/FMV-2019.

**PRESIDENTE:** .....  
*Maturrano Hernández Abelardo*  
MATURRANO HERNÁNDEZ ABELARDO

**MIEMBROS :** .....  
*Quevedo Urday Miryam Jeanette*  
QUEVEDO URDAY MIRYAM JEANETTE  
ASESORA DE LA TESIS

.....  
*Suñe Moreno Juan José*  
SUÑE MORENO JUAN JOSÉ

.....  
*Sánchez Perea Nofre*  
SÁNCHEZ PEREA NOFRE

San Borja, 10 de setiembre de 2019

V° B°

*Dra. Daphne Ramos Delgado*  
.....

**Dra. Daphne Ramos Delgado**  
**Directora**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**



## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mis padres, quienes siempre han estado presentes brindándome su apoyo,

A mis hermanas Cynthia y Alisa por el gran ejemplo que me dan y por todo su apoyo,

A quienes buscan en la ciencia una forma de contribuir con un mayor conocimiento sobre la fauna silvestre, para su protección y conservación.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi familia, por el apoyo, comprensión, y el gran amor que me dan.

A mi hermana Alisa y a David, que a pesar de la distancia han estado presentes brindándome todo su apoyo, sus consejos y un gran cariño.

A mi asesora Myriam Quevedo, por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo, al Dr. Jesús Lescano por el apoyo durante el trabajo de campo y el desarrollo de este trabajo, a Guillermo Salvatierra por sus consejos para la mejora de la presente tesis.

A Mini y Gideon por sus enseñanzas en campo, el apoyo y por darme la oportunidad de trabajar con ellos.

Al equipo del Laboratorio de Biología y Genética Molecular por sus consejos.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
I. INTRODUCCIÓN .....	5
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	7
2.1. LEPTOSPIROSIS .....	7
2.1.1. <i>Leptospira spp.</i> .....	8
2.1.2. Epidemiología .....	10
2.1.3. Infección en humanos.....	12
2.1.4. Infección en primates no humanos.....	13
2.1.5. Patogenia .....	14
2.1.6. Técnicas de diagnóstico .....	17
2.1.7. Control y prevención.....	19
2.2. Primates Neotropicales: Taxonomía .....	20
2.3. Género <i>Saguinus</i> .....	20
2.3.1. Especies.....	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
3.1. Lugar y tiempo de estudio.....	25
3.2. Cálculo del tamaño de muestra .....	25
3.3. Características de las muestras .....	25
3.4. Metodología de captura.....	26
3.4.1. Elección de puntos de cebado .....	26
3.4.2. Vigilancia .....	26
3.4.3. Preparación del material.....	26
3.4.4. Captura .....	29
3.5. Colecta de muestra .....	30
3.5.1. Contención Química.....	30
3.5.2. Toma de muestra .....	30
3.5.3. Determinación de edad y sexo.....	30

3.6. Detección de Anticuerpos contra <i>Leptospira spp.</i> .....	31
3.6.1. Prueba de Microaglutinación (MAT).....	31
3.7. Análisis de datos.....	34
IV. RESULTADOS.....	35
V. DISCUSIÓN.....	40
VI. CONCLUSIONES .....	44
VII. REVISIÓN BIBLIOGRAFÍA .....	45
ANEXO 1.....	57

## RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica y de distribución mundial presente principalmente en zonas tropicales y subtropicales. Esta enfermedad es originada por bacterias pertenecientes al género *Leptospira* spp., el cual actualmente posee 22 especies y 300 serovares agrupados en 24 serogrupos en base a su antigenicidad. Tanto el hombre como los animales pueden ser afectados por esta enfermedad, y tiene como reservorios a animales domésticos y silvestres. Las espiroquetas son expulsadas a través de la orina de animales infectados. Éstas pueden entrar en contacto con el hombre a través de la mucosa conjuntival, oral, lesiones en piel o por permanecer mucho tiempo sumergido en aguas contaminadas. Se ha encontrado la serorreactividad frente a diversos serogrupos en primates no humanos mantenidos en cautiverio; sin embargo, no se conoce exactamente el rol que cumplen éstos en la epidemiología de la leptospirosis. El objetivo de la presente tesis fue conocer la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. en primates de vida libre del género *Saguinus* de la Estación Biológica Los Amigos (Madre de Dios, Perú). Se colectaron 56 muestras de sangre, de las cuales 26 pertenecían a *Saguinus fuscicollis* y 30 a *Saguinus imperator*, las cuales fueron evaluadas a través de la prueba de Microaglutinación en campo oscuro (MAT), enfrentándolas a 24 serovares agrupados en 21 serogrupos de *Leptospira* spp. El 51.8% (29/56) fueron positivas para al menos un serogrupo evaluado, siendo los serogrupos más frecuentes Iquitos 39.3% (22/56) e Icterohaemorrhagiae 14.28% (8/56) y los menos frecuentes Pomona 3.57% (2/56) y Autumnalis 1.78% (1/56). Además, 3 muestras reaccionaron frente a más de un serogrupo, una de ellas frente a los serogrupos Iquitos e Icterohaemorrhagiae, otra muestra contra Iquitos, Icterohaemorrhagiae y Pomona, y una tercera contra Icterohaemorrhagiae y Autumnalis. Estos resultados indican que existe exposición natural a *Leptospira* spp. en la población de *Saguinus* en el área estudiada. Consecuentemente, se podría considerar a estos primates como una posible fuente de transmisión hacia otros animales y a los humanos.

**Palabras claves:** Leptospirosis, *Saguinus fuscicollis*, *Saguinus imperator*, prueba de microaglutinación, fauna silvestre, Callitrichidae, tamarinos

## ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide distributed zoonotic disease, mainly frequent in tropical and subtropical zones. This disease is caused by spirochetes of the genus *Leptospira spp.*, which currently has 22 species and 300 serovars grouped into 24 serogroups based on their antigenicity. This disease affects both humans and animals, and has many domestic and wild animals as reservoirs. Spirochetes are spread through the urine of infected animals. These can come into contact with man through the conjunctival mucosa, oral, skin lesions or by staying a long time submerged in contaminated water. Seroreactivity against various serogroups has been found in non-human primates kept in captivity. Nevertheless, the function of these in the epidemiology of this disease is not exactly known. This study aimed to detect the presence of antibodies against *Leptospira spp.* in free-ranging primates of the genus *Saguinus* at Los Amigos Biological Station (Madre de Dios, Peru). We collected 56 blood samples, 26 belonging to *Saguinus fuscicollis* and 30 to *Saguinus imperator*. Samples were analyzed by the Microagglutination test in dark field (MAT), challenging them to 24 serovars grouped into 21 serogroups of *Leptosira spp.* 51.8% of the samples were positive for at least one evaluated serogroup, being the most frequent serogroups Iquitos 39.3% (22/56) and Icterohaemorrhagiae 14.28% (8/56) whereas the least frequent were Pomona 3.57% (2/56) and Autumnalis. In addition, three samples reacted against more than one serogroup, one of them to the serogroups Iquitos, and Icterohaemorrhagiae, other to Iquitos, Icterohaemorrhagiae and Pomona, and other react to the serogroups Icterohaemorrhagiae and Autumnalis. These results manifest that the population of *Saguinus* in the studied is naturally exposed to *Leptospira spp.* Consequently, these primates could be considered as a possible source of transmission to other animals and humans.

Keywords: Leptospirosis, *Saguinus fuscicollis*, *Saguinus imperator*, microagglutination test, wildlife, Callitrichidae, tamarins

## I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis está clasificada como la zoonosis de mayor difusión a nivel mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Sociedad Internacional de Leptospirosis (ILS). No obstante, no se le brinda la atención necesaria, en términos de iniciativas para disminuir su transmisión al hombre (Flores, 2010). Esta zoonosis es causada por espiroquetas del género *Leptospira* (Jawetz *et al.*, 2010), bacterias de forma helicoidal que presentan extremos libres terminando en forma de gancho, son móviles, aerobias y miden entre 6 a 20  $\mu\text{m}$  de largo por 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro (Acha *et al.*, 2001). Tradicionalmente ha sido clasificada en dos especies, *L. interrogans* (patógena) y *L. biflexa* (no patógena, de vida libre) (Jawetz *et al.*, 2010). La clasificación genética de esta bacteria ha reemplazado a la fenotípica (Levett, 2015), permitiendo determinar la existencia de 22 especies (Fouts *et al.*, 2016). Asimismo, se han registrado más de 60 serovares de *L. biflexa* y más de 240 serovares de *L. interrogans* (Céspedes *et al.*, 2005), los cuales están organizados en serogrupos basándose en los componentes aglutinógenos predominantes que comparten (Faine, 1982; Alexander, 1991).

La leptospirosis se presenta mayormente en áreas tropicales debido a las condiciones favorables para su transmisión, como las grandes lluvias y un terreno con un pH neutro o alcalino (Acha *et al.*, 2001). Sin embargo, también suele presentarse en regiones templadas (Bharti, 2003). La transmisión de esta enfermedad se da tanto en países industrializados como en países en desarrollo (Bharti, 2003).

Esta enfermedad se encuentra distribuida en el Perú, pudiendo infectar tanto al ser humano, como a animales domésticos y silvestres (Céspedes, 2005). En la Amazonía peruana se han desarrollado investigaciones donde se describe que un tercio de los animales evaluados, pertenecientes a los Órdenes Rodentia, Marsupialia, Chiroptera y Carnívora, pueden estar excretando leptospirosis patógenas en la orina (Bunnell *et al.*, 2000). Estableciendo una fuente de infección tanto para los humanos como para los animales domésticos, debido al desplazamiento de estas especies por la periferia o dentro de las zonas urbanas (Bunnell *et al.*, 2000). Por lo general, las ratas son hospedadores de mantenimiento de los serovares Icterohaemorrhagiae y Copenhageni (Levett *et al.*, 2004). En murciélagos de la Amazonía peruana se encontró una diversidad de especies de *Leptospira* como *L. interrogans*, *L. Kirchneri*, *L. borgpetersenii* y *L. fainei*, estas dos últimas no han sido descritas anteriormente en animales silvestres. Es importante mencionar que el hallazgo de *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae sugiere un ciclo de infección

roedor-murciélago ya que este serovar se encuentra principalmente en roedores (Matthias *et al.*, 2005). Por otro lado, los primates no suelen ser incluidos en estudios serológicos ni en programas preventivos de esta enfermedad, ya que la presentación de esta enfermedad suele ser inaparente en ellos debido a que las infecciones son leves, no presentando las formas clínicas letales (Romero *et al.*, 2011b). Se sabe que los primates pueden ser reservorio de *Leptospira* spp.; además se ha demostrado que participan como portador asintomático (Romero *et al.*, 2011b). A pesar de ello, aún se desconoce la importancia en la cadena epidemiológica que cumplen los primates, ya que no se sabe si es posible la transmisión directa entre personas y primates no humanos (Romero *et al.*, 2011b). La infección experimental por leptospirosis ha sido estudiada en diversos primates (Perolat *et al.*, 1992), siendo algunos primates usados como mascotas tales como los de los géneros *Saguinus*, *Cebus*, *Cebuella* y *Saimiri* (Defler, 2003). Las actividades humanas que involucran el contacto entre humanos y animales silvestres incrementan el riesgo de transmisión de enfermedades interespecíficas (Dobson y Foufopoulos, 2001).

En los animales, la afección de los riñones es crónica y trae consigo la expulsión de un gran número de espiroquetas a través de la orina, ésta podría ser el origen de la contaminación ambiental y la posterior infección a los humanos (Jawetz *et al.*, 2010). La infección se origina posterior al acceso del agente por medio de las mucosas (oral, conjuntiva o nasal) o lesiones, debido al contacto con agua contaminada con leptospiras (Jawetz *et al.*, 2010). Cabe señalar que la ingestión del agente carece de importancia debido a que las leptospiras son destruidas en el estómago (Carter y Wise, 2004; Jawetz *et al.*, 2010). Los hospederos naturales de esta bacteria son roedores, perros, cerdos, vacas (Carter y Wise, 2004) y otros animales como murciélagos (Matthias *et al.*, 2005). Los animales silvestres tienen un papel importante en la epidemiología de la leptospirosis, ya que más del 70% de patógenos zoonóticos causantes de enfermedades emergentes provienen de fauna silvestre (Cutler *et al.*, 2010). Además, éstos tienen exposición a una gran diversidad de serovares de *Leptospira* (Chapman *et al.*, 2005; Lilenbaum *et al.*, 2004), en ellos los signos clínicos podrían ser o no aparentes, pudiendo presentarse de forma leve, severa y en algunos casos fatal (Romero *et al.*, 2012). A pesar de ello, el rol que cumplen los animales silvestres como fuente de infección de leptospiras aún no está claro (Pettrakovsky *et al.*, 2014).

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. LEPTOSPIROSIS

Esta es considerada una enfermedad zoonótica (Chikeka y Dumler, 2015), y una de las más importantes causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial, principalmente en áreas de pocos recursos económicos (Costa *et al.*, 2015). Las mayores prevalencias han sido registradas en países en vías de desarrollo, siendo las más afectadas las zonas tropicales y húmedas (Castro, 2010). Esta zoonosis es originada por leptospiras patógenas, donde el humano participa como hospedador ocasional dentro de los ciclos tanto de animales domésticos como silvestres (Bharti *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2005). El cuadro clínico se caracteriza por presentar fiebre, insuficiencia renal y hepática, insuficiencias reproductivas, así como también afecciones pulmonares (Adler y de la Peña-Moctezuma, 2010). La forma como se presenta la leptospirosis es variable, pudiendo presentarse desde una insuficiencia renal y hepática inespecíficas hasta una altamente mortal (Khan *et al.*, 2018).

*Leptospira spp.* infecta una gran variedad de animales, principalmente mamíferos (Bunnell *et al.*, 2000). Varios de los animales infectados actúan como reservorios o huéspedes de mantenimiento, provocándoles daño mínimo, infecciones crónicas y permanencia en los túbulos renales proximales, de donde son excretadas las espiroquetas (Romero-Vivas y Falconar, 2016; Khan *et al.*, 2018). Los hospedadores de mantenimiento tienen la característica de mantener la infección de forma subclínica y endémica, permitiendo la transmisión de un individuo a otro de forma directa (Levett *et al.*, 2001). La infección producida en estos hospederos suele darse a una temprana edad, aumentando la prevalencia de la infección crónica con la edad (Levett *et al.*, 2001). Entre los reservorios de *Leptospira* están los animales domésticos como los bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y caninos (Bharti *et al.*, 2003). Entre éstos, el ganado vacuno es hospedador de mantenimiento de los serovares Pomona y Hardjo, los cerdos de los serovares Pomona, Tarassovi y Bratislava y los perros del serovar Canicola (Levett, 2004; Bharti *et al.*, 2003). Así también, los animales silvestres tales como roedores, lobos, zorros, mapaches, y zorrillos son reservorios (Bharti *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2018). Los roedores son los principales responsables de la contaminación del suelo y agua con leptospiras (Khan *et al.*, 2018), las cuales pueden sobrevivir hasta por dos semanas en la tierra contaminada con orina infectada (Karaseva *et al.*, 1997). Diversas especies de roedores pueden ser reservorio para distintos serovares, pero generalmente *Rattus spp.* son reservorios de serovares pertenecientes al serogrupo Icterohaemorrhagiae y Ballum (Levett, 2001). Mientras que los ratones silvestres son reservorio

de serovares pertenecientes al serogrupo Ballum (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003). Por otro lado, los hospederos accidentales son aquellos que se infectan con serovares para los cuales no son hospedadores de mantenimiento (World Health Organization, 2003), tal es el caso del humano (Góngora *et al.*, 2008). El humano puede infectarse tras la exposición a la orina infectada, pudiendo ocurrir de forma directa o indirecta a través de la tierra o agua contaminada (Céspedes, 2005). Los diversos animales pueden actuar como hospedadores de mantenimiento para algunos serovares, mientras que pueden ser hospedadores accidentales de otros, conllevando a una infección y una posterior enfermedad severa (Faine *et al.*, 1999).

### **2.1.1. *Leptospira spp.***

#### **2.1.1.1. Clasificación**

El género *Leptospira* pertenece a la Familia Leptospiraceae, al Orden Spirochaetales, Clase Spirochaeta y Filo Spirochaetes (Levett, 2015). La clasificación tradicional se basa en la especificidad bioquímica y serológica, clasificando al género *Leptospira* en *Leptospira interrogans* (patógenas) y *Leptospira biflexa* (saprófita). La diferenciación fenotípica de estas especies se basó en el crecimiento de leptospirosas saprófitas en presencia de 8-azaguanine y a una temperatura de 13°C (Levett *et al.*, 2001).

