

Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión)

C. Alonso-Andicoberry ¹, F.J. García-Peña ², L.M. Ortega-Mora ¹ *

¹ Dpto. de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid,
Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid.

² Dpto. de Bacteriología, Laboratorio Central de Veterinaria de Algete, Madrid.

luis.ortega@vet.ucm.es

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad de epidemiología compleja, producida por la infección con espiroquetas del género *Leptospira*. En el ganado bovino puede cursar con diferentes cuadros clínicos, que pueden ir desde un cuadro agudo/hiperagudo con fiebre, hematuria, hemoglobinuria, meningitis e incluso mortalidad a un cuadro crónico cuya única sintomatología aparente es el fallo reproductivo. El diagnóstico de la enfermedad no es sencillo, a pesar de que en la actualidad existe un amplio número de técnicas laboratoriales disponibles. Debido a los efectos sobre la producción del rebaño y al hecho de que es una zoonosis, el control de la leptospirosis merece una atención especial, siendo necesaria la utilización de medidas complementarias entre sí, como el tratamiento con antibióticos, la vacunación y la profilaxis higiénico-sanitaria, para evitar las pérdidas económicas derivadas de la introducción de esta enfermedad en una explotación.

PALABRAS CLAVE: *Leptospira*
Ganado bovino
Epidemiología
Diagnóstico
Control

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial que afecta a los mamíferos tanto domésticos como silvestres, aunque el agente también se ha aislado de otros vertebrados, como aves y anfibios (Thiermann, 1984). La enfermedad puede estar causada por

* Autor para correspondencia
Recibido: 28-5-01
Aceptado para su publicación: 3-10-01

cualquiera de las espiroquetas parásitas clasificadas dentro del género *Leptospira*. Estas cepas patógenas se dividen basándose en sus diferencias antigénicas en serovares, siendo el serovar el taxón básico. Los serovares relacionados antigénicamente se clasifican dentro de un mismo serogrupo (Dikken y Kmety, 1978; Timoney *et al.*, 1988). En todo el mundo se han descrito más de 220 serovares pero, frecuentemente, las infecciones se producen por un número limitado de serovares endémicos de una región o país y su presencia está íntimamente ligada a factores ecológicos y medioambientales (Thiermann, 1984).

En el ganado bovino, la leptospirosis produce pérdidas económicas de manera primaria por sus efectos sobre la reproducción, pudiendo aparecer mortinatos, abortos y/o nacimiento de animales débiles e infertilidad (Ellis, 1994). Resulta difícil estimar las pérdidas por este concepto, en gran parte por las dificultades inherentes al diagnóstico de la enfermedad (Thiermann, 1984). En España, Adúriz *et al.* (1999) consideran a la leptospirosis una causa importante de abortos, aunque por debajo de otras como la diarrea vírica bovina o la neosporosis. De manera secundaria, también puede haber pérdidas económicas como consecuencia del «síndrome de caída de la leche» o agalactia transitoria producida por estos microorganismos (Ellis, 1983). Por último, en animales jóvenes puede darse, aunque con poca frecuencia, un cuadro agudo grave que cursa con fiebre, ictericia, hemorragias y hemoglobinuria y que frecuentemente es de curso fatal.

Finalmente, la leptospirosis es una zoonosis (Faine, 1982), por lo que a los efectos sobre la producción animal se le añade un importante aspecto sanitario. El ser humano no actúa como hospedador de mantenimiento de ningún serovar, por lo que la infección será siempre accidental (Sullivan, 1974; Heath y Johnson, 1994). Algunas prácticas laborales, como el trabajo en arrozales, minería y trabajos en agricultura y ganadería (veterinarios, ganaderos, trabajadores de mataderos...), así como ciertas actividades recreativas que implican contacto con aguas posiblemente contaminadas (baños en medios naturales, deportes acuáticos, etc.), suponen los riesgos de contagio más importantes. El serovar implicado con mayor frecuencia es *Leptospira icterohaemorrhagiae*, siendo también bastante habituales las infecciones por *Leptospira pomona* y *Leptospira hardjo* entre ganaderos y trabajadores de mataderos (Pumarola, 1995). Además del riesgo sanitario, hay que tener en cuenta la vertiente económica derivada de los gastos originados por el cuidado médico de los pacientes, bajas laborales, pérdida de productividad y capacidad de trabajo, vigilancia y control de los lugares de trabajo, ropas especiales de protección, seguros médicos para el personal en riesgo, etc. (Covaleda *et al.*, 1953; Faine, 1991).

EPIDEMIOLOGÍA

El género *Leptospira* pertenece a la familia *Leptospiraceae*, segunda familia del orden *Spirochaetales* (Canale-Parola, 1984). En la última edición del «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» (1984) se le reconoce como único género dentro de dicha familia, dentro del cual se incluyen tres especies: *Leptospira interrogans*, *Leptospira biflexa* y *Leptospira illini*, esta última considerada de «estado taxonómico incierto» (Johnson y Faine, 1984). El criterio de clasificación clásico para el género *Leptospira* lo divide en dos especies: *L. interrogans*, que incluye todas las leptospiros patógenas y/o de vida parásita y *L. biflexa*, especie en la que se engloban todas las saprofitas. En la actualidad, gracias a la utilización de nuevas herramientas y métodos de clasificación, esta taxonomía está cam-

biando y se han reconocido hasta diez especies dentro del género *Leptospira* (Holt *et al.*, 1994). En la Tabla 1 se muestra un resumen de la lista oficial de los serogrupos y serovares más representativos (Kmetz y Dikken, 1988; 1993).