Esta bacteria se encuentra dividida en un gran número de serovares, clasificación realizada mediante la prueba de absorción de aglutinación cruzada (Kmety y Dikken, 1993). El serovar es considerado una unidad sistemática básica (World Health Organization, 2003). De esta forma, *Leptospira biflexa* se encuentra subdividida en más de 60 serovares, mientras que *L. interrogans* en más de 240 serovares (Céspedes, 2005). Asimismo, leptospirosas patógenas son estructuradas en 24 serogrupos, los cuales se basan en su antigenicidad compartida (Cerqueira y Picardeau, 2009; Jawetz *et al.*, 2010). La nominación de serogrupo no tiene una relación taxonómica, a pesar de ello, esta nominación es útil para el diagnóstico serológico y para comprender la epidemiología de la leptospirosis (Levett, 2015).

La clasificación genética de esta bacteria ha reemplazado a la fenotípica (Levett, 2015), Gracias a la clasificación genética a través de la hibridación ADN-ADN junto con métodos moleculares, se ha determinado la existencia de 22 especies (Fouts *et al.*, 2016). Entre las que pertenecen a las especies patógenas tenemos a *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi* y *L. alstoni*; el grupo de las especies saprófitas está comprendido por *L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstra* y *L. yanagawae*; y el grupo de patógenas intermedias, de las cuales no está clara su patogenicidad,



está comprendido por *L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii* y *L. licerasiae* (Levett *et al.*, 2001; Bharti *et al.*, 2003).

#### **2.1.1.2. Biología**

Esta bacteria es gram negativa, aerobia obligatoria, móvil, delgada, con forma espiralada y mide de 6 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,1  $\mu\text{m}$  de diámetro (Faine *et al.*, 1999). Posee un órgano interno llamado endoflagelo, el cual le permite moverse, incluso en medios muy viscosos (Cerqueira *et al.*, 2009).

Los factores esenciales para el crecimiento de esta bacteria son energía, fuente de nitrógeno y un medio apropiado (Jawetz *et al.*, 2010). La energía que obtienen las leptospiras proviene de los ácidos grasos de cadenas largas, mas no de los carbohidratos o aminoácidos; mientras que su principal fuente de nitrógenos son las sales de amonio (Jawetz *et al.*, 2010). Esta bacteria es capaz de sobrevivir semanas en fuentes de agua, principalmente si posee un pH alcalino (Jawetz *et al.*, 2010), en tierras con pH ácido (6.2) puede sobrevivir hasta por siete semanas, y en el lodo por tres semanas o más (Bharti *et al.*, 2003).

Por otro lado, el genoma de *Leptospira* es más largo que el de otras espiroquetas, esto mostraría la habilidad de esta bacteria para poder vivir dentro de varios ambientes tales como en un hospedero o en el medio externo (De la Peña Moctezuma *et al.*, 1999). Comparando algunas leptospiras, *L. interrogans* posee 3400 regiones codificadoras predichas, mientras que *L. borgpetersenii* posee 2800, de las cuales 656 son específicas de leptospiras patógenas por lo que no se encuentran en *L. biflexa* (saprófita) (Picardeau, 2008). Además, *L. biflexa* posee mayor cantidad de genes codificadores de proteínas metabólicas y sensoriales del medio ambiente en comparación con las leptospiras patógenas, por lo que sobrevive en medio externo (Picardeau, 2008). Comparando el genoma de *L. borgpetersenii* y *L. interrogans*, se evidencia que, el genoma de la primera es más pequeño, además posee mayor cantidad de genes transposasas (20%) que *L. interrogans* (2%), lo que indicaría que se encuentra atravesando una reducción de genoma y especialización (Bulach *et al.*, 2006). Asimismo, aparentemente la disminución o pérdida de genes afecta la capacidad de sobrevivencia en el medio externo de *L. borgpetersenii*, por lo que su modo de transmisión principal es el contacto directo entre los huéspedes y no la transmisión indirecta a través de la exposición al medio ambiente (Ko *et al.*, 2009). El género *Leptospira* posee cerca de 80 genes que se mantienen tanto en especies patógenas como saprófitas, estos genes están relacionados con la motilidad y la quimiotaxis (Xue *et al.*, 2009).

### **2.1.2. Epidemiología**

La leptospirosis actualmente es reconocida como enfermedad infecciosa emergente, la cual presenta una distribución a nivel mundial (Levett, 2001). Esta enfermedad zoonótica es de presentación común en zonas tropicales y en poblaciones en vías de desarrollo. A pesar de ello, se ha presentado también en países desarrollados, poniendo en evidencia la capacidad de esta bacteria para presentarse en medios no convencionales, convirtiéndose en un importante problema de salud pública (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2005).

*Leptospira spp.* es capaz de sobrevivir en ambientes húmedos, cálidos (Weese y Fulford, 2011) y con un pH neutral o ligeramente alcalino (World Health Organization, 2003). Consecuentemente, la tendencia de presentación de la enfermedad es estacional en climas templados, siendo mayor al final del verano e inicio del otoño; por otro lado, en climas tropicales, suele estar presente durante todo el año (Weese y Fulford, 2011). En países que no presentan las características favorables para el mantenimiento de esta enfermedad, la presencia de esta está relacionada con el turismo hacia países tropicales (Khan *et al.*, 2018). Factores tales como poca higiene y la presencia de roedores contribuyen a la proliferación de la leptospirosis, por lo que esta enfermedad se encuentra presente en países en vías de desarrollo debido a la falta de restricciones para la expansión poblacional, permitiendo la presencia de los factores anteriormente mencionados (Khan *et al.*, 2018).

#### **2.1.2.1. La trascendencia epidemiológica de la fauna silvestre en las enfermedades zoonóticas**

La importancia epidemiológica que posee la fauna silvestre en diversas enfermedades se debe a que aproximadamente el 60% de los patógenos causantes de enfermedades emergentes que vienen afectando al hombre son zoonóticos, proviniendo el 70% de éstas de la fauna silvestre (Cutler *et al.*, 2010). El desarrollo de las zoonosis procedentes de la fauna silvestre depende principalmente de las actividades humanas (Sleeman, 2006; Monsalves *et al.*, 2009). Algunas de estas actividades son la creciente densidad demográfica, el turismo, el comercio de fauna silvestre, el acercamiento entre humanos, animales silvestres y animales domésticos, y los cambios en el uso del suelo (Sleeman, 2006; Monsalves *et al.*, 2009). Los animales silvestres pueden ser infectados por diversos serovares de *Leptospira spp.*, pudiendo desenvolverse como hospedador accidental, de mantenimiento o portador, dependiendo de factores como el agente, el medio ambiente y el hospedero (Scarceli *et al.*, 2003; Lilenbaum *et al.*, 2004). A pesar de ello, el rol que cumplen los animales silvestres como fuente de infección aún no está claro (Adler y de La Peña-Moctezuma, 2010; Petrakovsky *et al.*, 2014).

Las enfermedades emergentes pueden originarse de la fauna silvestre, pudiendo ser favorecidas cuando existen cambios del hábitat natural causadas por el hombre o por la propia naturaleza, donde se da el desplazamiento de microorganismos (Pereira, 2008), así como también adaptación y cambios en los microorganismos (PAHO, 1995). Durante las últimas décadas el hombre ha sido responsable de cambios en el hábitat de los primates, mediante influencia antrópica a través de áreas de cultivos, asentamientos humanos, bosques fragmentados y otros usos (Chapman y Peres, 2001). Estos cambios han forzado a aumentar el contacto entre el humano y los primates no humanos, incrementándose el riesgo de transmisión de enfermedades interespecíficas (Daszak *et al.*, 2001; Dobson y Foufopoulos, 2001).

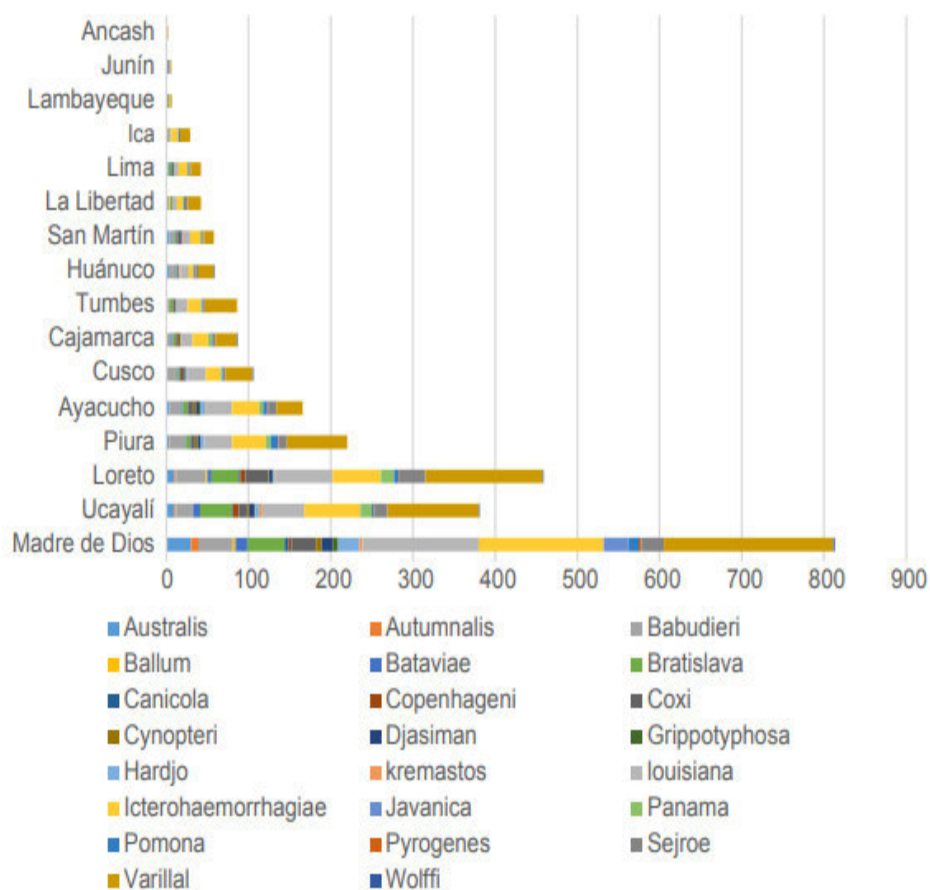
#### **2.1.2.2. La epidemiología de leptospirosis en el Perú**

En el Perú, debido al crecimiento poblacional y al establecimiento del mismo en nuevas zonas como la selva, desde el 2001 se vienen reportando brotes de leptospirosis en humanos con mayor frecuencia (Céspedes *et al.*, 2006). Entre los años 1994 y 2004, se han confirmado casos de leptospirosis en 18 regiones de Perú, siendo las regiones con mayores casos: Loreto (21.6%), Cusco (14.8%) y Madre de Dios (11.6%) (Céspedes *et al.*, 2006). El Instituto Nacional de Salud (INS) encontró que los 29 serovares agrupados en 21 serogrupos, utilizados en la prueba de Microaglutinación (MAT), fueron hallados distribuidos en las 18 regiones del Perú (Céspedes *et al.*, 2006). Siendo los serogrupos que se encontraron mayormente distribuidos Mini, Icterohaemorrhagiae, Australis, Autumnalis, Canicola, Djasiman y Ballum (Céspedes *et al.*, 2006). Dentro de las regiones evaluadas, en Loreto y Madre de Dios se encontró la mayor variedad de serogrupos, 21 y 20 respectivamente. El serovar Varillal se encontró principalmente en regiones de la selva; según estudios de virulencia realizados, éste no causa cuadro hemorrágico ni icterico en humanos. El serogrupo Icterohaemorrhagiae fue el segundo más frecuente y está relacionado con cuadros graves que puede llegar a la muerte (Céspedes *et al.*, 2006).

A nivel nacional, el mayor porcentaje de casos se presenta en la selva con un 73.6%, seguido de la sierra central con 16%, la costa norte con 5.1% y la costa central con 1.4% (Sagrada y Paterna, 2017). En el 2012 se reportaron 1885 casos humanos, donde Loreto fue el departamento que se vio más afectado con el 89.6%, debido a la mayor exposición a fuentes contaminadas por las inundaciones que se produjeron en dicho año (Sagrada y Paterna, 2017). Entre 2012 y 2016, este alto índice de casos se presentó mayormente en Madre de Dios debido al incremento de la notificación de casos probables por emergencia febriles en personas (Sagrada y Paterna, 2017). En el año 2017, en la SE (semana epidemiológica) 1 se notificaron 24 casos, dentro de los cuales Madre de Dios representó el 54.2% (Sagrada y Paterna, 2017). El Instituto Nacional de Salud en

el año 2018 hasta la SE 17 recibió 9118 muestras sospechosas, de las cuales el 22.6% fueron positivas a *Leptospira* (INS, 2018). Dentro de las 16 regiones que presentaron casos, las de mayor presentación fueron Madre de Dios con 31.7%, Loreto con 17.9%, Ucayali con 14.9% y Piura con 8.6% (INS, 2018). Actualmente, tanto los serovares Icterohaemorrhagiae como Varillal son prevalentes en 13 regiones del Perú, siendo seguidos por Babudieri, Louisiana, Panama, Coxi y Bratislava (INS, 2018) (Figura 1). Durante el año 2018 se confirmaron 343 caso acumulados (por cada 100 000 habitantes) de Leptospirosis en humanos. Para el 2019 hasta la SE 13 (30 de marzo), el número de casos acumulados confirmados fue de 237 (Ministerio de Salud, 2019).

**Figura 1.** Distribución geográfica de los serovares de *Leptospira* que circulan en Perú hasta la SE 17-2018. (Fuente: Instituto Nacional de Salud – Sistema de Información de Laboratorios).



### 2.1.3. Infección en humanos

La infección en humanos suele presentarse de forma asintomática o puede llegar a causar leve enfermedad febril, difícilmente diferenciada de otras enfermedades infecciosas (Almeida *et al.*, 2016). Los signos clínicos suelen ser resfrío, dolor de cabeza y abdominal, y sufusión conjuntival. Además, pueden aparecer erupciones cutáneas (poco comunes), éstas comienzan a desaparecer a la semana y esa resolución de los síntomas está relacionada con la aparición de

anticuerpos (Faisal *et al.*, 2012). A pesar de ello, entre el 5% y 10% de humanos infectados pueden desarrollar una infección severa, desencadenando la llamada triada de Weils, caracterizada por fallo renal agudo, ictericia y hemorragia, o un severo síndrome hemorrágico pulmonar (WHO, 2003; McBride *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2010).

La transmisión se da a través de la exposición a orina infectada proveniente de mamíferos portadores. La vía de ingreso puede ser por lesiones en la piel, por vía conjuntival, posterior a una prolongada sumersión en agua (Cacciapuotiet *et al.*, 1987; Jackson *et al.*, 1993), y por la mucosa oral o nasal (Castro, 2010). La transmisión de forma directa de humano a humano es poco probable debido a que el pH bajo de la orina no permite la sobrevivencia de la *Leptospira* posterior a su excreción (Levett, 2001).

#### **2.1.4. Infección en primates no humanos**

La leptospirosis adquirida de forma natural es primates no humanos es poco común (Perolat *et al.*, 1992). Sin embargo, ha sido reportada en un *Saguinus labiatus*, en la que se presentó con letargo, ictericia, disnea, epistaxis, hemorragia a nivel bucal y muerte (Reid *et al.*, 1993). Además, se menciona que especies como *Callithrix jacchus* y *C. kuhlii* son susceptibles a *Leptospira* (Perolat *et al.*, 1992; Bennet *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2005; Baitchman *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Perolat *et al.* (1992) se observó una alta susceptibilidad de *C. jacchus* al serovar Icterohaemorrhagiae y posiblemente a otros serovares. Igualmente, Pereira *et al.* (2005) infectaron de forma experimental a individuos de *Callithrix jacchus* con cepas de leptospirosis aisladas de un caso fatal de leptospirosis humana con la forma severa pulmonar. Realizaron necropsias de los animales infectados revelando que el principal daño renal fue a nivel del tejido tubular e intersticial, presentando nefritis tubulointersticial severa, también se encontró hemorragia pulmonar grave y necrosis hemorrágica del músculo esquelético (Pereira *et al.*, 2005). Debido a que la eutanasia de los primates se realizó en días previamente determinados por el grupo de estudio, no se pudo conocer si aquellos animales que presentaron lesiones graves hubiesen podido sobrevivir a la enfermedad. Cabe señalar que los primates que llegaron a los días 21, 24 y 28 sí mostraron mejoría (Pereira *et al.*, 2005). González-Astudillo (2015) realizó un estudio en un *Saguinus oedipus* y nueve *S. leucopus* provenientes de decomiso, en Colombia, donde se obtuvo una respuesta positiva con una dilución de 1:3200 frente a *L. alexanderi* serovar Manhao en el único *S. oedipus*. Por otro lado, las pruebas sanguíneas que se les fueron realizadas evidenciaron hemoconcentración e hiperproteinemia, indicativos de deshidratación (González-Astudillo, 2015). Romero *et al.* (2011a) realizaron un estudio en los primates del Zoológico de Matecaña (Colombia), considerando como positivos aquellos resultados con títulos de anticuerpos  $\geq 1:100$ . Se encontraron animales con títulos entre 1:100 y 1:1600, sugiriendo contacto previo con *Leptospira spp.* y una leve infección (títulos bajos) e infección activa (títulos altos)

(Romero *et al.*, 2011a). En dicho estudio determinaron una seroprevalencia de 23.07%; los serovares más frecuentes fueron Icterohaemorrhagiae, Ranarum y Pomona, encontrándose mayor reactividad en *Ateles fusciceps*, *Cebus albifrons* y *Saguinus leucopus* (Romero *et al.*, 2011b). Se evaluaron 6 *Saguinus oedipus* y 5 *Saguinus leucopus*, hallándose 2 animales seropositivos, representando el 18.2% de los *Saguinus* evaluados (Romero *et al.*, 2011b). Romero *et al.* (2012) realizaron otro estudio en el mismo zoológico de Matecaña, donde se consideró como positivos a todos aquellos primates con títulos  $\geq 1:50$ . Se encontró que la prevalencia fue de 41.5%, siendo las especies reactivas *Ateles fusciceps*, *Ateles hybridus*, *Cebus apella*, *Cebus albifrons*, *Cebus capucinus* y *Saguinus leucopus*. Los serovares más frecuentemente detectados fueron Autumnalis (25%), Ranarum (22.9%), Icterohaemorrhagiae (12.5%), Pomona (12.5%) y Australis (10.4%) (Romero *et al.*, 2012). La prevalencia únicamente en las especies del género *Saguinus* evaluadas fue de 45.5% (5/11), quienes reaccionaron frente a los serovares Cynopteri y Ranarum (Romero *et al.*, 2012). Un estudio realizado por Pimentel *et al.* (2009) en el Zoológico de Aracaju (Brasil), detectó anticuerpos contra el serovar Copenhagensis en *Cebus libidinosus* y *Cebus xanthosternus*. Estos resultados son importantes, ya que en Brasil este serovar es el principal responsable de los casos de leptospirosis en humanos (Pimentel *et al.*, 2009). En estudios experimentales en *S. oedipus*, *S. geoffroyi* y *S. labiatus* infectados con *Leptospira*, los individuos tuvieron finales fatales. Así también, otros estudios en Calitricidos en cautividad reportaron casos fatales, específicamente en *Callithrix kuhlii* (González-Astudillo *et al.*, 2015).

Otra especie que ha sido infectada experimentalmente con los serovares Hardjo, Balcania y Tarasovi es *Cercopithecus aethiops*. En dicho estudio, no se reportó ningún signo clínico (Hambleton *et al.*, 1980). A pesar de ello, se encontraron variaciones en la bioquímica sanguínea como incremento de deshidrogenasa láctica (DHL), alaninoaminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y creatinquinasa (CK) (Hambleton *et al.*, 1980). Además, se detectaron algunas lesiones en cerebro y riñón, y se logró aislar el agente infectante del hígado y la sangre (Hambleton *et al.*, 1980). Así también, Palmer *et al.* (1987) infectaron a la misma especie con *L. interrogans* serovariedad Hardjo: En dicha investigación tampoco se observó signología de la enfermedad, pero se aisló *Leptospira* a partir de muestras de sangre, orina y riñones de los animales infectados. Algunos casos fatales han sido registrados en el Parque Zoológico Nacional de Washington, en Macacos de Gibraltar (*Macaca sylvanus*) donde se aisló *Leptospira* serovar Icterohaemorrhagiae (Romero *et al.*, 2012).

#### **2.1.5. Patogenia**

El ingreso de *Leptospira* se da a través de la membrana mucosa de la boca, los ojos, la nariz o el tracto genital (Ellis., 2015). Después de 1 a 2 días de la infección (Ellis., 2015), la bacteria se multiplica durante la fase de bacteriemia que dura 7 días (Adler y de la Peña-

Moctezuma, 2010; Weese y Fulford, 2011). Esta primera fase de bacteriemia termina con la aparición de anticuerpos circulantes, detectables después de 10-14 días (Ellis., 2015). Posteriormente invaden múltiples órganos; entre ellos: riñones, hígado, bazo, SNC, tracto genital (Adler y de la Peña-Moctezuma, 2010; Weese y Fulford, 2011), líquido cefalorraquídeo y humor acuoso, llegando hasta estos sitios debido a su movimiento en forma de tirabuzón y a la producción de hialuronidasa (Lee *et al.*, 2000; Hauk *et al.*, 2005). Cuando el número de bacterias llega a un nivel crítico, las toxinas leptospirales no definidas ocasionan daño en los tejidos. El daño principalmente ocurre en el endotelio vascular conllevando a isquemia localizada en los diversos órganos, pudiendo llevar a necrosis en los túbulos renales, daño pulmonar y hepatocelular, meningitis, miositis y placentitis (Adler y de la Peña-Moctezuma, 2010). La necrosis en los túbulos renales puede deberse a la vez a un efecto causado directamente por las leptospiras o por el acúmulo de complejos antígeno-anticuerpo-complemento (Faine *et al.*, 1999; Lux *et al.*, 2000). En los riñones, el principal hallazgo es nefritis tubulointersticial donde va a ocurrir una gran infiltración de monocitos y neutrófilos, y la localización del patógeno en los túbulos renales (Seguro *et al.*, 1990; Burth *et al.*, 2005). Incluso en la forma hemorrágica severa de esta enfermedad, puede presentarse insuficiencia renal aguda hipopotasémica (Seguro *et al.*, 1990), debido al daño ocasionado por las endotoxinas leptospirales en la Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPasa tubular (Burth *et al.*, 2005).

Cuando una respuesta inmune es desencadenada, estas bacterias comienzan a ser eliminadas de los diversos tejidos (Weese y Fulford, 2011). A pesar de ello, es posible la persistencia de un grupo infeccioso en los túbulos proximales de los riñones, pudiendo sobrevivir y replicarse en esta región por meses (Weese y Fulford, 2011), de donde serán eliminados mediante la orina (Ellis, 2015). La duración de la excreción de las espiroquetas a través de la orina varía dependiendo de la especie animal y el serovar infectante (Ellis, 2015).

#### **2.1.5.1. Factores de patogenicidad**

El genoma de *Leptospira* spp. en comparación con otras espiroquetas es de mayor tamaño, lo que evidenciaría su capacidad para vivir tanto dentro del hospedero como en el medio ambiente (Faisal *et al.*, 2012). El gen de lipoproteína de superficie loa22 se encuentra presente en las bacterias patógenas del género *Leptospiras* spp. y es manifestado durante la fase aguda de la leptospirosis (Ristow *et al.*, 2007). Se encuentra expuesto en la superficie (Gamberini *et al.*, 2005) y logra unirse de una forma débil a la laminina (Picardeau *et al.*, 2008). Esta lipoproteína presenta un ortólogo en *Leptospira biflexa*; a pesar de ello, en leptospiras patógenas existe una expresión diferencial y cambios en la sialilación de esta molécula, lo que podría ser el motivo de su importancia en la virulencia (Picardeau *et al.*, 2008). Otro gen que se encuentra altamente conservado en *Leptospira* spp. patógenas es la lipoproteína LipL32 (Haake *et al.*, 2000), que se

encuentra expuesta en la membrana externa (Haake *et al.*, 2000). Esta lipoproteína es capaz de unirse al colágeno tipo I, IV y V, así como a la laminina y fibronectina dependiente de calcio (Haake, 2000). Incluso sigue una ruta dependiente de TLR-2 para posteriormente activar el factor de transcripción Kappa $\beta$ , proteínas quinasas activadas por mitógenos. También realiza una inducción diferencial de quimiocinas y citoquinas importantes para la inflamación tubular, lo que lleva a que la LipL32 induzca nefritis tubulointersticial (Tian *et al.*, 2010). Otra proteína importante es LenA (Lsa24), la cual logra unirse con laminina, factor de complemento H, fibronectina y fibrinógeno (Barbosa *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2006; Stevenson *et al.*, 2007). Ésta pertenece al grupo de la familia de endostatina leptospiral (Stevenson *et al.*, 2007).

El genoma de las *Leptospiras* patógenas codifica una variedad de hemolisinas y proteasas putativas, las cuales ayudan en el ingreso de esta bacteria a las células del hospedero seguida de una translocación en diversos tejidos; dentro de estas formas se encuentran proteínas formadoras de poros y esfingomielinasas (Lee *et al.*, 2002). En leptospiras saprófitas la esfingomielinasa no presenta actividad, lo que podría señalar su rol en la virulencia de las leptospiras patógenas (Bulach *et al.*, 2006; Adler y de la Peña-Moctezuma, 2010). A pesar de ello, la actividad de la esfingomielinasas en la patogenia de la leptospirosis aún no está clara (Bulach *et al.*, 2006; Adler y de la Peña-Moctezuma, 2010). Se han encontrado cinco genes importantes en la lisis celular y en el daño endotelial, algunos de estos genes son el SphA y SphH que son codificadores de esfingomielinasas (Narayanavari *et al.*, 2012). Para *Leptospira* spp. es importante la adquisición de hierro, por lo que al igual que otras bacterias gram negativas posee sistemas de absorción de hierro, entre ellos están los receptores de membrana externa dependientes de TonB (Louvel *et al.*, 2006). También puede obtener hierro a través de su hemooxigenasa, la cual degrada el anillo tetrapirrol del grupo hemo, liberándose así hierro ferroso (Murray *et al.*, 2009).

El lipopolisacárido (LPS) es considerado el principal componente presente en la membrana externa de *Leptospira* spp. (Haake y Zuckert, 2014). Gracias a la variación en el antígeno O que existe entre los diversos serovares, el lipopolisacárido sería causante de la diversidad antigénica de *Leptospiras* spp. patógenas (Nally *et al.*, 2005).



## **2.1.6. Técnicas de diagnóstico**

### **2.1.6.1. Cultivo**

La demostración de la presencia de *Leptospira* en diversas muestras como sangre, líquido cefalorraquídeo y orina es la prueba de diagnóstico definitiva (Faine *et al.*; 1999) (Figura 2). Además, pueden ser utilizados algunos tejidos provenientes de animales muertos (Ellis, 2015). A pesar de ello, el cultivo es poco sensible y esta bacteria es de crecimiento lento, siendo así un cultivo reportado como negativo solo después de 10 semanas o 3 meses de observación (Faine *et al.*, 1999).

*Leptospira* crece en un rango de temperatura de 28 a 30 °C, en un medio con un nivel de pH de 7.2-7.6, debe estar enriquecido con vitaminas, sales de amonio y cadenas largas de ácidos grasos, teniendo como medio de cultivo más usado al medio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Faines *et al.*, 1999). Además, puede emplearse medios selectivos con 5-fluororacil, con la finalidad de evitar el crecimiento de bacterias contaminantes en muestras no estériles, pero que permitan el crecimiento de serovares de *Leptospiras* spp. (WHO, 2013).

### **2.1.6.2. Serología**

#### **2.1.6.2.1. Prueba de micro aglutinación (MAT)**

Es la prueba de referencia debido a su alta sensibilidad y especificidad (Céspedes, 2005), siendo 90% y mayor a 90% respectivamente (Picardeau *et al.*, 2013) Su buena especificidad se debe a que la presencia de anticuerpos heterólogos no afecta los resultados (Burriel, 2010). Además, con esta prueba podría indicarse el serogrupo al cual pertenece el serovar infectante (World Health Organization, 2003). Por ello, esta prueba sigue siendo la única confiable para investigar la propagación de serovares entre animales (Burriel, 2010). La prueba de micro aglutinación ayuda a determinar el mejor esquema de vacunación ya que esta prueba favorece la determinación de los principales serovares que infectan a determinados animales (Burriel, 2010).

Esta prueba va a detectar los anticuerpos, tanto IgM como IgG (World Health Organization, 2003). Como antígenos se emplean cepas representativas de los principales serogrupos (Picardeu, 2012). Para detectar los anticuerpos aglutinantes en el suero del paciente es necesaria la incubación del suero con los antígenos de los diversos serovares de *Leptospira* (Levett y Haake, 2010). Posteriormente podrá ser examinado en microscopio de campo oscuro en búsqueda de la aglutinación formada para finalmente determinar el título de la muestra (Levett y Haake, 2010). Es importante la inclusión de *L. biflexa* cepa Patoc I (*leptospira* saprófita), debido

a que esta es capaz de reaccionar con anticuerpos generados por una variedad de serovares patógenos (World Health Organization, 2003). Esto ayudaría a obtener mejores resultados, debido a que la infección puede no ser causada por serovares locales, sino por serovares aún desconocidos en la región afectada (World Health Organization, 2003).

En la interpretación de resultados el punto final ha sido establecido por el Subcomité Taxonómico de *Leptospira* como aquella dilución del suero que presenta un 50% de aglutinación (International Committee on Systematic Bacteriology, 1984). Al someter el suero de pacientes con leptospirosis, cabe la posibilidad de observar coaglutinación, principalmente en el curso temprano de la infección (World Health Organization, 2003).

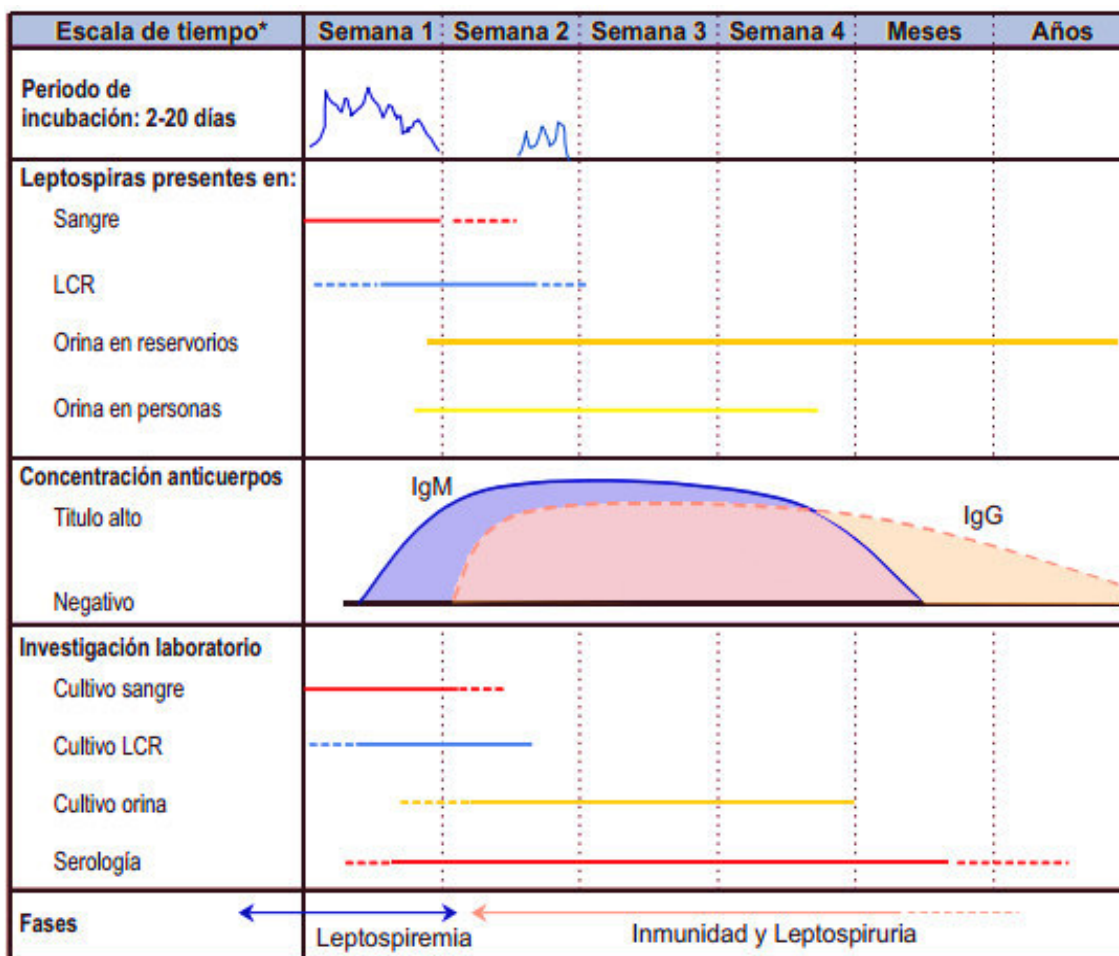
Al ser una prueba que utiliza cultivos vivos de los diversos serovares, requiere de mantenimiento semanal (Céspedes, 2005). Además, esta prueba corre el riesgo de contaminación cruzada entre cepas, por lo que es necesario que cada serovar sea corroborado con su antisuero homólogo (Hergt, 1976; Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

#### **2.1.6.2.2. ELISA**

La prueba del ELISA es la prueba serológica más sencilla de realizar, a pesar de ello no es útil para estudios epidemiológicos de leptospirosis en animales. Esto se debe a que solo es capaz de detectar anticuerpos género específico, y a diferencia de la prueba MAT, no puede determinar el serogrupo (World Health Organization, 2003).