Tabla 1
Resumen de los serogrupos y serovares más representativos de la especie
L. interrogans

| Serogrupo | Serovares más representativos |
|----------------------------|---|
| Australis | <i>australis, bratislava</i> |
| Autumnalis | <i>autumnalis</i> |
| Ballum | <i>ballum, castellonis</i> |
| Bataviae | <i>bataviae</i> |
| Canicola | <i>canicola</i> |
| Cynopteri | <i>cynopteri</i> |
| Grippotyphosa | <i>grippotyphosa</i> |
| Hebdomadis | <i>hebdomadis</i> |
| Icterohaemorrhagiae | <i>copenhagheni, icterohaemorrhagiae</i> |
| Javanica | <i>javanica, poi</i> |
| Louisiana | <i>louisiana</i> |
| Mini | <i>swajizak</i> |
| Pomona | <i>pomona</i> |
| Pyrogenes | <i>pyrogenes</i> |
| Sarmin | <i>sarmin</i> |
| Sejroe | <i>hardjo, saxkoebing, sejroe, wolffi</i> |
| Shermani | <i>shermani</i> |
| Tarassovi | <i>tarassovi</i> |

Rango de hospedadores

Las diferentes cepas patógenas de leptospirosas pueden afectar, potencialmente, a un gran número de especies animales, que actuarán como hospedadores de mantenimiento o accidentales en función del serovar considerado. Se considera como hospedador de mantenimiento a aquel que asegura la perpetuación de una población determinada de agentes infecciosos, sin la intervención de ningún hospedador accidental. Por tanto, la población de mantenimiento será aquella población de una o varias especies animales que actúan como reservorio continuo de un serovar, en un ecosistema determinado (Little, 1986). Una o más especies de mamíferos silvestres o domésticos, actúan de hospedadores de mantenimiento de cada serovar de leptospirosas patógenas (WHO, 1965), pudiendo ser una especie animal reservorio de varios serovares y diferentes especies animales serlo de un mismo serovar (Trap, 1988). Estos hospedadores de mantenimiento actúan de fuente de infección del serovar que mantienen para otros mamíferos de la misma u otra especie y se caracterizan por (Ellis, 1983; Little, 1986; Pritchard, 1986; Timoney *et al.*, 1988; Prescott, 1993):

- Gran receptividad a la infección por el serovar que mantienen.
- Relativa baja patogenicidad del microorganismo en el hospedador.

- Presencia de infección renal con leptospiruria prolongada.
- En algunos hospedadores, mantenimiento de las leptospiras en el tracto genital (Ellis *et al.*, 1986b).
- Transmisión eficaz de la infección a los animales de la misma especie.

La transmisión de la infección entre hospedadores de mantenimiento se realizará independientemente de las condiciones climáticas y ambientales. Sin embargo, en el caso de la transmisión de un hospedador de mantenimiento a un hospedador accidental o entre hospedadores accidentales, será necesario que las condiciones ambientales sean las adecuadas para la supervivencia de las leptospiras fuera del hospedador (Thiermann, 1984; Prescott, 1993; Ellis, 1994).

El ganado bovino actúa como hospedador de mantenimiento del serovar *hardjo* (Ellis *et al.*, 1981), no conociéndose para este serovar ningún reservorio silvestre (Ellis, 1983). Posteriormente, también se ha identificado al ganado ovino como hospedador de mantenimiento de este serovar (Cousins *et al.*, 1989; Gerritsen *et al.*, 1994), constituyendo por tanto una fuente de infección para el ganado bovino.

En el caso de las infecciones por serovares accidentales, a pesar de que el ganado bovino puede infectarse por cualquiera de los serovares patógenos, sólo un número limitado de ellos serán endémicos en un país o región particular. Así, *pomona* es el serovar accidental más frecuente en Norteamérica, Australia y Nueva Zelanda, *grippityphosa* en Rusia, Israel y ciertas partes de África, mientras que en la zona del Caribe, la infección accidental más habitual se debe a cepas del serovar *autumnalis* (Ellis, 1994).

Aunque las diferentes especies de animales domésticos actúan como hospedadores de mantenimiento de determinados serovares, los animales silvestres son, probablemente, los reservorios de la mayor parte de los serovares de leptospiras patógenas. En la Tabla 2, se hace un resumen de las especies silvestres identificadas como hospedadores de mantenimiento en el continente europeo de algunos serovares de importancia. Las características diferenciales de la leptospirosis en un hospedador de mantenimiento y otro accidental y algunos ejemplos de serovares adaptados a especies domésticas se recogen en la Tabla 3 (Heath y Johnson, 1994).

Distribución geográfica y prevalencia

La leptospirosis es una enfermedad cosmopolita (Sullivan, 1974; Thiermann, 1984), aunque como ya se ha citado, hay diferencias geográficas en la distribución de los diferentes serovares.

La prevalencia de la enfermedad varía notablemente entre los distintos países, e incluso entre las diferentes regiones de un mismo país. En España, la mayoría de los estudios realizados datan de la década de los setenta, aunque hay aportaciones más recientes como son los trabajos de Atxaerandio *et al.* (1998), Guitián *et al.* (1998), Espí *et al.* (2000) y Alonso-Andicoberry *et al.* (2001), todos ellos realizados en la zona norte de nuestro país.

Los principales estudios de prevalencia realizados en España, se recogen en la Tabla 4. Es importante destacar la baja prevalencia del serovar *hardjo* y la aparición, en los estudios más recientes, del serovar *bratislava* como el serovar accidental más importante.

Tabla 2
Especies silvestres que actúan como hospedadoras de mantenimiento de distintos serovares de *Leptospira* en Europa

| Especie animal | País | Serovar detectado | Referencia bibliográfica |
|---|------------------|---|--|
| Rata gris (<i>Rattus norvegicus</i>) | Toda Europa | <i>icterohaemorrhagiae</i> <i>copenhagheni</i> | Salt y Little, 1977; Trap, 1988; Hartskeert y Terpstra, 1996 |
| Rata negra (<i>Rattus rattus</i>) | Toda Europa | <i>icterohaemorrhagiae</i> | Trap, 1988; Heath y Johnson, 1994; Hartskeert y Terpstra, 1996 |
| Coipo (<i>Myocastor coypus</i>) | Francia | <i>icterohaemorrhagiae</i> | Trap, 1988 |
| Topillo (<i>Microtus arvalis</i>) | Holanda, Francia | <i>grippotyphosa</i> | Trap, 1988; Hartskeert y Terpstra, 1996 |
| Musaraña común (<i>Crocidura russula</i>) | Holanda | <i>mozdok, poi</i> | Hartskeert y Terpstra, 1996 |
| Ratón de campo (<i>Apodemus sylvaticus</i>) | Inglaterra | <i>ballum, seiroe</i> | Salt y Little, 1977; Trap, 1988 |
| Ratón casero (<i>Mus domesticus</i>) | Francia, Holanda | <i>ballum, mozdok</i> | Trap, 1988 |
| Tejón (<i>Meles meles</i>) | Inglaterra | Australis, Javanica y Hebdomadis ¹ | Salt y Little, 1977 |
| Erizo (<i>Erinaceus europaeus</i>) | Francia | <i>australis, bratislava,</i> <i>muenchen</i> | Trap, 1988 |

¹ En este caso se trata de serogrupos.

Tabla 3
Características diferenciales entre el hospedador de mantenimiento y el hospedador accidental

| Factor estudiado | Hospedador de mantenimiento | Hospedador accidental |
|---------------------------------------|---|--|
| Transmisión de leptospirosis | Frecuente intraespecie | Esporádica intraespecie |
| Signos de enfermedad aguda | Benignos (ej. agalactia) | Graves (ej. hepatitis, crisis hemolíticas, etc.) |
| Presentación de la enfermedad crónica | Infertilidad, uveítis ¹ | Ninguna |
| Duración de la leptospirosis | Prácticamente toda la vida | Días a semanas |
| Porcentaje de población seropositiva | Alta. Aumenta con la edad de los animales | Baja. No afectada por la edad de los animales |
| Muestras para el diagnóstico | Rebaño | Animal afectado |
| Ejemplos de serovares: | | |
| Bovinos | <i>hardjo</i> | <i>grippotyphosa</i> |
| Porcinos | <i>bratislava</i> | <i>autumnalis</i> |
| Perro | <i>canicola</i> | <i>icterohaemorrhagiae</i> |
| Caballo | <i>bratislava</i> | <i>pomona</i> |
| Ciervo | <i>pomona</i> | <i>hardjo</i> |
| Roedores | <i>icterohaemorrhagiae</i> | <i>pomona</i> |

¹ En caballos.

Tabla 4
Estudios de prevalencia de la infección por *Leptospira* en el ganado bovino en España

| Región | N.º muestras ¹ | Prevalencia (%) y punto de corte | Técnica | N.º serovares estudiados | Serovares presentes y prevalencia (%) | Referencia bibliográfica |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------------|--------------------------|--|--|
| ASTURIAS ³ | 3578 s. | 10,4 >1:10 | MAT ⁴ | 6 | <i>pomona</i> <i>grippityphosa</i> | Espí, 1995 |
| BARCELONA ³ | 120 s. | 17,8 >1:100 | MAT | 3 | <i>pomona</i> <i>icterohaemorrhagiae</i> | Covaleda y Pumarola, 1956 |
| CÓRDOBA ² | | 45-50 | MAT | 14 | <i>pomona</i> | León Vizcaino <i>et al.</i> , 1977 |
| CÁDIZ ³ | 560 s. 84 r. | 42,1 70,5 >1:500 | MAT | 13 | <i>icterohaemorrhagiae</i> <i>pomona</i> | León Vizcaino y Miranda García, 1976 |
| GALICIA ² | 442 s. | >1:30 | MAT | 11 | <i>bratislava</i> <i>grippityphosa</i> | Guitián <i>et al.</i> , 1998 |
| LEÓN ³ | 1193 s. 215 r. | 7,6 42,8 | MAT | 11 | <i>bratislava</i> <i>hardjo</i> <i>grippityphosa</i> | Alonso Andicoberry <i>et al.</i> , 2001 |
| PAÍS VASCO ² | 697 s. | >1:10 | MAT | 11 | <i>bratislava</i> <i>hardjo</i> <i>pomona</i> | 25,4 8,2 7,7 Atxaerandio <i>et al.</i> , 1998 |
| SEVILLA ³ | 644 s. 122 r. | 28,9 41,8 >1:500 | MAT | 14 | <i>icterohaemorrhagiae</i> <i>pomona</i> <i>sejroe</i> | León Vizcaino <i>et al.</i> , 1978 |

1. Sueros (s.); rebaños (r.).

2. Animales con fallos reproductivos.

3. Animales tomados al azar.

4. Aglutinación microscópica (*Microagglutination Test*).

En la Tabla 5 se muestra un resumen de los principales estudios de prevalencia de la leptospirosis en el ganado bovino en Europa y otros países del mundo. El Reino Unido parece ser el país europeo con mayor prevalencia de la infección por *Leptospira* (Ellis y Michna, 1976b) y *hardjo* se presenta como el serovar más prevalente en este país, así como en otras muchas zonas del planeta.

Aunque la mayoría de los trabajos son estudios de seroprevalencia individual y generalmente en la población adulta, también se pueden encontrar datos de seroprevalencia fetal y de tasas de aislamiento, estas últimas tanto en fetos como en adultos. Algunas de estas investigaciones se encuentran resumidas en la Tabla 6.

Modos de transmisión y fuentes de infección

El modo más frecuente de transmisión en el caso de serovares adaptados como *hardjo*, es la transmisión horizontal directa, mientras que la transmisión horizontal indirecta tiene un papel más importante en las infecciones accidentales y se produce tras la exposición del animal a un ambiente contaminado con material infectante (Ellis, 1994).

La transmisión por contacto directo puede producirse de diversas maneras, siendo una de las más importantes la entrada de leptospiras por vía inhalatoria o conjuntival, procedentes de núcleos goticulares formados por la dispersión de la orina de animales infectados. Esto es debido a que los hospedadores de mantenimiento de un determinado serovar eliminan gran cantidad de microorganismos en su orina durante un período de tiempo prolongado, por lo que las gotículas de orina tendrán una alta concentración de gérmenes. Este hecho, unido a la alta receptividad de los hospedadores de mantenimiento a la infección por el serovar adaptado, supone que esta forma de transmisión juegue un papel principal.

Otra forma de transmisión directa sería la transmisión venérea. Aunque la presencia de leptospiras en el semen y tracto genital del toro ha sido observada (van der Hoeden, 1958; Ellis *et al.*, 1986a), la transmisión sexual no ha sido plenamente demostrada en el ganado bovino, si bien se supone que es una de las más importantes para las cepas del serovar *hardjo* genotipo Hardjoprajtino (Ellis 1994). En cambio, se sabe que es una vía fundamental en otras especies cuyos hábitats se encuentran en áreas de características climáticas o de densidad poblacional desfavorables para la transmisión de la enfermedad de manera indirecta (Little, 1986).