A pesar de que esta prueba sea útil para la detección de la enfermedad aguda en humanos, debido a que detecta IgM, no es útil para la determinación del serovar infectante. Debido a ello es poco usado en animales, ya que sin el conocimiento de los serovares prevalentes no es posible tomar las medidas más adecuadas para la prevención y/o el control (Burriel, 2010).

**Figura 2.** Naturaleza bifásica de leptospirosis en relación con la concentración de anticuerpo, tipo de muestra y momento de toma de muestra. (Fuente: Céspedes, 2005)



### 2.1.7. Control y prevención

La eliminación de esta enfermedad es complicada debido a la gran variedad de serovares, las diversas fuentes de infección y a las diferentes condiciones de transmisión (World Health Organization, 2003). Además, esta infección se encuentra muy extendida (Burriel, 2010), dificultando su control, el cual dependerá de las condiciones locales (World Health Organization, 2003).

La estrategia más efectiva para la prevención de esta enfermedad es evitar el contacto directo con animales potencialmente infectados, así como el contacto indirecto con suelo y fuentes de agua contaminados (Douglin *et al.*, 1997). Así también, es importante controlar las plagas de roedores y el uso correcto de medidas de bioseguridad dependiendo de la actividad desempeñada (Douglin *et al.*, 1997).

En animales se emplea la inmunización con vacunas muertas; sin embargo, la inmunidad es de corta duración, requiriendo refuerzos periódicos (Romero-Vivas y Falconar, 2016). A pesar de que esta vacuna prevenga el desarrollo de la enfermedad, no evita la infección ni colonización renal; por lo que su efecto sobre el control de mantenimiento y transmisión de la enfermedad es pobre (Levett y Haake, 2010).

## 2.2. Primates Neotropicales: Taxonomía

Los primates del Nuevo Mundo también son conocidos como platirinos o primates neotropicales (Hershkovitz, 1977; Dutrillaux, 1979). Están agrupado en las siguientes Familias: Callitrichidae, Cebidae, Atelidae y Pitheciidae (Kowalewski *et al.*, 2016).

A la Familia Callitrichidae pertenecen 5 Géneros, *Callitrix*, *Cebuella*, *Leontopithecus*, *Saguinus* y *Callimico*; esta Familia representa a los primates neotropicales más pequeños. La Familia Pitheciidae está conformada por los Géneros *Pithecia*, *Chiropotes*, *Cacajao*, *Callicebus* y *Aotus*. La Familia Atelidae está conformada por los platirinos más grandes, *Alouatta*, *Brachyteles* y *Ateles* (Kowalewski *et al.*, 2016). Mientras que a la Familia Cebidae lo conforman los Géneros *Sapajus* y *Cebus* (Lynch *et al.*, 2012a, 2012b, 2010c).

## 2.3. Género *Saguinus*

Este género pertenece a la Familia Callitrichidae (Kowalewski *et al.*, 2016). En Perú se encuentran las especies *Saguinus labiatus*, *Saguinus imperator*, *Saguinus tripartitus*, *Saguinus fuscicollis*, *Saguinus mystax* y *Saguinus nigricollis*. Dentro de Madre de Dios se encuentran distribuidas las especies *Saguinus labiatus*, *Saguinus imperator* y *Saguinus fuscicollis* (Pacheco *et al.*, 2011). *S. fuscicollis* suele vivir en simpatria (cuando las áreas de distribución de dos especies coinciden en todo o en parte) con *S. imperator*, formando asociaciones aparentemente estables (Terborgh, 1983).

*Saguinus* tiene como características morfológicas poseer incisivos inferiores cortos y anchos, orejas grandes desnudas y una cola generalmente negra. Muchos de ellos poseen ornamentos en la región de la boca (Auricchio, 1995). Dentro de sus características biológicas están: la formación de grupos que varían entre 2 a 15 individuos, poseen un peso medio de 450g y su periodo de gestación dura entre 140 y 145 días. Los ítems que conforman su dieta dependen del estrato, siendo así que en el estrato medio consumen principalmente insectos y en el estrato alto frutos (Auricchio, 1995). Otro hábito alimenticio, es el consumo de exudado de árboles y lianas. Los agujeros hechos en los árboles por donde escurre el exudado pueden ser realizados

por algunos roedores o también por insectos, siendo grandes y pequeños respectivamente (Soini, 1990). El consumo de agua ha sido descrito por Soini (1990), quien menciona que es realizado durante la época seca. El agua es conseguida introduciendo la mano en agujeros verticales hallados en troncos de árboles, o a través de hojas húmedas por la lluvia (Soini, 1990).

Dentro de algunas características comportamentales observadas en Callitricidos se encuentran las marcaciones olfatorias, caracterizada por ser secreciones provenientes de glándulas cutáneas especializadas (Epple, 1972). Heymann y Sicchar (1988) estudiaron este comportamiento en *Saguinus mystax* y *Saguinus fuscicollis nigrifrons* en cautiverio, siendo el marcaje anogenital el de mayor presentación principalmente en las hembras. Además, en las hembras se relacionó la micción con el marcaje olfatorio. Así, las hembras de *S. mystax* realizaban la acción de poner en contacto las mejillas con los puntos de orina de machos (Heymann y Sicchar, 1988).

### **2.3.1. Especies**

#### **2.3.1.1. *Saguinus fuscicollis***

Dentro de los nombres comunes de esta especie están pichico común, pichico boca blanca, pichico pardo y pichico barba blanca (Pacheco *et al.*, 2011). Esta es la especie con el menor tamaño dentro del género *Saguinus* (Snowdown y Soini, 1988; Soini *et al.*, 1990). *Saguinus fuscicollis* posee un pelaje parduzco, en la zona central y baja de la espalda presenta un pelaje de coloración grisácea con pequeñas manchas de coloración doradas o blancas, el hocico se encuentra rodeado de pelos de coloración blanquecina y la cola es negruzca siendo además no prensil (Figura3) (HersHKovitz 1977; Aquino y Encarnación, 1994; Defler 2003), la zona inferior del cuerpo y cola presentan una coloración rojiza y más clara que la zona superior (Emmos y Ferrer, 1999; Defler, 2003).

Su alimentación está basada en frutos, exudado de plantas, néctar, artrópodos y pequeños vertebrados (lagartijas, sapos) (Soini, 1987). Según Snowdown y Soini (1988), esta especie habita tanto bosques primarios como secundarios; a pesar de ello tiene como preferencia el uso de ecotonos (zona de transición entre dos ecosistemas diferentes) (Escribano *et al.*, 1997), ya sean los bordes de ríos o bosque claro (Soini, 1990). Se menciona que la actividad de esta especie se distribuye 41% dentro o en bordes de zonas despejadas naturalmente de los bosques llamados claros de bosques, 19% en bosque secundario, 13% en vegetación ribereña y 27% dentro de bosques maduros (Soini, 1990).

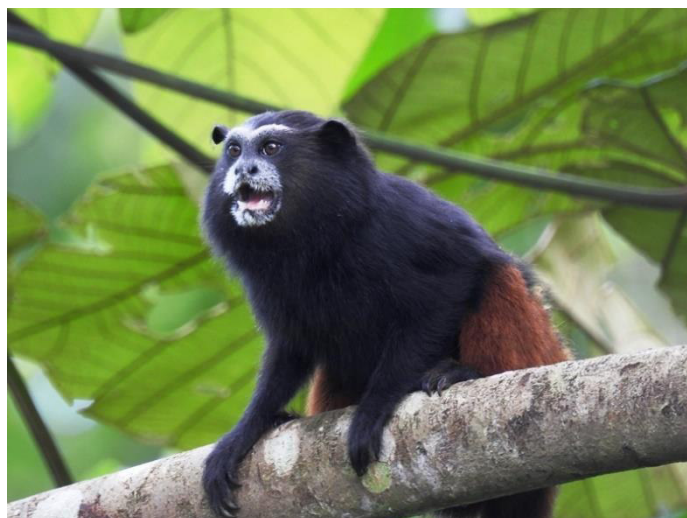
En el plano reproductivo se ha reportado monogamia, poliandria y poliginandria (Heymann, 2001; Porter, 2001). Por lo general, en el grupo social solo hay una hembra reproductora, mientras que las otras hembras no se encuentran estimuladas hormonalmente (French *et al.*, 1984; Haig 1999; Digby *et al.*, 2007). El tiempo de gestación es de 150 días (Epple y Katz, 1980). La parición suele ocurrir una vez al año, pariendo dos crías generalmente (Digby *et al.*, 2007),

*Saguinus fuscicollis* es una especie que tiene dentro de sus hábitos ser gregaria, diurna y arbórea (Pacheco *et al.*, 2011). Aquino *et al.* (2009) mencionan que los grupos de esta especie están conformados por 5.2 individuos en promedio variando entre 3 y 7 individuos, mientras que Heyman (2001) menciona que el número de individuos por grupo varía entre 2 y 10 individuos, conformado principalmente por más machos (1 a 4 machos) que hembras (1-2). Según Ferrari y Ferrari (1989), el área de uso de esta especie es de 33 ha., mientras que Garber (1988) calcula que el rango de hogar de esta especie es de 40 ha. *Saguinus fuscicollis* se encuentra distribuido en Loreto, Ucayali, San Martín, Huánuco, Pasco, Junín, Cusco, Madre de Dios y Puno a una altura que varía de 71 a 1545 msnm (Hershkovitz, 1977). Está presente en la sabana de palmeras y ecorregión de selva baja (Hershkovitz, 1977).

Esta especie es muy popular como mascotas (Pacheco y Cornejo, 2011). Según Torres *et al.* (2010), los primates de este género son utilizados para investigaciones biomédicas. Otras amenazas a las que es sometida *Saguinus fuscicollis* son la pérdida de su hábitat debido a actividades realizadas por el hombre, tales como sustracción de recursos naturales y ampliación de fronteras agrícolas (Pacheco *et al.*, 2011).

Dentro de las medidas de conservación tomadas por el Perú, esta especie se encuentra registrada como especie notable de fauna prioritaria en el Plan Maestro 2007-2011 del Santuario Nacional Megantoni (Pacheco *et al.*, 2011). También se encuentra en 16 Áreas Naturales Protegidas (ANP), espacio en el territorio nacional que se encuentra protegido legalmente por el Estado Peruano (Pacheco *et al.*, 2011). Para la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) se encuentra como preocupación menor, y en la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES) se encuentra en el Apéndice II (Especies que no están en Peligro, pero cuyo comercio debe estar controlado para evitar un uso incompatible con su supervivencia) (Pacheco *et al.*, 2011).

**Figura 3.** *Saguinus fuscicollis* (Fuente: IUCN- edson-guilherme en <https://www.inaturalist.org/observations/22370514>)



#### **2.3.1.2. *Saguinus imperator***

Posee varios nombres comunes, tales como: pichico emperador, pichico bigotudo y pichico cenizo (Pacheco *et al.*, 2011) (Figura 4). Esta especie posee un pelaje negruzco a nivel de la cabeza con una franja blanquecina sobre los ojos, el pelaje de su espalda es de coloración grisácea con amarillento, tanto las manos como los pies tienen un pelaje negruzco, pero el pelaje de la parte interna de los miembros y el vientre tiene un tono entre naranja intenso y marrón, mientras que el pecho muestra una coloración gris (Emmons y Feer, 1999).

Esta especie presenta hábitos diurno, arbóreo y gregario (Pacheco *et al.*, 2011). El hábitat de esta especie es bosque primario no inundable (Freese *et al.*, 1982), bosque secundario, bosque montano bajo, bosque inundable estacionalmente y bosque remanente (Terborgh, 1983). Aragón (2007) reporta que el tamaño grupal varía entre 4 y 7 individuos. Su alimentación es a base de exudados vegetales (Aragón, 2007), frutos maduros, insectos y néctar (Terborgh, 1983), siendo este último su principal alimento en época seca (Terborgh, 1983). Sobre su reproducción se conoce que el periodo de parición es entre noviembre y enero (Encarnación, 1990) durante el atardecer, pariendo gemelos (Windfelder, 2000). Para esta especie se ha reportado monogamia (Terborgh, 1983; Aragón, 2007). No obstante, Aragón (2007) menciona que, a pesar de la dominancia de un macho sobre otro, ambos se encargan de la crianza de la cría. Por otro lado, Goldizen (1987) cree que poseen un sistema de poliandria facultativa, similar al de los otros tamarinos, por lo que es difícil la identificación del padre, conllevando a que todos los machos estén involucrados en el cuidado de la cría.

La especie *Saguinus imperator* ha sido usada en investigaciones biomédicas (Mack y Eudey, 1984), además es cazada para ser usada como mascota y en algunas ocasiones también para el consumo en caso de no haber primates grandes (Pacheco *et al.*, 2011). Además, la pérdida de bosque causada por la minería artesanal presente en Madre de Dios amenaza esta especie (Swenson *et al.*, 2011). Esto en conjunto con la ejecución de la carretera interoceánica sur han permitido el ingreso a áreas previamente inaccesibles, contribuyendo a la deforestación y caza de fauna silvestre (Pacheco *et al.*, 2011). El tráfico de esta especie se encuentra regulada por CITES (Apéndice II) y se encuentra categorizada como “Preocupación Menor” según la IUCN (Pacheco *et al.*, 2011). La presencia de esta especie en cuatro ANPs es una de las medidas tomadas para su conservación a nivel de Perú (Pacheco *et al.*, 2011).

**Figura 4.** *Saguinus imperator*. (Fuente: IUCN-tremarctos photography, en <https://www.inaturalist.org/observations/5878039>)





### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar y tiempo de estudio

La colecta de muestra se realizó en la Estación Biológica Los Amigos (Madre de Dios, Perú) durante los meses de junio y julio del 2018. El área está conformada por tres hábitats que son: bosque de tierra firme, bosque de planicie inundable y pantano. Además, posee áreas de parches de bambú, bosque de sucesión primaria y vegetación ribereña, a la vez posee áreas que han sido perturbados por la minería. El clima en esta región es cálido y húmedo, con un promedio de temperatura de 24°C y una precipitación pluvial de 2600 mm anualmente. Posee además 30km de trochas (Sitio Web ACCA). La colección y evaluación de las muestras se realizaron bajo la autorización RD 245-2018-MINAGRI-SERFOR-DGGSPFFS.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Bacterias de Transmisión Sexual y Leptospiras del Instituto Nacional de Salud (INS), Lima-Perú, durante los meses de octubre y noviembre del 2018.

#### 3.2. Cálculo del tamaño de muestra

El tamaño de muestra para detección de enfermedad se determinó asumiendo que la población de monos del área en estudio es desconocida, con una prevalencia mínima esperada del 10% y un nivel de confianza del 95%. Se empleó el software Sinopia (<http://www.winepi.net/>). Obteniendo como tamaño de muestra, al menos 29 primates del género *Saguinus*.

#### 3.3. Características de las muestras

El material experimental evaluado fueron 56 muestras de sangre de primates del género *Saguinus* (26 de *Saguinus fuscicollis* y 30 de *Saguinus imperator*).

### **3.4. Metodología de captura**

#### **3.4.1. Elección de puntos de cebado**

Para elegir los puntos de captura, se realizaron caminatas diurnas de 6a.m. a 4p.m. con el fin de localizar áreas de alimentación de primates del Género *Saguinus*.

#### **3.4.2. Vigilancia**

Se establecieron 11 puntos de captura. En grupos de tres personas, se realizaron caminatas diurnas. A cada una se le asignó entre tres a cuatro puntos de cebado (Figura 5). Para la ejecución de esta actividad utilizaron cebo (rodajas de plátanos), guantes, cuchillo, linterna, cuaderno de apuntes, lapicero, mosquitero, tapete y binoculares. La salida de la estación fue aproximadamente a las 5a.m. con el fin de cebar todas las trampas antes de que amanezca. En cada uno de los puntos en los que se realizó el cebado se anotó la cantidad de cebo que restaba del día anterior, que podían ser rodajas de plátano enteras, solo la cáscara o nada, también se anotó la cantidad de cebo que era colocado en cada trampa aquel día. De esta forma se llevaba un control de la cantidad de cebo que era consumida. La persona encargada permaneció en el último punto de cebado donde observó la actividad del grupo de primates que se alimentó del cebo colocado. El observador se mantuvo a una distancia entre 7 a 8 metros, sobre un tapete de plástico y oculta bajo un mosquitero, con un cuaderno de apunte y binoculares para observar y describir la actividad de los primates. Además, era importante tratar de identificar la especie que se encontraba alimentándose en aquel punto, así también conocer si todos los integrantes del grupo ingresaron a las trampas y su permanencia en ellas. Esta actividad se realizó hasta las 12p.m. debido a que son las horas de mayor actividad. Finalmente, toda la información fue digitalizada en una base de datos.