La transmisión indirecta juega un papel más destacado en el caso de infecciones por serovares accidentales. La forma de transmisión más frecuente, tanto en el hombre como en los animales, es el contacto de la piel o mucosas con agua o barro contaminados con orina infectada. Por último, diferentes autores han evaluado la hipótesis de que los artrópodos podrían jugar un papel relevante en la transmisión de la leptospirosis. Así se cree que las moscas, las garrapatas, las pulgas, los ácaros y los piojos pueden ser transmisores mecánicos de la infección (Michna, 1970; Amatredjo y Campbell, 1975).

Además de lo anteriormente descrito, los autores han demostrado la existencia de una transmisión vertical, tanto por vía transplacentaria como por vía galactófora (Amatredjo y Campbell, 1975).

Tabla 5
Estudios de prevalencia de la infección por *Leptospira* en el ganado bovino en diferentes países del continente europeo y del resto del mundo

| Región | N.º muestras ¹ | Prevalencia (%) y punto de corte | Técnica | N.º serovares estudiados | Serovares presentes y prevalencia (%) | Referencia bibliográfica |
|--------------------|---------------------------|----------------------------------|------------------|--------------------------|--|--------------------------------|
| EUROPA | | | | | | |
| ALEMANIA | 11081 s. | 2,4 >1:400 | MAT ² | 10 | <i>hardjo</i> <i>grippotyphosa</i> | Schonberg <i>et al.</i> , 1986 |
| BÉLGICA | 9261 s. | 9,9 >1:500 | MAT | 12 | <i>hebdomadis</i> | Desmecht, 1986 |
| FRANCIA | 1631 s. | 1,8 >1:100 | MAT | 7 | <i>sejroe</i> <i>australis</i> | Gaumont y Trap, 1986 |
| HOLANDA | 6359 s. | 26,1 >1:100 | MAT | 11 | <i>grippotyphosa</i> <i>copenhaghensi</i> | Bercovich, 1986 |
| IRLANDA | 2415 s. | 19,7 >1:100 | MAT | 1 | <i>hardjo</i> | Egan, 1986 |
| PORTUGAL | 711 s. | 23,3 >1:100 | MAT | 20 | <i>hardjo</i> | Collares-Pereira, 1991 |
| | 9543 s. | 15,3 >1:100 | MAT | 18 | Sgpo. Sejroe ⁴ | Rocha, 1998 |
| REINO UNIDO | 47031 s. | 34,4 >1:100 | MAT | 16 | Sgpo. Hebdom ⁵ | Pritchard, 1986 |

Tabla 5 (continuación)
Estudios de prevalencia de la infección por *Leptospira* en el ganado bovino en diferentes países del continente europeo y del resto del mundo

| Región | N.º muestras ¹ | Prevalencia (%) y punto de corte | Técnica | N.º serovares estudiados | Serovares presentes y prevalencia (%) | Referencia bibliográfica |
|------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------------|--------------------------|---------------------------------------|--|
| RESTO DEL MUNDO | | | | | | |
| AUSTRALIA | 1355 s. | 49,1 >:32 | MAT | 12 | <i>hardjo</i> , <i>tarassovi</i> | Milner <i>et al.</i> , 1980 |
| BRASIL | 657 s. | 53,3 | RMT ³ | 14 | <i>hardjo</i> | De Almeida <i>et al.</i> , 1988 |
| CANADÁ | 1300 s. | 15,4 | MAT | 1 | <i>hardjo</i> | Kingscote, 1985 |
| EE.UU. | 5111 s. | 49 >:100 | MAT | 12 | <i>hardjo</i> , <i>pomona</i> | 83 Miller <i>et al.</i> , 1991b 12,5 |
| NIGERIA | 1537 s. | 14,4 >:100 | MAT | 13 | <i>hardjo</i> , <i>pomona</i> | 35,5 Ezeh <i>et al.</i> , 1989 11,7 |
| PANAMÁ | 819 s. | 40,2 | MAT | 17 | <i>hardjo</i> , <i>pyrogenes</i> | 21,9 Rodríguez, 1985 14,3 |

1. Sueros (s).

2. Aglutinación microscópica (*Microagglutination Test*).

3. Aglutinación Microscópica Rápida (*Rapid Microagglutination Test*)

4. El autor considera a *hardjo* en el Sgpo. Sejroe.

5. El autor considera a *hardjo* en el Sgpo. Hebdomadis.

Tabla 6
Seroprevalencia fetal de la infección por *Leptospira*
y tasas de aislamiento en fetos y adultos

| País | Tasa de aislamiento | | Seroprevalencia fetal | Referencia bibliográfica |
|-------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| | Fetal | Resto animales ¹ | | |
| AUSTRALIA | – | 18/218 (8,3 %) | – | Skilbeck <i>et al.</i> , 1988 |
| EE.UU. | – | 13/204 (6,4 %) | – | Thiermann, 1983 |
| REINO UNIDO | – | – | 15/218 (6,9 %) | Ellis <i>et al.</i> , 1978 |
| | 5/245 ² (2,0 %) | – | 17/245 (6,9 %) | Ellis <i>et al.</i> , 1982 |
| | 54/103 ³ (52,5 %) | – | 17/103 (16,5 %) | |
| SUIZA | 0/116 (0 %) | 11/61 j. (18,1 %) | 0/116 (0 %) | Brieger y Brack, 1986 |
| | | 4/98 h. (4,1 %) | | |
| | | 4/41 t. (9,8 %) | | |
| | | | | |

¹ Animales jóvenes (j.); hembras adultas (h.); toros (t.).

² Fetos muestreados al azar.

³ Fetos procedentes de explotaciones con antecedentes de abortos.

Por tanto, las fuentes de infección más frecuentes para el ganado bovino van a ser la orina (van der Hoeden, 1958; Michna, 1970), la leche (van der Hoeden, 1958; Prescott, 1993), las descargas postparto (Timoney *et al.*, 1988; Ellis, 1983) y el agua y pastos contaminados con estos materiales procedentes de animales infectados. Las leptospiras dependen de la existencia de una humedad relativa alta para su supervivencia en el medio ambiente, siendo ésta una condición indispensable para el mantenimiento de la infección por serovares accidentales en una región geográfica determinada (Covalada *et al.*, 1953; van der Hoeden, 1958; Prescott, 1993). A pesar de esto, no todas las aguas son favorables para la supervivencia de las leptospiras, ya que éstas se ven afectadas por el pH y la salinidad (van der Hoeden, 1958).

Factores asociados a la infección

En la infección por leptospiras existen una serie de factores asociados que se deben considerar, siendo éstos tanto factores dependientes del agente etiológico, como factores dependientes del hospedador y del medio en el que se encuentra este hospedador.

Entre los factores dependientes del agente etiológico, el de mayor importancia es el relativo a la resistencia de las leptospiras fuera del hospedador. Las leptospiras son microorganismos bastante sensibles a las condiciones ambientales (van der Hoeden, 1958; Michna, 1970) y los factores que determinan su supervivencia en el medioambiente son: temperatura templada (25 °C), ambiente húmedo, pH neutro o ligeramente alcalino y presencia de materia orgánica (van der Hoeden, 1958; Michna, 1970; Thiermann, 1984; Timoney *et al.*, 1988; Prescott, 1993). Por tanto, las áreas con lagunas, riachuelos y bebederos en general, que congregan a un gran número de animales, son las que más frecuentemente están implicadas en los focos de leptospirosis (Thiermann, 1984; Ellis, 1994). Estos factores van a propiciar la existencia de una cierta estacionalidad en la presentación de la enfermedad, en relación principalmente con la época de lluvias (Sullivan, 1974; Thiermann, 1984; Carrol y Campbell, 1987; Miller *et al.*, 1991a; Prescott, 1993).

En lo que respecta al hospedador, los diferentes autores destacan como factores más importantes la edad, el estado inmunitario y la gestación. La edad de los animales parece estar en relación con el estado de portador renal. Algunos autores sugieren que la mayor incidencia de animales que excretan leptospiras en la orina aparece en terneros y que la mayoría de las vacas mayores de tres años no son leptospirúricas (Hellstrom y Blackmore, 1980-citados por Ellis, 1983). Respecto al estado inmunitario, se puede decir que, en general, el ganado expuesto previamente a la infección es refractario a la reinfección durante años, incluso cuando los niveles de anticuerpos circulantes apenas alcanzan un título de 1:10 (van der Hoeden, 1958; Ellis, 1983). Por último, los datos disponibles nos muestran que el aborto por leptospiras se produce principalmente en los últimos estadios de la gestación, entre los 6 y los 9 meses, preferentemente. Probablemente, la infección se produce varias semanas antes y el aborto tiene lugar 1-6 semanas después de la fase aguda en caso de serovares accidentales y de 4-12 semanas en el caso de *hardjo*, aunque los animales no suelen mostrar síntomas de infección aguda. En infecciones por el serovar *hardjo* se han observado también abortos en otros estadios de la gestación, e incluso presencia de mortalidad embrionaria (Ellis y Michna, 1977; Ellis, 1983).

Respecto a los factores dependientes del medio, cabe destacar principalmente el manejo, que está en función de la aptitud, así como el tipo de alimentación. Los casos de leptospirosis parecen ser más frecuentes y de peor pronóstico en las explotaciones de leche que en las de carne. Esto es debido, principalmente, a que el ganado bovino lechero se explota generalmente en sistemas intensivos o semiintensivos que llevan a un mayor hacinamiento, lo cual favorece la transmisión. Además, las crías suelen separarse de las madres tras el parto, manteniéndose aisladas del rebaño y no introduciéndolas en el núcleo principal del mismo hasta su primera gestación. Esto supone la introducción constante de animales no expuestos, totalmente receptivos a la infección y que pueden infectarse en los momentos de mayor riesgo, haciendo que las tasas de infección más altas se produzcan entre los 2-3 años de edad (Ellis y Michna, 1976 a,b; Ellis, 1983; Leonard *et al.*, 1993).

La alimentación parece ser, también, un factor importante en relación con la eliminación de leptospiras en la orina. Leonard *et al.* (1992, 1993) demostraron que, en los animales alimentados con suplementos como los ensilados de grano, se producía una bajada del pH de la orina, cuyo efecto inmediato parecía ser la disminución del número de leptospiras viables eliminadas en este fluido.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de los casos de leptospirosis puede ser complicado, debido principalmente a las características intrínsecas de las leptospiras y a la epidemiología de la enfermedad (Ellis, 1994). En la actualidad, se cuenta con un gran número de técnicas laboratoriales diferentes, pero previamente a la realización de las mismas, es conveniente recabar información sobre una serie de datos que nos pueden orientar en el diagnóstico.

Diagnóstico epidemiológico

La anamnesis debe incluir datos sobre la época del año en la que apareció el brote, la aptitud del rebaño, el estado sanitario del mismo, el contacto con otras especies domésticas, la sintomatología predominante y si se realiza vacunación frente a la leptospirosis. Asimismo, deberá obtenerse información sobre el número de animales afectados, la edad de los mismos y la fase de la gestación en que se produce el aborto.

Diagnóstico clínico

La mayoría de las infecciones por *Leptospira* spp. cursan de manera subclínica, aunque en algunas ocasiones, pueden darse casos de enfermedad grave. La sintomatología es inespecífica y común a un gran número de afecciones, observándose ictericia, hemoglobinuria, hematuria, evidencias de daño renal, meningitis e incluso mortalidad (Ellis, 1994). Las hembras preñadas pueden abortar debido a la pirexia mantenida (Michna, 1970) y la producción láctea prácticamente desaparece. Esta forma sobreaguda se debe a la infección por serovares no adaptados, principalmente *grippityphosa*, *pomona*, *icterohaemorrhagiae* y *autumnalis*, por lo que no aparecen estados de portador crónico (Prescott, 1993; Ellis, 1994).