#### **3.4.3. Preparación del material**

El día previo a la captura se realizó la preparación y verificación de todo el material que se llevaría a campo, el cual consistía en una carpa, material para captura, contención química y material de laboratorio para la toma de muestras.

##### **A. Material para captura:**

- a. Trampas caja y sogas (Figura 6)
- b. Cebo (Plátano)
- c. Tapete
- d. Mosquitero
- e. Binoculares
- f. Manta oscura

**B. Material para contención química:**

- a. Ketamina (Clorhidrato) 100mg/ml (Ket-A-100, Agrovvet Market, Perú)
- b. Jeringas de tuberculina (1ml)
- c. Agujas número 25G x 1pulgada

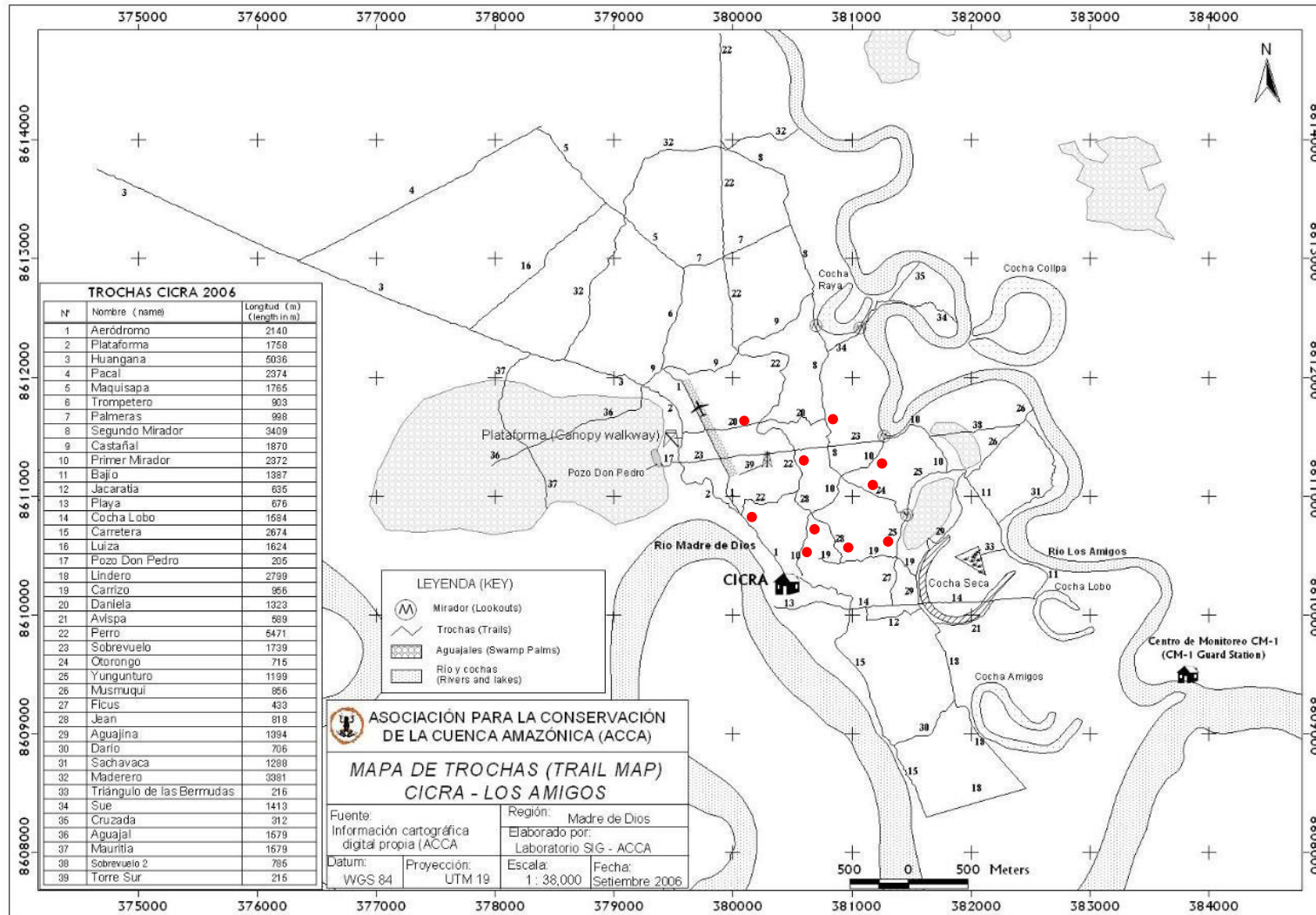
**C. Material para colección de muestra:**

- a. Jeringas
- b. Agujas número 21G x 1 1/2 pulgada
- c. Tubos de microcentrífuga Eppendorfs de 1ml
- d. Alcohol
- e. Algodón
- f. Guantes y mascarilla

**D. Material de laboratorio:**

- a. Centrífuga
- b. Tubos de microcentrífuga Eppendorf de 0.5ml
- c. Pipeta
- d. Puntas de pipetas
- e. Tanque de nitrógeno
- f. Guantes

Figura 5. Mapa de la Estación Biológica Los Amigos con los puntos de captura. (Fuente: <http://www.acca.org.pe/nuestras-estaciones-biologicas/los-amigos-cicra/mapas/>).



**Figura 6.** Trampa caja con cebo. (Fuente: Gabriela Guadalupe Aliaga Samanez)



#### 3.4.4. Captura

La captura fue realizada por un grupo de tres personas, que consistió en la observación y posterior captura. Generalmente la hora de salida de la estación al campo fue aproximadamente a las 5:30 a.m., dependiendo la distancia a la que se encontraba el punto de captura. Cada punto de captura fue seleccionado previamente, previo a la captura se cebó cada trampa, esto consistió en colocar rodajas de plátano en cada una de las trampas. Posteriormente se ataron cuerdas desde las puertas de las trampas hasta el lugar donde el grupo de captura se ubicó para la observación de las trampas (Figura 7). Una vez los primates fueron observados ingresar a las trampas, cada una de ellas fue cerrada manualmente. Seguidamente, con todas las trampas ya cerradas y con éxito de captura, uno de los integrantes se acercó a las trampas para asegurarlas y cubrirlas con una tela oscura, con el fin de disminuir el estrés de los primates capturados.

**Figura 7.** Trampa caja desde la vista del observador. (Fuente: Gabriela Guadalupe Aliaga Samanez)



### **3.5. Colecta de muestra**

#### **3.5.1. Contención Química**

Fue realizada a través de los agujeros de la trampa, para lo cual se utilizó el protocolo de los investigadores de la Estación Biológica Los Amigos que consistió en el empleo de Etamina (Clorhidrato) 100mg/ml a una dosis de 10mg/kg intramuscular. Esta inmovilización daba un rango de 30 minutos para el siguiente procedimiento que sería la toma de muestra. Además, se determinó la edad y el sexo.

#### **3.5.2. Toma de muestra**

Se realizó en una carpa colocada aproximadamente a 10m del punto de captura. Se tomó una muestra de sangre mediante una punción aséptica de la vena femoral, extrayendo alrededor de 0.5ml. Seguidamente las muestras fueron llevadas a la estación y colocadas a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 3500 rpm durante 10 minutos. El suero obtenido fue colocado en microtubos de 0.5ml y almacenados en un tanque de nitrógeno líquido hasta su posterior traslado a la ciudad de Lima, donde fueron almacenados a -20°C. Una vez terminada la toma de muestra, los primates eran liberados en conjunto, en el momento en que todos los integrantes del grupo se encontraban activos

#### **3.5.3. Determinación de edad y sexo**

Para la determinación de la edad se tomó en consideración, el tamaño del animal, la coloración y tamaño del escroto o vulva, la presencia y desarrollo de la glándula suprapúbica (Soini, 1990). Clasificándolos según Soini (1990) en infante 1, infante 2, juvenil, subadulto y adulto.

Los infantes 1, entre 0 y 2,5 meses, son aquellos de tamaño muy pequeño, con presencia de dientes deciduos, que se encuentran amamantando y son cargados continuamente (Soini, 1990). Los infantes 2, entre 2.5 y 6 meses, con incipiente presencia de pelos blancos rodeando la boca, dentadura decidua completa o con presencia de algunos permanentes, destetados con locomoción independiente (Soini, 1990). Los juveniles, aquellos entre 7 y 12 meses de edad, son más pequeños que los adultos, poseen pelos blancos de forma circumbucal, sus genitales son pequeños, escroto o vulva no pigmentado, la dentadura es mixta o permanente, sin desarrollo

completo de los caninos (Soini, 1990). Los sub-adultos, *Saguinus* entre 1 y 1.5 años, teste o vulva aun pequeños, pigmentados de negro, con desarrollo incipiente de glándula suprapúbica y caninos desarrollados. Los adultos, aquellos mayores de 1.5 años, presentan genitales bien desarrollados con pigmentación completa y presencia de glándula suprapúbica desarrollada (Soini, 1990).

### **3.6. Detección de Anticuerpos contra *Leptospira spp.***

#### **3.6.1. Prueba de Microaglutinación (MAT)**

Para la identificación de anticuerpos, las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Bacterias de Transmisión Sexual y Leptospiras del Instituto Nacional de Salud (INS). Se utilizó la prueba de microaglutinación y la lectura se llevó a cabo mediante el uso de un microscopio de campo oscuro. Se utilizaron 24 cepas de referencia, las cuales representan 24 serovares agrupados en 21 serogrupos. Se consideraron como seropositivas aquellas con títulos de serorreactividad  $\geq 1/100$ . Para el desarrollo de la Prueba de Microaglutinación se empleó el protocolo del INS, el cual se explica a continuación.

#### **Protocolo:**

##### **A. Procesamiento de MAT tamizaje para muestras de suero**

- a. Desinfectar la Cabina de bioseguridad Tipo II, Clase A2.
- b. Realizar diluciones de las muestras de sueros problemas en 1/50, utilizando 784  $\mu\text{L}$  de PBS 1X y 16  $\mu\text{L}$  de suero, obteniendo un volumen final de 800  $\mu\text{L}$ .
- c. Preparar otra dilución con 784  $\mu\text{L}$  de PBS 1X y 16  $\mu\text{L}$  de “suero control de calidad interno” (SCCI), obteniendo una dilución de 1/50 del SCCI. En un tubo de microdilución de 1.1ml.
- d. Como control negativo (CN) se coloca 784  $\mu\text{L}$  de PBS 1X en un tubo de microdilución de 1.1ml.
- e. Homogenizar adecuadamente 20 veces con el uso de una pipeta multicanal con un volumen de 200  $\mu\text{L}$  las diluciones de los sueros y el SCCI.
- f. En una microplaca distribuir en 8 columnas (A, B, C, D, E, F, G y H), siendo de la columna A la F para los sueros problemas, la columna G para SCCI, y la columna H para el CN. Utilizando dos microplacas para poder distribuir los 24 antígenos.
- g. Se reparte 30  $\mu\text{L}$  del suero problema, SCCI y CN en sus respectivas columnas (12 pocillos por columna, cada uno corresponde a un serovar), de igual forma la segunda microplaca.

- h. El SCCI y CN serán evaluados una única vez por cada proceso de tamizaje.
- i. Realizar la dilución 1/2 de los 24 serovares de *Leptospira* spp utilizados como antígenos (concentración de *Leptospira* 1-2 X 10<sup>8</sup> con 7-10 días de incubación a 28-30°C).
- j. Utilizando una pipeta multicanal con un volumen de 200µL homogenizar 20 veces, repartir 30 µL de los 12 primeros antígenos en su respectiva fila en cada una de las 8 columnas. Realizar este procedimiento con la segunda microplaca agregando los 12 antígenos restantes. La dilución final del suero que se obtiene es el doble (1/100).
- k. Realizar unos ligeros golpes en los bordes de la placa (5 – 7 veces) para homogenizar cuidadosamente la mezcla de suero y antígeno.
- l. Cubrir la microplaca e incubar por 1-2 horas a 28°C- 30° C.
- m. Lectura al microscopio con el objetivo 10X.

## **B. Prueba de titulación**

- a. Posterior al tamizaje de las muestras, en aquellos sueros que presenten aglutinaciones igual o mayor a 2+ con uno o más serovares en la dilución final 1/100, se realizará la titulación haciendo diluciones sucesivas al doble (2X) del suero, de ese modo se determinará el título de anticuerpos en cada uno de los antígenos positivos que presentaron la aglutinación.
- b. Realizar la desinfección de la Cabina de bioseguridad tipo II, clase A2 para proceder con el procedimiento de MAT titulación.
- c. Preparar una placa de microdilución de manera vertical, donde se rotulará en el lado lateral derecha el código de las muestras y en el lado lateral izquierda el código de los serovares. De las 8 columnas, del 1 al 7 corresponden a las diluciones seriadas (1/100 - 1/ 6400). La columna 8 corresponde al CN.
- d. Se agrega 30 µL de PBS 1X de la segunda a la octava columna.
- e. Se realizar una dilución 1/50 del suero a titular con PBS 1X, utilizando 784 µL de PBS y 16 µL de suero, en tubo de microdilución de 1.1mL, obteniendo un volumen final de 800µ Mezclar 20 veces con un volumen de 200 µL.
- f. Agregar 60µL del suero (preparado en el punto anterior) en la primera columna (la cantidad de veces correspondiente a los serovares a evaluar).
- g. Empleando una micropipeta multicanal colectar 30 µL del suero diluido (1/50) de la primera columna y adicionarlo a la segunda columna, mezclar 10 veces, y continuar con este proceso hasta llegar a la columna 7 (se descarta 30 µL que restan de la columna 7). Se obtendrán diluciones de 1/50 hasta 1/3200.



- h. Diluir 140  $\mu\text{L}$  de PBS 1X pH 7.2-7.4 y 140 $\mu\text{L}$  de antígeno puro, serovar (Cuadro1), en tubos de microdilución de 1.1mL para obtener una dilución 1/2 de los antígenos respectivos, homogenizar 20 veces con un volumen de 140  $\mu\text{L}$ . Posteriormente se distribuye 30 $\mu\text{L}$  del antígeno diluido en su respectivo serovar a titular. Homogenizar cuidadosamente de forma manual la mezcla de suero y antígeno, mediante la aplicación de unos ligeros golpes de 5 – 7 veces. Finalmente se obtienen diluciones de 1/100 hasta 1/6400.
- i. Se cubre la microplaca e incuba durante 1 a 2 horas, a una temperatura de 28 - 30° C.
- j. Se realiza la lectura mediante el uso del microscopio de campo oscuro usando el objetivo 10X

### **C. Resultados de la prueba MAT**

- a. Usando la micropipeta multicanal se extrae una gota de la mezcla (antígeno y suero) y del control negativo; se traspasa a una lámina portaobjeto para la lectura.
- b. Realizar la lectura utilizando un microscopio de campo oscuro con objetivo de 10X, sin cubreobjeto, comparando la muestra con el control negativo.
- c. Se debe observar el grado de aglutinación de cada antígeno en relación con el control negativo; para ello se emplea la escala de 1 a 4, la cual se reporta con cruces de aglutinación 1+, 2+, 3+ y 4+. Aquella dilución de suero que presente 50% de aglutinación, será el título final. Si se obtiene título mayor a 1/6400 se deberá continuar con la titulación hasta hallar el título final.
- d. Una muestra es negativa, aquella que no presenta aglutinación, se observará similar al control negativo.

**Cuadro 1.** Serovares de *Leptospira spp.* utilizados en la prueba de microaglutinación (MAT)

Nº	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
1	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
2	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
3	<i>L. santarosai</i>	Shermani	Babudieri	CI40
4	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum	S102
5	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
6	<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez Bratislava
7	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	H. Utrecht IV
8	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
9	<i>L. weilii</i>	Javanica	Coxi	Cox
10	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522C
11	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
12	<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Andaman
13	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Hardjo	Hardjoprajitno
14	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
15	<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT 6
16	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
17	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat B. 46
18	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214K
19	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
20	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
21	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M 84
22	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin
23	<i>L. wolffii</i>	Sejroe	Wolffi	3705
24	<i>L. licerasiae</i>	Iquitos	Varillal	Varillal

### 3.7. Análisis de datos

Se realizó un análisis descriptivo de los datos. Los resultados fueron presentados en base a frecuencias e intervalos de confianza. Para los análisis, se utilizó el programa Microsoft Excel, se estimó intervalos de confianza del 95% mediante el Calculador Epidemiológico EpiTools del programa AUSVET. Además, se evaluó correlación mediante la prueba estadística Test de Fisher.

#### IV. RESULTADOS

Se evaluaron 56 muestras de primates del género *Saguinus*, de las cuales 29 (51.8%) fueron serorreactivas a al menos un serogrupo patógeno (Cuadro 2). Siendo serorreactivas frente a 4 serogrupos patógenos de los 21 evaluados. Además, tres de los primates (dos *S. fuscicollis* y un *S. imperator*) fueron serorreactivos a más de un serogrupo, pudiendo ser consideradas coaglutinaciones.

El 61.5% (16/26) de los *Saguinus fuscicollis* evaluados fueron seropositivos. Por su parte, el 43.3% (13/30) de los *S. imperator* fueron seropositivos (Cuadro 2). Así, dentro del total de las muestras evaluadas, el 28.6% (16/56) y 23.2% (13/56) fueron seropositivas, correspondiendo a *Saguinus fuscicollis* y *S. imperator*, respectivamente.

**Cuadro 2.** Frecuencia de primates serorreactivos contra *Leptospira* spp. según género y especie

	Frecuencia	IC (95%)
<i>Saguinus spp.</i>	51.8% (29/56)	39-64.3%
<i>Saguinus fuscicollis</i>	61.5% (16/26)	42.5-77.6%
<i>Saguinus imperator</i>	43.3% (13/30)	27.4-60.8%

La frecuencia de los machos seropositivos fue de 59.4% (19/32), siendo el observado en las hembras de 41.7% (10/24), no presentando diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.28$ ). En la especie *Saguinus fuscicollis* las frecuencias presentes en machos y hembras fueron 70.6% (12/17) y 44.4% (4/9) respectivamente, cuya diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0.23$ ). Al evaluar las frecuencias por edad, se encontró que el 63.6% (7/11) de los juveniles evaluados fueron seropositivos, a pesar de ello, no se encontró diferencia significativa para ninguno de los grupos (Anexo 1). Por otro lado, tanto el 50% de *S. fuscicollis* como el 40% de *S. imperator* presentaron reactividad para un solo serogrupo (Cuadro 3), mientras que tres individuos mostraron coaglutinaciones, las cuales fueron: Icterohaemorrhagiae-Iquitos, Icterohaemorrhagiae-Iquitos-Pomona e Icterohaemorrhagiae-Autumnalis. Además, las titulaciones predominantes fueron 1/100, 1/200 y 1/400 (Cuadro 4), mientras que un individuo adulto presentó títulos de aglutinación altos, siendo serorreactivo para los serogrupos Icterohaemorrhagiae (1/1600) y Autumnalis (1/1600) y cuatro serogrupos más (Batavia,

Shermani, Ballum y Hurstbridge), sin embargo, es probable que estos cuatro serogrupos sean reacciones cruzadas, por lo que no serán consideradas dentro de los resultados.

**Cuadro 3.** Frecuencia (en %) de *S. fuscicollis* y *S. imperator* serorreactores a *Leptospira spp.*

	<i>Saguinus sp. (n=56)</i>		<i>S. fuscicollis (n=26)</i>		<i>S. imperator (n=30)</i>	
	Frecuencia	IC 95%	Frecuencia	IC 95%	Frecuencia	IC 95%
<b>GENERAL</b>	51.8 (29/56)	39.0-64.3	61.5 (16/26)	42.5-77.6	43.3 (13/30)	27.4-60.8
<b>SEXO</b>						
<b>Macho</b>	59.4 (19/32)	42.3-74.5	70.6 (12/17)	46.9-86.7	46.7 (7/15)	24.8-69.9
<b>Hembra</b>	41.7 (10/24)	24.5-61.2	44.4 (4/9)	18.9-73.3	40 (6/15)	19.8-64.3
<b>EDAD</b>						
<b>Juvenil</b>	63.6 (7/11)	35.4-84.8	57.1 (4/7)	25-84.2	75 (3/4)	30.1-95.4
<b>Sub-Adulto</b>	50 (5/10)	23.7-76.3	100 (5/5)	56.6-100	0 (0/5)	0-43.4
<b>Adulto</b>	51.5 (17/33)	35.2-67.5	53.8 (7/13)	29.1-76.8	50 (10/20)	29.9-70.1
<b>Indeterminado</b>	0 (0/2)	0-65.8	0 (0/1)	0-79.3	0(0/1)	0-79.3
<b>NÚMERO DE SEROGRUPOS</b>						
<b>1</b>	44.6 (25/56)	32.4-57.6	50 (13/26)	32.1-67.9	40 (12/30)	24.6-57.7
<b>2</b>	3.6 (2/56)	1.0-12.1	7.7 (2/26)	2.1-24.1	-	-
<b>3 o más</b>	3.6 (2/56)	1.0-12.1	3.8 (1/26)	0.7-18.9	3.3 (1/30)	0.6-16.7

**Cuadro 4.** Porcentaje de animales seropositivos según titulación y grupo etario - (n/N)

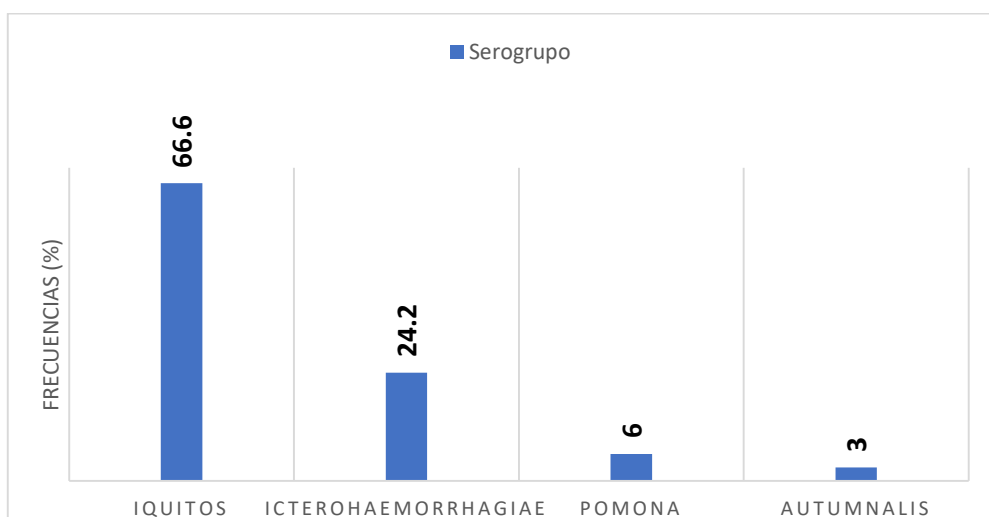
	Adulto (N=33)				Sub-Adulto (N=10)			Juvenil (N=11)
	1/100	1/200	1/400	1/1600	1/100	1/200	1/400	1/100
<b>Iquitos</b>	39.4% (13/33)	6% (2/33)	-	-	30% (3/10)	-	-	63.3% (7/11)
<b>Icterohaemorrhagiae</b>	6% (2/33)	6% (2/33)	3% (1/33)	3% (1/33)	-	20% (2/10)	-	-
<b>Pomona</b>	3% (1/33)	-	-	-	-	-	10% (1/10)	-
<b>Autumnalis</b>	-	-	-	3% (1/33)	-	-	-	-

Los serogrupos a los cuales fueron serorreactivos fueron Iquitos, Icterohaemorrhagiae, Pomona y Autumnalis. De los cuales, el serogrupo Autumnalis se encontró en una única muestra de una hembra adulta de *Saguinus imperator*, mientras que para el serogrupo Pomona reaccionaron dos individuos de *Saguinus fuscicollis*, una hembra sub-adulta y un macho juvenil (Cuadro 5). Además, los serogrupos Iquitos e Icterohaemorrhagiae fueron los que se presentaron mayormente (Cuadro 5). Del Cuadro 5 se puede observar que *Saguinus fuscicollis* posee una mayor frecuencia contra Icterohaemorrhagiae que *Saguinus imperator* ( $p=0.019$ ). Nótese que el número de reacciones ( $n=33$ ) frente a los serogrupos identificados es mayor que el número de animales seropositivos ( $n=29$ ), debido a que algunos animales resultaron seropositivos para más de un serogrupo. Así, dentro de las reacciones totales, el serogrupo Iquitos fue el que se presentó mayormente (66.6%), esta información se encuentra detallada en la Figura 8.

**Cuadro 5.** Frecuencia de serogrupos de *Leptospira* spp. identificados en *S. fuscicollis* y *S. imperator*.

Serogrupo	<i>Saguinus</i> spp.	<i>S. fuscicollis</i>	<i>S. imperator</i>
	Frecuencia	Frecuencia	Frecuencia
Iquitos	39.3% (22/56)	38.5% (10/26)	40% (12/30)
Icterohaemorrhagiae	14.28% (8/56)	27% (7/26)	3% (1/30)
Pomona	3.57% (2/56)	8% (2/26)	-
Autumnalis	1.78% (1/56)	-	3% (1/30)

**Figura 8.** Frecuencia de detección de serogrupos de *Leptospira* spp. por reacciones totales ( $n=38$ )



De los 56 primates evaluados, pertenecientes a 16 grupos familiares (8 de *Saguinus fuscicollis* y 8 de *Saguinus imperator*), aquellos individuos pertenecientes a un mismo grupo familiar fueron serorreactivos a al menos un serogrupo en común. En el Cuadro 6 se observa que ambas especies mostraron serorreactividad, en su mayoría (7 grupos familiares de *Saguinus fuscicollis* y 5 de *Saguinus imperator*), para el serogrupo Iquitos (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Número de grupos familiares de *Saguinus fuscicollis* y *S. imperator* que reaccionaron frente a cada serogrupo.

<b>Serogrupo</b>	<i>Saguinus fuscicollis</i>	<i>Saguinus imperator</i>
Iquitos	7	5
Icterohaemorrhagiae	5	1
Pomona	1	-
Autumnalis	-	1

Las muestras seropositivas presentaron títulos de microaglutinación desde 1/100 hasta 1/1600. El serogrupo al que fueron mayormente positivos fue Iquitos, siendo 22 de los primates positivos, dos de ellos con título de 1:200 y los otros 20 con título de 1/100. Para el serogrupo Icterohaemorrhagiae se presentaron títulos de 1/100 (2/29), 1/200 (4/29), 1/400 (1/29) y 1/1600 (1/29) (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Frecuencia de titulación mínima y máxima de anticuerpos contra serogrupos de *Leptospira spp.* en muestras positivas de *Saguinus spp.*

<b>SEROGRUPO</b>	<i>Saguinus spp.</i> (n=29)			
	<b>Titulación Mínima</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Titulación Máxima</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>Iquitos</b>	1/100	69% (20/29)	1/200	6.9% (2/29)
<b>Icterohaemorrhagiae</b>	1/100	6.9% (2/29)	1/1600	3.5% (1/29)
<b>Pomona</b>	1/100	3.5% (1/29)	1/400	3.5% (1/29)
<b>Autumnalis</b>	-	-	1/1600	3.5% (1/29)

## V. DISCUSIÓN

Para la determinación de la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. se utilizó la Prueba de Microaglutinación, considerada prueba Gold Standard serogrupo específica (Céspedes, 2005; Picardeau, 2012). Esta prueba puede ser empleada para evaluar el suero de cualquier animal y tanto la cantidad de antígenos a utilizar como los serogrupos que se pueden detectar varían según la necesidad de cada región (Faine, 1982). La prueba permite comprender la epidemiología de la leptospirosis (Levett, 2015), gracias a que permite identificar los serogrupos presentes en una población (Everard y Everard, 1993), siendo que a nivel mundial existe variación en los hospederos de mantenimiento y los serovares que portan (Hartskeerl y Terpstra, 1996). Por ello, es de importancia conocer los serogrupos prevalentes y sus posibles hospederos para poder conocer mejor la epidemiología de la enfermedad. Así, por ejemplo, en un estudio realizado en Puerto Rico por Kessler y Everard (1988) encontraron que un grupo de *Macaca mulatta* en semicautiverio presentó serorreactividad frente al serovar Icterohaemorrhagiae, mientras que Ibáñez *et al.* (2010) en un grupo en cautiverio de la misma especie encontraron los serovares Panama, Lai, Australis y Shermani. Los serogrupos presentes en determinada localidad dependen de la ecología del hospedador de mantenimiento. Aquellas regiones que presentan mayor diversidad de fauna silvestre soportan una variedad mayor de serogrupos que una región con pobre variedad de huéspedes (Levett, 2001).

El presente estudio se detectaron anticuerpos contra *Leptospira* spp. en primates neotropicales de vida libre del género *Saguinus* sp., con una frecuencia del 51.8% (29/56) para al menos un serovar de los 24 evaluados. Se encontró serorreactividad frente a cuatro serogrupos, los cuales fueron Autumnalis, Pomona, Icterohaemorrhagiae e Iquitos. Estudios anteriores como el realizado por Romero *et al.* (2011b), quienes evaluaron 21 serovares, encontraron una prevalencia del 23% (15/65) al evaluar primates pertenecientes a 9 especies distintas que se encontraban en cautiverio como parte de la colección del Zoológico de Matecaña, Ciudad de Pereira, Colombia. Los serovares con mayor frecuencia fueron Icterohaemorrhagiae, Pomona y Ranarum (Romero *et al.*, 2011b), siendo los primates que presentaron mayor reactividad *Ateles fusciceps*, *Cebus albifrons* y *Saguinus leucopus*. La prevalencia que encontraron Romero *et al.* (2011b) al evaluar únicamente primates del género *Saguinus* fue del 18.2% (2/11). En otro estudio realizado por Romero *et al.* (2012), donde se consideró seropositivo a partir de diluciones de 1/50, determinaron una frecuencia del 45.5% (5/11) para *S. oedipus* y *S. leucopus*, empleando 21 serovares. Detectando únicamente los serovares Cynopteri y Ranarum, los cuales no fueron encontrados en el presente estudios. Por otro lado, un estudio realizado por González-Astudillo *et al.* (2015) en *Saguinus* provenientes del tráfico ilegal en Colombia, encontraron una prevalencia del 11.1% (1/9),



utilizando 19 serovares. En dicho estudio, un único *Saguinus oedipus* reaccionó únicamente frente al serovar Manhao (González-Astudillo *et al.*, 2015).

Ha sido reportado que la crianza en cautiverio incrementa el riesgo de exposición a *Leptospira* spp., debido a que el comportamiento de los primates varía, volviéndose más terrestres que arbóreos, con ello se incrementa el riesgo de contacto con roedores y su orina (Szonyi *et al.*, 2011). Sin embargo, en el presente estudio la prevalencia encontrada fue superior que las determinadas en primates criados en cautiverio. Esto puede deberse a que en la crianza en cautiverio existe un plan de control de plagas como roedores, aves e insectos (SAG Ministerio de Agricultura, 2016), esto contribuiría a disminuir el riesgo de contacto con roedores o con orina contaminada proveniente de estos animales. Por otro lado, la baja prevalencia encontrada en cautividad de animales provenientes del tráfico ilegal podría estar relacionada a que los primates enfrentan una exposición previa a *Leptospira* spp. en vida libre, lo cual lleva a una disminución progresiva de anticuerpos cuando son cautivos (Almeida *et al.*, 2016). Incluso podría deberse a la baja cantidad de individuos del género *Saguinus* evaluados en los estudios realizados por Romero *et al.* (2011b, 2012) y González-Astudillo *et al.* (2015). Además, la diferencia de los resultados hallados en cautiverio con los del presente estudio puede deberse a que en cautiverio hay un contacto con especies de origen ecológico y antecedentes epidemiológicos diferentes a los encontrados en vida libre, lo que expone a los primates a diferentes serovares (Lilenbaum *et al.*, 2002).

En el presente estudio se encontraron los siguientes serovares: Varillal serogrupo Iquitos, Icterohaemorrhagiae serogrupo Icterohaemorrhagiae, Harjo serogrupo Pomona y Autumnalis serogrupo Autumnalis. De ellos, los serovares Autumnalis e Icterohaemorrhagiae han sido reportados por otros autores en algunas regiones amazónicas de Perú y en Lima. Así, por ejemplo, Céspedes *et al.* (2003) determinaron la prevalencia de leptospirosis humana en la provincia del Manu, Madre de Dios, Perú en el año 2000, encontrando una frecuencia de 36.6% (26/71) en las personas evaluadas. Los serovares encontrados fueron Georgia (13/71), Bratislava (4/71), Tarassovi (3/71), Cynoptery (3/71) y Canicola (3/71), y en menor proporción encontraron Wolfii, Pyrogenes, Grippytyphosa, Djasiman, Borincana, Ballum, Autumnalis y Bataviae (Céspedes *et al.*, 2003). Así también, Rivera *et al.* (2012) realizaron un estudio para evaluar diversidad genética de aislados provenientes de humanos, roedores y medio ambiente de los departamentos de Iquitos, Amazonas, Madre de Dios, Ucayali y Lima, siendo los serovares más frecuentes Icterohaemorrhagiae, Copenhageni y Canicola, no encontrándose el serogrupo Cynopteri. Otro estudio menciona que, a nivel de Perú, los serovares que se encuentran distribuidos principalmente son Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa, Pomona, Cynopteri, Georgia,

Canicola, Djasiman y Autumnalis (Oficina General de Epidemiología, 2000); sin embargo, no se menciona en qué regiones del Perú. La presencia de distintos serovares en diferentes regiones del Perú, muestra la variabilidad de éstos dependiendo de características ecológicas, ambientales y la distribución de diversos reservorios (Céspedes *et al.*, 2003). A pesar de ello, existen algunos serovares que son de presentación universal como Icterohaemorrhagiae y Canicola; así también existen otros serovares de presentación única en determinada región (Oficina General de Epidemiología, 2000).