En los adultos, se debe sospechar de leptospirosis aguda siempre que aparezcan animales con disminución repentina y marcada de la producción láctea («síndrome de la caída de la leche»), fiebre (que no siempre se detecta), ictericia y meningitis (Ellis, 1986). La leche, que parece calostro, puede contener coágulos de sangre y el recuento de células blancas es muy alto. Las ubres aparecen normales o algo blandas al tacto y los cuatro cuarterones están afectados (Michna, 1970; Ellis, 1993). Por el contrario, sospecharemos de leptospirosis crónica en casos de fallos reproductivos (mantenidos o no en el rebaño), tales como infertilidad (abortos, mortinatos, nacimiento de animales débiles), nacimiento de terneros prematuros, retención de placenta, e incluso esterilidad, en casos extremos (Michna, 1970).

Las lesiones no son patognomónicas, siendo de escasa utilidad para el diagnóstico de la enfermedad (Baskerville, 1986). En los animales adultos, las lesiones se localizan principalmente en los riñones, siendo éste uno de los órganos más afectados. También, podremos encontrar lesiones en el hígado, útero, placenta y, en algunos casos, en pulmones y bazo. En todos los órganos, las características de las lesiones van a depender del serovar implicado (Pérez *et al.*, 1982; Thiermann, 1982; Skilbeck *et al.*, 1988). En el feto, las lesiones son realmente difíciles de interpretar pues pueden confundirse con los procesos normales de autólisis (Sullivan 1974; Ellis, 1994).

Diagnóstico laboratorial

Las técnicas utilizadas para el diagnóstico laboratorial de la leptospirosis se pueden dividir en dos grandes grupos: técnicas indirectas, basadas en la detección de anticuerpos frente a las leptospiras, y técnicas directas que se basan en la detección de leptospiras o sus antígenos y/o ácidos nucleicos en los tejidos y/o fluidos corporales. En el caso de muestras procedentes de fetos, las técnicas directas están más indicadas que las indirectas, ya que el diagnóstico individual cobra mayor importancia. En el caso de muestras de animales adultos, las técnicas indirectas se utilizan más frecuentemente, pues son más sencillas de realizar y su coste es menor (Ellis, 1986).

La demostración de la presencia de leptospiras o sus componentes en la sangre, tejidos y/o leche de animales con signos clínicos, tiene un gran valor diagnóstico (Ellis, 1996). En el caso de animales muertos o sacrificados, las muestras que se deben enviar son cerebro, médula espinal, líquido cefalorraquídeo y ojo en casos con sintomatología nerviosa, y la mayoría de los órganos parenquimatosos en los casos que cursan con ictericia (Ellis, 1986). En animales vivos, se enviará sangre y leche en la fase aguda de la enfermedad y orina en la fase crónica. En los fetos, los órganos de elección son el hígado, riñón, cerebro, glándula adrenal y pulmón, así como cualquier fluido interno (Ellis, 1996).

Sin teñir, estos microorganismos son prácticamente invisibles utilizando la microscopía habitual, pero son visibles al microscopio de campo oscuro y de contraste de fases (Johnson y Faine, 1984; Baskerville, 1986). También, se pueden poner de manifiesto utilizando métodos de tinción especiales, como el Giemsa y técnicas de tinción argéntica (Amatredjo y Campbell, 1975; Faine, 1982; Faine y Stallman, 1982). Presentan una forma helicoidal, miden de seis a 20 μ m de longitud y 0,1 μ m de diámetro y son capaces de atravesar filtros de 0,22 μ m (Dikken y Kmety, 1978). Sin embargo, la baja sensibilidad y especificidad de estas técnicas de visualización directa hace que sean de poca utilidad en comparación con las técnicas de detección y análisis de ácidos nucleicos, las técnicas de tinción inmunológica u otras como el aislamiento (Ellis, 1986).

Dentro de las técnicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos, las más utilizadas han sido las técnicas de hibridación con sondas de ADN marcadas y las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), actualmente la técnica más eficaz para la detección de leptospiras en la orina (Millar *et al.*, 1987; Bolin *et al.*, 1989b; van Eys *et al.*, 1989). La técnica de tinción inmunológica más utilizada es, sin duda, la inmunofluorescencia, útil para la detección de leptospiras en la orina (Baskerville, 1986; Bolin *et al.*, 1989b), pero principalmente para su detección en tejidos fetales, ya que el aislamiento a partir de los mismos es difícil debido a que por los procesos de autólisis las leptospiras pierden su viabilidad. El aislamiento es, para muchos autores, la técnica más sensible para el diagnóstico de la leptospirosis aguda y crónica, tanto en medio de cultivo, como por inoculación en animales de experimentación. Su mayor desventaja es que requiere mucho tiempo y laboratorios especializados (Thiermann, 1983; Thiermann, 1984; Ellis, 1986; Timoney *et al.*, 1988; Ellis, 1996).

Las técnicas serológicas son las pruebas laboratoriales más utilizadas tanto para el diagnóstico como para la realización de estudios epidemiológicos. Su mayor desventaja es que los niveles de anticuerpos, aunque pueden mantenerse durante años, alcanzan niveles indetectables, incluso en el momento del aborto, puesto que éste suele producirse tiempo después de la infección. Además, en el caso de infección por serovares adaptados (como es el caso del serovar *hardjo*), el animal puede no presentar respuesta de anticuerpos detectable (Ellis, 1996).