Al evaluar la asociación entre la presencia de anticuerpos y el sexo a través de la prueba de Fisher no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el sexo, ni entre los rangos de edad y la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. Por lo que aparentemente tanto machos como hembras, sean individuos jóvenes, sub-adultos o adultos se encuentran expuestos a la bacteria estudiada.

En el presente estudio se encontraron niveles de anticuerpos entre 1/100 y 1/1600, predominando 1/100. Asimismo, Romero *et al.* (2012) encontraron principalmente niveles de aglutinación de 1/50 y 1/100. Además, en el presente estudio únicamente se encontraron títulos altos en un primate contra los serogrupos Icterohaemorrhagiae (1/1600) y Autumnalis (1/1600). Así mismo, Gonzales-Astudillo *et al.* (2015) encontraron un nivel de anticuerpos de 1/3200 en el único *Saguinus oedipus* seropositivo en dicho estudio. La presentación de títulos de anticuerpos altos (>1:1000) indicaría una infección activa (Dos Santos *et al.*, 2010). Además, debido a que la tasa de anticuerpos disminuye a través de los meses, es posible la persistencia de niveles residuales durante años, por lo que títulos de aglutinación bajos (1/100, 1/200) indicarían que el animal fue infectado anteriormente o que la infección está en curso (Picardeau, 2012).

En el presente trabajo los serogrupos más frecuentes fueron Iquitos serovar Varillal e Icterohaemorrhagiae serovar Icterohaemorrhagiae. Estos serovares han sido encontrados principalmente en roedores del género *Rattus*, siendo estos sus potenciales reservorios (Matthias *et al.*, 2008; Rivera *et al.*, 2012). Además, el serovar Icterohaemorrhagiae ha sido reportado en roedores silvestres en la ciudad de Iquitos (Rivera *et al.*, 2012). Por ello, considerando que existe contacto de los primates evaluados con los serogrupos mencionados, se podría sugerir la existencia de un ciclo entre roedores silvestres y primates del género *Saguinus*. Así también, los murciélagos son considerados como posibles reservorios de *Leptospira* spp. en un estudio realizado en la Amazonía peruana (Bunnell *et al.*, 2000), por lo que podría haber una transmisión por contacto indirecto. Por otro lado, en un estudio previo realizado por Matthias *et al.* (2008) el serovar Varillal serogrupo Iquitos ha sido reportado como una causa importante de leptospirosis aguda en humanos en la ciudad de Iquitos en Perú y ha sido clasificado como un serovar de

patogenicidad intermedia. Así, debido a que los serogrupos Iquitos e Icterohaemorrhagia fueron los de mayor frecuencia en los primates evaluados y que aquellos serogrupos junto con los serogrupos Pomona y Autumnalis han sido reportados en poblaciones humanas en la región de Madre de Dios por Céspedes *et al* (2006), podría sugerirse que existe un posible riesgo de transmisión de los primates hacia los humanos, quienes emplean a los primates como mascotas en regiones Amazónicas (Pacheco y Cornejo, 2011).

Los resultados muestran que cuatro de las muestras evaluadas fueron serorreactivas a varios serogrupos a la vez. Esto podría deberse a que en la fase aguda de la enfermedad suele ocurrir un gran grado de reacción cruzada entre varios serogrupos en la interpretación del MAT (Levett, 2001, World Health Organization, 2003). Además, altos títulos presentes en la prueba de Microaglutinación suelen presentarse seguido de una infección aguda (André-Fontaine, 2006). Así en la muestra que reaccionó para 6 serogrupos distintos (Icterohaemorrhagiae (1/1600), Autumnalis (1/1600), Bataviae (1/400), Shermani (1/200), Ballum (1/200), Hurstbridge (1/100)), se observó títulos altos (1/1600) lo cual indicaría una infección mixta para los serogrupos Icterohaemorrhagiae y Autumnalis, mientras que para el resto de serogrupos detectados sería posiblemente una reacción cruzada. Sin embargo, no se conoce en qué etapa de la infección se encontraban los primates al momento de la toma de muestra por lo que las coaglutinaciones también podrían estar relacionadas a infecciones por más de un serogrupo patógeno, (André-Fontaine, 2006) o por infecciones anteriores a diversos serovares (Céspedes, 2005). Al no poder realizar la diferenciación entre una reacción cruzada y una reacción verdadera debido a la imposibilidad de realizar una posterior evaluación del suero, se considera como serorreactivos únicamente a los serogrupos Icterohaemorrhagiae y Autumnalis. Por otro lado, las otras coaglutinaciones fueron Icterohaemorrhagiae (1/100) - Iquitos (1/100) - Hardjo (1/100), Icterohaemorrhagiae (1/100)-Iquitos (1/200).

Tanto los individuos de la especie *Saguinus fuscicollis* como los individuos de la especie *Saguinus imperator* fueron serorreactivos para los serogrupos Iquitos e Icterohaemorrhagiae por lo que se puede inferir la presencia de un grado de exposición a la misma fuente de infección.

## VI. CONCLUSIONES

Al menos el 10% de la población de primates del género *Saguinus* de la “Estación Biológica Los Amigos”, Madre de Dios, Perú, se encuentran naturalmente expuestos a la bacteria *Leptospira* spp.

Los primates del género *Saguinus* sp. evaluados se encuentran naturalmente expuestos a al menos 4 serogrupos patógenos de *Leptospira* spp.

Los serogrupos más frecuentes para ambas especies evaluadas fueron Iquitos e Icterohaemorrhagiae.

## VII. REVISIÓN BIBLIOGRAFÍA

1. Abela-Ridder B, Sikkema R, Hartskeerl RA. 2010. Estimating the burden of human leptospirosis. *International journal of antimicrobial agents*, Agents. 36: S5–7.
2. Adler B, de la Peña-Moctezuma A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 287-296.
3. Almeida DS, Santos ACD, Silva CLRD, Oriá AP, Oliveira AVD, Libório FA, Athanazio DA, Pinna MH. 2016. Evidence of leptospiral exposure in neotropical primates rescued from illegal trade and a Zoo in Bahia, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(9), 864-868.
4. Acha PN, Szyfres B. 2001. Zoonosis Y Enfermedades Transmisibles Comunes Al Hombre Y a Los Animales. Volumen I: Bacteriosis Y Micosis. Organización Panamericana de La Salud, 1(580), 1–6.
5. André-Fontaine G. 2006. Canine leptospirosis, do we have a problem? *Veterinary microbiology*, 117(1), 19-24.
6. Aquino R, Encarnación F. 1994. Primates of Peru. *Primate Report* 40: 1-127.
7. Aquino R, Terrones W, Navarro R, Terrones C, Cornejo FM. 2009. Hunting and conservation status of primates populations in the Itaya river basin, Loreto, Peru. *Revista Peruana de Biología* 15(2): 33-39.
8. Aragón I. 2007. Comportamiento de *Saguinus imperator* Goeldi, 1907 (Callitrichidae: Primates). En el Centro de Investigación y Capacitación Rio Los Amigos, Madre de Dios. Tesis para optar al título profesional de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
9. Auricchio P. 1995. *Primatas do Brasil*. Terra Brasilis Comércio de Material Didático e Editora.
10. Baitchman EJ, Calle PP, James SB, Linn MJ, Raphael BL. 2006. Leptospirosis in Wied's marmosets (*Callithrix kuhlii*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 37, 182-185.
11. Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, Vieira ML, Morais ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL. 2006. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infection and immunity*. 74(11), 6356-6364.
12. Bennet T, Abee C, Henrickson R. 1995. *Nonhuman Primates in Biomedical Research: Biology and Management*. Academic Press, San Diego, CA, USA.
13. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. 2003. Peru-United States Leptospirosis Consortium. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious diseases*, 3(12):757–771

14. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek EP, Alt D, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK, Adler B. 2006. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39), 14560-14565.
15. Bunnell JH, Hice CL, Watts DM, Montrueil V, Tesh RB, Vinetz JM. 2000. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infection among mammals captured in the Peruvian Amazon Basin Region. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 63:255-8.
16. Burth P, Younes-Ibrahim M, Santos MC, Castro-Faria Neto HC, De Castro Faria MV. 2005. Role of non esterified unsaturated fatty acids in the pathophysiological processes of leptospiral infection. *The Journal of infectious diseases*, 191(1):51–57
17. Burriel AR. 2010. Leptospirosis: an important zoonotic disease. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex, 687-693.
18. Cacciapuoti B, Ciceroni L, Maffei C, Di Stanislao F, Strusi P, Calegari L, Lupidi R, Scalise G, Cagnoni G, Renga G. 1987. A waterborne outbreak of leptospirosis. *American journal of epidemiology*, 126(3), 535-545.
19. Castro RF. 2010. La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo. *Gaceta medica de México*, 146(6), 423-429.
20. Carter G, Wise DJ. 2004. *Essential of Veterinary Bacteriology and Mycology* 6th Ed.
21. Cerqueira GM, Picardeau M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infection Genetic and Evolution*. 9:760–768.
22. Céspedes M, Ormaeche M, Condori P, Balda L, Glenney M. 2003. Prevalencia de leptospirosis y factores de riesgo en personas con antecedentes de fiebre en la provincia de Manu, Madre de Dios, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 20(4), 80-185.
23. Céspedes M. 2005. Leptospirosis: enfermedad zoonótica emergente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 22(4), 290-307.
24. Céspedes M, Balda L, González D, Tapia R. 2006. Situación de la leptospirosis en el Perú 1994-2004. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 23(1), 56-66.
25. Chapman CA, Peres CA. 2001. Primate conservation in the new millennium: the role of scientists. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews: Issues, News, and Reviews*, 10:16–33.
26. Chikeka I, Dumler JS. 2015. Neglected bacterial zoonoses. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(5), 404-415.
27. Collinge SK, Ray C. Eds. (2006). *Disease ecology: community structure and pathogen dynamics*. Oxford University Press.

28. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI. 2015 Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*. 9(9):1–19.
29. Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WHM. 2010. Public Health threat of new, reemerging and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerging Infectious Diseases*. 16(1):1-7.
30. De la Peña Moctezuma A, Bulach DM, Kalambaheti T, Adler B. 1999. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. *FEMS microbiology letters*, 177(2), 319-326.
31. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop* 78:103–116.
32. Defler TR. 2003. *Primates de Colombia*. Rodríguez Machecha JV ed. Conservación internacional, Bogotá, D.C. Colombia. 543 p.
33. Digby LJ, Ferrari SF, Saltzman W. 2006. The role of competition in cooperatively breeding species. *Primates in perspective*. Oxford University Press, New York, 85-106.
34. Dobson A, Foufopoulos J. 2001. Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:1001–1012.
35. Douglin CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, Levett PN. 1997. Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. *Emerging infectious diseases*, 3(1), 78.
36. Dos Santos C, Gírio RJ, Guerra-Neto G, Brich M, Santana L, Amâncio F, Mariani J, Wessort P. 2010. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em animais selvagens do zoológico municipal de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo State, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci*: 47(3):237-242
37. Ellis WA. 2015. Animal Leptospirosis. En: Adler B, ed. *Leptospira and Leptospirosis*. Springer, Berlin, Heidelberg. p 99-137.
38. Emmons LH, Feer F. 1999. *Mamíferos de los Bosques Húmedos de América Tropical: una guía de campo*. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia: Editorial FAN.
39. Encarnación F. 1990. Técnicas y sistemas de atrape o captura de primates en la Amazonía peruana. En: *La Primatología en el Perú, Volumen 1. Proyecto Peruano de Primatología*. Lima. 85-86.
40. Epple G. 1972. Social communication by olfactory signals in marmosets. *International Zoo Yearbook*, 12(1), 36-42.
41. Epple G, Katz Y. 1980. Social influences on first reproductive success and related behaviors in the saddle-back tamarin (*Saguinus fuscicollis*, Callitrichidae). *International Journal of Primatology* 1: 171-183.

42. Escribano R, Encinas A, Martín MA. 1997. Ecotonos: importancia de la transición entre las agrupaciones arbóreas y el matorral en la gestión forestal. Estudio de casos. Departamento de Proyectos de y Planificación rural ETS de Ingenieros Montes. Ciudad Universitaria, Madrid.
43. Everard JD, Everard COR. 1993. Leptospirosis in the Caribbean. *Rev Med Microbiol* 4:114–12.
44. Faine S. 1982. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization, Geneva.
45. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. 1999. A brief history of leptospirosis. En: Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P, eds. *Leptospira and leptospirosis*. 2° ed. Melbourne: MediSci. p 1-9.
46. Faisal SM, McDonough SP, Chang YF. 2012. *Leptospira*: Invasion, pathogenesis and persistence. En: Embers ME, ed. *The Pathogenic Spirochetes: strategies for evasion of host immunity and persistence*. Springer, Boston, MA. p 143-172.
47. Faria MTD, Calderwood M, Athanazio D, McBride AJA, Hartskeerl RA, Pereira MM, Ko AI, Reis MG. 2008. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop*; 108:1-5.
48. Ferrari FF, Ferrari MAL. 1989. A re-evaluation of the social organisation of the *Callitrichidae*, with reference to the ecological differences between genera. *Folia Primatol*. 52: 132-147.
49. Flores R. 2010. La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal, Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria (INIFAP). Mexico, D.F.
50. Fouts D, Matthias M, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L, Berg D, Bulach D, Buschiazzi A, Chang Y, Galloway R, Haake D, Haft D, Hartskeerl R, Ko A, Levett PN, Matsunaga J, Mechaly A, Monk J, Nascimento A, Nelson K, Palsson B, Peacock S, Picardeau M, Ricaldi J, Thaipandungpanit J, Wunder E Jr, Yang X, Zhang J, Vinetz J. 2016. What makes a bacterial species pathogenic? Comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2): e0004403
51. Freese CH, Heltne PG, Napoleon CR, Whitesides G. 1982. Patterns and determinants of monkey densities in Peru and Bolivia, with notes on distributions. *International Journal of Primatology*, 3(1), 53.
52. French JA, Abbott DH, Snowdon CT. 1984. The effect of social environment on estrogen excretion, scent marking, and sociosexual behavior in tamarins (*Saguinus oedipus*). *American Journal of Primatology* 6:155-167.
53. Gamberini M, Gomez R, Atzingen M, Martins E, Vasconcellos S, Romero E, Leite L, Ho P, Nascimento A. 2005. Whole genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify



- potential vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiology Letter*, 244(2):305–313.
54. Garber PA. 1988. Diet, foraging patterns, and resource defense in mixed species troop of *Saguinus mystax* and *Saguinus fuscicollis* in Amazonian Peru. *Behaviour* 105 (1-2): 18-34.
  55. Góngora A, Parra JL, Aponte LH, Gómez LA. 2008. Seroprevalencia de *Leptospira* spp. en grupos de población de Villavicencio, Colombia. *Rev. Salud Pública*; 10(2):269-278.
  56. Gonzalez-Astudillo V, Peña-Stadlin J, Astudillo-Hernández M. 2015. Anti-leptospiral agglutinins in marmosets (*Saguinus oedipus* and *Saguinus leucopus*) from illegal trade. *Revista MVZ Córdoba*, 20(3), 4790-4799.
  57. Goldizen AW. 1987. Facultative polyandry and the role of infant-carrying in wild saddle-back tamarins (*Saguinus fuscicollis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 20: 99-109.
  58. Grooms DL. 2006. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenology*, 66(3), 624-628.
  59. Haake DA. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*. 146(7):149150.
  60. Haake D, Chao G, Zuerner R, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect. Immun.* 68(4):2276–228
  61. Haake DA, Zückert WR. 2015. The leptospiral outer membrane. En: Adler B, ed. *Leptospira and Leptospirosis*. Springer, Berlin, Heidelberg. p187-221.
  62. Haig D. 1999. What is a marmoset? *American Journal of Primatology*. 49(4): 285-296.
  63. Hambleton P, Baskerville A, Marshall RB, Harris-Smith PW, Adams GD. 1980. Metabolic Sequelae of experimental leptospirosis in grivet monkeys. *British journal of experimental pathology*, 61(1), 16.
  64. Hartskeerl RA, Terpstra WJ. 1996. Leptospirosis in wild animals. *Vet. Q.* 18 (Suppl. 3): S149–S150.
  65. Hauk P, Negrotto S, Romero EC, Vasconcellos SA, Genovez ME, Ward RJ, Schattner M, Gómez RM, Ho PL. 2005. Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: potentiation of hemolytic activity by LipL32. *Biochem Biophys Res Commun*; 333(4): 1341-47.
  66. Hergt R. 1976. Meaning of serotype Patoc (biflexa complex) for the diagnosis of leptospirosis by microscopic agglutination test (author's transl). *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, 235(4), 506-511.