La técnica más utilizada es la aglutinación microscópica o MAT (*Microagglutination Test*) (Thiermann, 1984), siendo además, la prueba oficial para la exportación e importación de animales (O.I.E., 1992). Entre sus principales desventajas tenemos que no diferencia entre anticuerpos vacunales y de infección y que utiliza como antígeno leptospiras vivas, siendo tedioso el mantenimiento de las cepas y un riesgo potencial para el personal del laboratorio. Para obtener una sensibilidad adecuada, se deben utilizar como antígenos cepas representativas de todos los serogrupos presentes en el país o región y de todos los serovares adaptados a la especie objeto de estudio (Ellis, 1986). Al igual que con otras pruebas serológicas, la observación de un aumento del título en dos muestras de suero, tomadas con un intervalo de 3-4 semanas, sería indicativo de una infección aguda (Ellis, 1996). Sin embargo, esta seroconversión generalmente no se detecta debido a que los síntomas de la fase aguda pasan desapercibidos. En el caso de abortos, el estudio de sueros pareados no es útil porque, tras el aborto, no se produce un aumento en el nivel de anticuerpos (Ellis, 1986). A pesar de la posibilidad de realizar estudios en animales individuales, el MAT se considera principalmente una prueba de rebaño, ya que la obtención de títulos individuales frente a las leptospiras es en muchos casos poco significativo y de difícil interpretación (Ellis, 1996). Como en otras pruebas serológicas, una de las dificultades en la interpretación de los resultados del MAT, reside en la determinación del punto de corte. El más recomendado por los autores es 1:100, pero no siempre resulta adecuado, en especial cuando consideramos serovares adaptados como *hardjo*, en los que la respuesta inmune puede no ser detectable (Ellis, 1986; Timoney *et al.*, 1988).

El MAT se utiliza también para la serología fetal, considerándose un resultado significativo, la obtención de títulos frente a cualquier serovar mayores o iguales a 1:40. Desafortunadamente, el número de fetos que presenta una reacción inmune humoral detectable, es bajo (Barr y Anderson, 1993).

Además del MAT, se pueden encontrar otras técnicas serológicas como la fijación del complemento (Smith *et al.*, 1994), la aglutinación macroscópica, prácticamente abandonada (Ellis, 1986), o el ELISA. El ELISA se utiliza tanto para la detección de anticuerpos en leche como en suero, permitiendo, además, diferenciar entre IgG e IgM (Thiermann, 1983; Smith *et al.*, 1994). Además, presenta otras ventajas frente al MAT, como es el hecho de no presentar riesgo sanitario para los operarios, ser de fácil estandarización y ser una prueba en la que las reacciones cruzadas son poco frecuentes. Sus principales desventajas son que normalmente son serovar específicos, con lo cual no obtendremos información acerca de una posible infección por otros serovares, y que no permite diferenciar entre anticuerpos vacunales y de infección. A pesar de ser eficaz y de estar considerada en la actualidad como la prueba serológica más sensible, aún no está admitida como prueba oficial (Thiermann, 1983; Thiermann y Garret, 1983).

Diagnóstico diferencial

La leptospirosis debe diferenciarse de cualquier enfermedad del ganado bovino que curse con hemoglobinuria, aborto y disminución de la producción láctea con aparición de mamitis. La forma hemolítica de la leptospirosis puede confundirse con otros procesos que cursen con hemólisis, hematuria, hemoglobinuria y daño hepatorrenal, tales como envenenamiento por especies del género *Brassica* (ej. nabo -*B. napus*-), babesiosis, hemoglobinuria postparto e infecciones por clostridios (Baskerville, 1986). La presencia de ma-

mitis puede detectarse por las características de la leche y la ubre. El aborto por leptospiras tan sólo podrá diferenciarse del producido por otras causas mediante pruebas laboratoriales.

CONTROL

Tratamiento

Las leptospiras son prácticamente sensibles a todos los antimicrobianos, a excepción de las sulfonamidas y el cloranfenicol (van der Hoeden, 1958), pudiendo utilizarse una amplia gama de ellos para el tratamiento de la infección.

Sin embargo, la mayor limitación de los antimicrobianos es que no eliminan el estado de portador renal. Los antimicrobianos más utilizados son la dihidroestreptomicina a dosis de 25 mg/kg (Amatredjo y Campbell, 1975; Michna, 1970; Ellis *et al.*, 1985; Ellis, 1994) y la oxitetraciclina o clortetraciclina a dosis de 800 g/Tm de pienso. Aunque el tratamiento con dihidroestreptomicina reduce en gran medida el número de organismos que el animal infectado elimina en la orina, éste puede infectarse de nuevo (Ellis 1994). Además, algunos autores lo consideran inútil para frenar las tormentas de abortos que puedan producirse como consecuencia de la infección por el serovar *hardjo* (Ellis, 1983). Por ello, la mayoría de los autores lo consideran únicamente como una parte del programa general del control del rebaño, junto a la vacunación y la profilaxis higiénico-sanitaria (Michna, 1970; Thiermann, 1984)

Profilaxis

La vacunación es una práctica muy extendida en otros países (Thiermann, 1984) siendo, para algunos autores, la mejor herramienta de control (Ellis, 1994).

Sin embargo, presenta una serie de desventajas: en primer lugar, las vacunas comerciales son bacterinas (Ellis, 1996) y no proporcionan protección cruzada entre serovares distintos y sólo permiten una protección limitada frente a cepas distintas de un mismo serovar. Los serovares y las cepas varían entre países, por lo que la protección ofrecida por las vacunas elaboradas con las cepas de otro país o región, en otras zonas puede ser poco eficaz (Thiermann, 1984). En segundo lugar, diversos estudios sobre las vacunas existentes han demostrado que la vacunación frente a *hardjo* con vacunas tanto monovalentes como pentavalentes, no evitan la infección, la migración al útero y oviducto ni la persistencia de la infección renal y por consiguiente, tampoco evitan la eliminación de leptospiras en la orina ni el nacimiento de algunos terneros débiles y mortinatos (Bolin *et al.*, 1989a; Bolin *et al.*, 1991). A pesar de estas limitaciones, la vacunación sigue siendo parte importante de los sistemas de control en los rebaños (Heath y Johnson, 1994). El trabajo realizado por Little *et al.* (1992) demostró que con un programa de vacunación de todo un rebaño durante cinco años, es posible el control de las infecciones por *hardjo* y su eliminación del rebaño.

La profilaxis higiénico-sanitaria es esencial en el control de la leptospirosis en un rebaño, pero siempre ha de formar parte de un sistema general de control, junto con la vacu-

nación y el tratamiento, ya que ninguna de estas medidas es eficaz por separado (Ellis, 1994). Las medidas higiénico-sanitarias deben basarse en dos puntos esenciales: el control de hospedadores de mantenimiento silvestres y el control de hospedadores domésticos. En la Tabla 7 se resumen las principales medidas recomendadas por los diferentes autores (van der Hoeden, 1958; Faine, 1982; Ellis, 1994; Heath y Johnson, 1994).