67. Hershkovitz P. 1977. Living New World monkeys (Platyrrhini). The University of Chicago Press, Chicago. 1117 pp.
68. Heymann EW, Sicchar L A. 1988. Interspecific social grooming in a mixed troop of tamarins, *Saguinus mystax* and *Saguinus fuscicollis* (Platyrrhini: callitrichidae), in an outdoor enclosure. *Folia Primatológica*.
69. Heymann EW. 2001. Interspecific variation of Scent Marking behaviour in wild Tamarins, *Saguinus mystax* and *Saguinus fuscicollis*. *Folia Primatologica* 72: 253-267
70. Hoke D, Egan S, Cullen P, Adler B. 2008. LipL32, an extracellular matrix interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Immun*, 76(5),2063–2069.
71. Ibáñez CA, Hernández GB, Torres BJ, Meléndez VP. 2010. Hallazgos de anticuerpos contra *Leptospira* sp., serovariedades Panama, Lai, Australis, Shermani y Patoc, en un grupo de monos rhesus (*Macaca mulatta*) en condiciones de cautiverio. *Archivos de medicina veterinaria*, 42(2), 101-104.
72. International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*. 1984. Minutes of the meeting, 6 to 10 August 1982, Boston, Massachusetts, USA, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34:258-259.
73. Instituto Nacional de Salud (INS). 2018. Enfermedades Zoonóticas: leptospirosis. *Bol. Inst. Nac. Salud*. 24 (3-4): 27-9
74. Jackson LA, Kaufmann AF, Adams WG, Phelps MB, Andreasen C, Langkop CW, Wenger JD. 1993. Outbreak of leptospirosis associated with swimming. *The Pediatric infectious disease journal*, 12(1), 48-54.
75. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2010. Microbiología Médica. En: *Espiroquetas y otros microorganismos espirales*. 25° ed. México: McGraw-Hill. p 308-310.
76. Karaseva EV, Chernukha Yu G, Sakhartseva TF. 1997. Results of the investigation of soil for contamination with pathogenic leptospires. *Folia Parasitol (Praha)*; 24(4): 301-4.
77. Kessle MJ, Everard COR. 1988. Leptospiral agglutinins in the Cayo Santiago macaques. *American Journal of Primatology*, 14(4), 369-373.
78. Kmety E, Dikken H. 1993. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. University Press Groningen, Groningen
79. Khan SJ, Khattak MB, Khan A. 2018. Leptospirosis: A disease with global prevalence. *Journal of Microbiology and Experimentation*. Volume 6, Issue 5.
80. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 7(10), 736-747.
81. Kowalewski MM, Urbani B, Tejedor M, Oklander L. 2016. Explorando al Orden Primate. *La Primatología como Disciplina Bioantropológica*. En: Madrigal L, González-José R. *Introducción a la antropología biológica*. p: 121-173.

82. Lee S, Kim K, Park Y, Seong I, Kim M, Lee Y. 2000. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Gene*. 254(1–2):19–28.
83. Lee S, Kim S, Park S, Kim M. 2002. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. *Infection and Immunity*. 70(1):315–322
84. Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Review*, 14 (2), 296-326.
85. Levett PN. 2004. Leptospirosis, a forgotten zoonosis?. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4(6), 435-448.
86. Levett PN, Haake DA. 2010. *Leptospira* species (leptospirosis). *Principles and practice of infectious diseases*. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 3059-3065.
87. Levett PN. 2015. Systematics of leptospiroaceae. En: Adler B, ed. *Leptospira and Leptospirosis*. Springer, Berlin, Heidelberg. p 11-20.
88. Lilenbaum W, Monteiro RV, Ristow P, Fraguas S, Cardoso VS, Fedullo LPL. 2002. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Research Veterinary Science*. 73(12):319-321
89. Lilenbaum W, Monteiro RV, Albuquerque CE, Ristow P, Fraguas S, Cardoso VS, Fedullo LPL. 2004. Leptospiral antibodies in wild felines from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Veterinary journal*.
90. iLouvel H, Bommezzadri S, Zidane N, Boursaux-Eude C, Creno S, Magnier A, Rouy Z, Medigue C, Saint Girons C, Bouchier I, Picardeau M. 2006. Comparative and functional genomic analyses of iron transport and regulation in *Leptospira* spp. *Journal of Bacteriology*. 188(22):7893–7904.
91. Lux R, Moter A, Shi W. 2000. Chemotaxis in pathogenic spirochetes: directed movement toward targeting tissues?. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2(4), 355-364.
92. Lynch Alfaro JW, Silva JD Jr, Rylands AB. 2012a. How different are robust and gracile capuchin monkeys? An argument for the use of *Sapajus* and *Cebus*. *Am J Primatol* 74: 273-286.
93. Lynch Alfaro JW, Boubli JP, Olson LE, Di Fiore A, Wilson B, Gutiérrez-Espeleta BA, Schulte M, Neitzel S, Ross V, Schwochow D, Farias I, Janson C, Alfaro ME. 2012b. Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. *J Biogeogr* 39:272-288.
94. Lynch Alfaro JW, Matthews L, Boyette AH, Macfarlan S J, Phillips KA, Falotico T, Ottoni E, Verderane M, Izar P, Schulte M, Melin A, Fedigan L, Janson C, Alfaro ME. 2012c. Anointing variation across wild capuchin populations: a review of material

- preferences, bout frequency and sociality of anointing in *Cebus* and *Sapajus*. *Am J Primatol* 74:299-314.
95. Matthias MA, Díaz MM, Campos KJ, Calderon M, Willig MR, Pacheco V, Vinetz JM. 2005. Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by Bayesian phylogenetic analysis of 16s ribosomal DNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(5): 964–974.
  96. Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, Steigerwalt AG, Patra KP, Ore CV, Gotuzzo E, Gilman RH, Levett PN, Vinetz JM. 2008. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a rattus species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2(4):e213.
  97. Mack D, Eudey A. 1984. A review of the U.S. primate trade. En: Mack D, Mittermeier RA, eds. *The International Primate Trade*. Washington. 91-136.
  98. McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. 2005. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 18:376-386
  99. Medeiros FR, Spichler A, Athanazio DA. 2010. Leptospirosis associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Trop*. 115: 155.162
  100. Ministerio de Salud. 2019. Boletín Epidemiológico del Perú. Volumen 28 - SE 13 (Semana Epidemiológica del 24 al 30 de marzo).
  101. Monsalve S, Mattar S, Gonzalez M. 2009. Zoonosis transmitidas por animales silvestres y su impacto en las enfermedades emergentes y reemergentes. *Rev. MVZ Córdoba*; 14(2):1762-1773.
  102. Murray G, Srikram A, Henry R, Puapairoj A, Sermswan R, Adler B. 2009. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. *Microbes and Infection*. 11(2):311–314.
  103. Nally J, Chow E, Fishbein, Blanco D, Lovett M. 2005. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infect Immun*. 73(6):3251–3260
  104. Narayanavari SA, Sritharan M, Haake DA, Matsunaga J. 2012. Multiple leptospiral sphingomyelinases (or are there?). *Microbiology*. 158:1137-46.
  105. Oficina General de Epidemiología. 2000. Instituto Nacional de Salud. Leptospirosis. Módulos Técnicos Serie Documentos Monográficos, (2).
  106. Pacheco V, Cornejo FM, Sánchez A, Güisa M, Serrano J. 2011. Estudio de especies CITES de Primates Peruanos. Perú: Ministerio del Ambiente (MINAM).
  107. PAHO. 1995. Regional plan of action for combating new, emerging, and re-emerging infectious diseases in the Americas. Workshop on combatting emerging infectious diseases: challenges for the Americas. Washington, DC: USA, Jun 14-15.

108. Palmer M, Waitkins S, Fitzgeorge R, Baskerville A. 1987. Experimental infection of monkeys with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Epidemiology and Infection*. 98(2):191-197.
109. Pedersen K, Anderson TD, Maison RM, Wiscomb GW, Pipas MJ, Sinnott, DR, Baroch JA, Gidlewski T. 2018. *Leptospira* antibodies detected in wildlife in the USA and the US Virgin Islands. *Journal of wildlife diseases*, 54(3), 450-459.
110. Pereira M, Da Silva JJ, Pinto M, Da Silva M, Machado M, Lenzi H, Marchevsky R. 2005. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 72(1): 13-20.
111. Perolat P, Poingt J, Vie J, Jouaneau C, Baranton G, Gysin J. 1992. Occurrence of severe Leptospirosis in a breeding colony of squirrel monkeys. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 46: 538-545.
112. Petrakovsky J, Bianchi A, Fisun H, Nájera-Aguilar P, Pereira MM. 2014. Animal leptospirosis in Latin America and the Caribbean countries: reported outbreaks and literature review (2002-2014). *International Journal Environment Research Public Health*, 11, 10770–10789.
113. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A, Johnson MJ, Boursaux-Eude C, Seemann T, Rouy Z, Coppel RL, Rood JI, Lajus A, Davies JK, Médigue C, Adler B. 2008. Genome sequence of the *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 3, e1607.
114. Picardeau M. 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*. 43(1), 1-9.
115. Pimentel J, Gennari S, Dubey J, Marvulo M, Vasconcellos S, Morais Z, Silva J, Neto J. 2009. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. *Pesq Vet Bras*. 29(12):1009-1014
116. Porter LM. 2001. Dietary differences among sympatric Callitrichinae in northern Bolivia: *Callimico goeldii*, *Saguinus fuscicollis* and *S. labiatus*. *International Journal of Primatology* 22(6): 961-992.
117. Ramírez N, Alegre E, Ruiz R, De Biasio M, Bastiani C. 2014. Detección de leptospiras patógenas en tejido renal de murciélagos de Corrientes, Argentina. *Revista Veterinaria*, 25(1), 16–20.
118. Reid HA, Herron AJ, Hines ME, Orchard EA, Altman NH. 1993. Leptospirosis in a white-lipped tamarin (*Saguinus labiatus*). *Lab Anim Sci* 43(3), 258-259.

119. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HG, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Girons IS, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Guo Xu JG, Zhao GP. 2003. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 422(6934), 888.
120. Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride FW, Figueira CP, Huerre M, Ave P et al. 2007. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog.* 3:e97.
121. Rivera P, Tiella M, Balda L, Gonzalez, D, Céspedes M. 2012. Diversidad genética de aislamientos peruanos de *Leptospira* spp. mediante electroforesis en gel de campo pulsado. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 29(4), 469-476.
122. Romero MH, Sánchez JA, González LM. 2011a. Review on the Importance of Wild Fauna in Leptospirosis Epidemiology. *Biosalud*, 10(2), 112–122.
123. Romero MH, Astudillo M, Sánchez JA, González LM, Varlea N. 2011b. Anticuerpos contra *Leptospira* sp. en primates neotropicales y trabajadores de un zoológico colombiano. *Revista De Salud Pública (Bogotá, Colombia)*, 13(5), 814–823.
124. Romero M, Astudillo M, Sánchez J, González L, Varela N. 2012. Títulos de anticuerpos contra *Leptospira* sp., en primates del zoológico Matecaña, Pereira, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*. 17(3): 3224-3230.
125. Romero-Vivas C, Falconar A. 2016. *Leptospira* spp. y leptospirosis humana. *Revista Científica Salud Uninorte*. 32 (1): 123-143.
126. SAG, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. 2016. Criterio técnico para la mantención y el manejo de fauna silvestre en Cautiverio. Disponible en: [http://www.sag.cl/sites/default/files/criterios\\_tec\\_mantencion\\_fauna\\_silv\\_cautiverio.pdf](http://www.sag.cl/sites/default/files/criterios_tec_mantencion_fauna_silv_cautiverio.pdf)
127. Sagrada, Espafia, De Paterna. 2017. “Boletín Epidemiológico Del Perú.” Ministerio de Salud 1 (1).
128. Seguro A, Lomar A, Rocha A. 1990. Acute renal failure of leptospirosis: nonoliguric and hypokalemic forms. *Nephron*. 55(2):146–15
129. Scarcelli E, Piatti R, Fedullo J, Faiçal S, Cardoso M, Castro V, Miyashiro S, Genovez M 2003. *Leptospira* spp. detection by polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples of captive black-capped capuchin monkey (*Cebus apella*). *Brazilian Journal of Microbiology*. 34:143-146.
130. Sitio Web Asociación para la Conservación de la Cuenca Amazónica (ACCA) Los Amigos (CICRA). Disponible en: <http://acca.org.pe/nuestras-estaciones-biologicas/los-amigos-cicra/>.

131. Sleeman J. 2006. Wildlife zoonoses for the veterinary practitioner. *Journal of Exotic pet medicine*; 15(1):25-32.
132. Snowdon CT, Soini P. 1988. The tamarins, genus *Saguinus*. En: Mittermeier, R, Rylands A, Coimbra-Filho A, Fonseca G, eds. *Ecology and Behavior of Neotropical Primates*. World Wildlife Fundation. Washington. 2: 223-298.
133. Soini P. 1987. Ecology of the saddle-back tamarin *Saguinus fuscicollis illigeri* on the Río Pacaya, northeastern Peru. *Folia Primatologica* 49: 11-32.
134. Soini P. 1990. Ecología y dinámica poblacional de pichico común *Saguinus fuscicollis* (Callitrichidae, Primates). *La Primatología en el Perú.: Investigaciones primatólogicas (1973–1985)*. Proyecto Peruano de Primatología (Ed), 202-253. Soini P, Soini M, Aquino R, Encarnación F, Moya L, Tapia J. 1990. Aspectos bioecológicos de las especies de los géneros *Saguinus* y *Cebuella*. En: *La Primatología en el Perú, Volumen 1*. Proyecto Peruano de Primatología. Lima. 36-44 pp.
135. Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, DeMoll E, Kraiczy P, Cooley AE, Creamer TP, Suchard MA, Brissette, C. A, Verma A, Haake DA. 2007. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PloS one*, 2(11), e1188.
136. Swenson JJ, Carter CE, Domec JC, Delgado CI. 2011. Gold mining in the Peruvian Amazon: global prices, deforestation, and mercury imports. *PloS one*, 6(4), e18875.
137. Szonyi B, Agudelo-Flórez P, Ramírez M, Moreno N, Ko AI. 2011. An outbreak of severe leptospirosis in capuchin (*Cebus*) monkeys. *The Veterinary Journal*, 188(2), 237-239.
138. Takafuji ET, Kirkpatrick JW, Miller RN, Karwacki JJ, Kelley PW, Gray MR, McNeill KM, Timboe HL, Kane RE, Sanchez JL. 1984. An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. *New England Journal of Medicine*, 310(8), 497-500.
139. Terborgh J. 1983. *Five New World primates: A study in comparative ecology*. Princeton University Press. New Jersey. 312 pp.
140. Tian Y, Hung C, Li Y, Chen Y, Chang M, Yen T, Hsu, Wu M, Phillips A, Yang C. 2010. *Leptospira santorosai* serovar Shermani detergent extract induced an increase in fibronectin production through a toll-like receptor2-mediated pathway. *Infect Immun* 79(3):1134–1142.
141. Vashi NA, Reddy P, Wayne DB, Sabin B. 2010. Bat-associated leptospirosis. *Journal of General Internal Medicine*, 25(2), 162–164
142. Verma A, Hellwage J, Artiushin S, Zipfel PF, Kraiczy P, Timoney JF, Stevenson B. 2006. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infection and immunity*, 74(5), 2659-2666.

143. Weese JS, Fulford MB, eds. 2011. Companion animal zoonoses. John Wiley and Sons. p 158-164.
144. Windfelder T.L. 2000. Observations on the birth and subsequent care of twin offspring by a lone pair of wild emperor tamarins (*Saguinus imperator*). *American Journal of Primatology* 52: 107–113.
145. World Health Organization. 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control (No. WHO/CDS/CSR/EPH 2002.23). Geneva: World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/42667>.
146. Xue F, Yan J, Picardeau M. 2009. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. *Microbes Infect* 11(3):328–333.



## ANEXO 1

**Cuadro 8.** Cálculo de valor de p mediante el Test de Fisher entre sexos

<i>Saguinus sp.</i> (n=56)	Sexo		Test de Fisher
	Machos (n=32)	Hembras (n=24)	
<b>Frecuencia</b>	59.4% (19/32)	41.7% (10/24)	0.28

**Cuadro 9.** Cálculo de valor de p mediante el Test de Fisher entre edades

<i>Saguinus sp.</i> (n=56)	Edad		Test de Fisher
	Juvenil	Sub-adulto	
<b>Frecuencia (%)</b>	63.6 (7/11)	50 (5/10)	0.67

<i>Saguinus sp.</i> (n=56)	Juvenil	Adulto	Test de Fisher
	<b>Frecuencia (%)</b>	63.6 (7/11)	

<i>Saguinus sp.</i> (n=56)	Sub-adulto	Adulto	Test de Fisher
	<b>Frecuencia (%)</b>	50 (5/10)	