Tabla 7
Medidas de profilaxis higiénico-sanitaria

| Medida | Control sobre... |
|--|---|
| Desratización general de la explotación y construcción de edificios «a prueba de roedores» | Hospedadores silvestres asociados a la actividad humana (ratas y ratones) |
| Evitar el uso de fuentes de agua comunales | Hospedadores silvestres y domésticos |
| Reducir el pastoreo conjunto con otras especies domésticas y con otros rebaños de ganado bovino | Hospedadores de <i>hardjo</i> (bovinos y ovinos), de <i>bratislava</i> (porcinos y caballos) y <i>pomona</i> (porcinos) |
| Mantener una política de ciclo cerrado y en su defecto, someter a cuarentena estricta a los animales de reposición que entran nuevos en la explotación | Entrada de leptospirosis en la explotación a través de bovinos infectados subclínicamente |
| No separar las crías de la hembra | Entrada constante de animales susceptibles |
| Evitar el uso del toro para la monta | Posible transmisión venérea |

Los centros dedicados a la inseminación artificial (IA) deberían realizar un control de la leptospirosis en los sementales (Eaglesome y García, 1992), a pesar de que, en nuestro país, no están obligados por la legislación vigente (BOE, 1995). Habitualmente, no se autoriza la entrada de sementales en estos centros con títulos superiores a 1:100 en la prueba de MAT. Sin embargo, una elevada proporción de toros infectados por el serovar *hardjo* de cuyo aparato reproductor se ha aislado el germen, presentarían niveles de anticuerpos por debajo del título mencionado y por lo tanto dicha medida carecería de eficacia en muchos casos (Ellis *et al.*, 1986a). La adición de antibióticos, como la penicilina y la estreptomycinina, en el momento de preparación de las dosis seminales ha demostrado ser útil para el control de la capacidad infectante de las leptospiras presentes en el semen, por lo que actualmente supone la medida más eficaz de prevención de la transmisión a través de la IA (Sleight, 1965; Eaglesome y García, 1992).

Policía sanitaria

La leptospirosis está incluida dentro de la «lista B» de la Oficina Internacional de Epizootías (O.I.E.), estando por ello obligados los países miembros a realizar un informe

anual sobre el estado de estas enfermedades en sus países respectivos (art. 1.2.0.3) pudiéndose solicitar, en algunos casos, informes más frecuentes (O.I.E., 1992).

En el artículo 3.1.4.1 del Código Zoosanitario Internacional, se hace referencia a las medidas exigibles por los países importadores en el caso de comercio internacional de ganado bovino. Estas medidas consisten, principalmente, en un certificado zoosanitario internacional, en el que conste que los animales:

- 1) No presentaban el día del embarque ningún signo clínico de leptospirosis.
- 2) Permanecieron, durante los 90 días previos al embarque en una explotación desde la que no hubo informe oficial de signos clínicos de leptospirosis.
- 3) Recibieron dos inyecciones con 25 mg de dihidroestreptomicina por kg. de peso vivo; la primera catorce días antes del embarque y la segunda el mismo día del embarque.
- 4) Fueron sometidos a una prueba de diagnóstico con resultado negativo (sólo si el país importador lo solicitó).

La prueba diagnóstica será el MAT y los animales deberán mostrar un título menor de 1:100 en aquellos serovares determinados por ambas partes (O.I.E., 1992). Este criterio no siempre es adecuado, ya que, en el caso de infecciones por serovares adaptados, puede haber más de una tercera parte de los animales infectados cuya respuesta serológica sea inferior a dicho título, así como portadores crónicos con título por debajo de 1:100, que continúan eliminando leptospiras en orina (Ellis, 1986; Prescott, 1993).

SUMMARY

Epidemiology, diagnosis and control of bovine leptospirosis

Leptospirosis, from an epidemiological point of view, is viewed as a complex disease. Infection is induced by spirochetes from the genus *Leptospira*. In cattle infected with leptospirosis, many different clinical signs may be exhibited, ranging from an acute/hyper-acute condition where the animals exhibit fever, hematuria, hemoglobinuria, meningitis and even mortality, to a chronic condition where the only symptomatology observed among the animals is reproductive failure. Nonetheless, diagnosis of the disease is not easy in spite of the wide range of laboratory techniques currently available. Because of the possible sanitary hazards associated with leptospirosis and the fact that leptospirosis is a zoonosis, control of the disease deserves special attention. Complementary approaches, such as antibiotic treatment, vaccination and hygienic prophylaxis, may be necessary to avoid the economic losses caused by the introduction of the disease on a farm.

KEY WORDS: *Leptospira*
Cattle
Epidemiology
Diagnosis
Control

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADÚRIZ G., ATXAERANDIO R., MORENO B., 1999. Diagnóstico de abortos en ganado vacuno lechero: aspectos prácticos. *Albétar* 26, 4-5.
- ALONSO ANDICOBERRY C., GARCÍA PEÑA F.J., PEREIRA BUENO J., COSTAS E., ORTEGA MORA L.M., 2001. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. *Prev. Vet. Med.* 52, 109-117.

- AMATREDJO A., CAMPBELL R.S.F., 1975. Bovine leptospirosis. *Vet Bull* 43, 875-891.
- ATXAERANDIO R., GONZÁLEZ L., JUSTE R.A., GARCÍA F.A., ADÚRIZ G., 1998. Diagnóstico laboratorial de abortos en ganado vacuno: protocolo y casuística en Azti-Sima. V Congreso de Medicina Bovina. Sitges, 29 abril-3 mayo, pp. 221-223.
- BARR B.C., ANDERSON M.L., 1993. Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. *Vet. clin. North. Am., Food anim. pract.* 9, 343-368.
- BASKERVILLE A., 1986. Histological aspects of diagnosis of leptospirosis. In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) Present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, pp. 33-43.
- BERCOVICH Z., 1986. The prevalence of antibodies to members of *Leptospira interrogans* in cattle and pigs in the Netherlands. In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) The present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, pp.185-191.
- BOLIN C.A., CASSELLS J.A., PHIL B., ZUERNER R.L., TRUEBA G., 1991. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type hardjo-bovis vaccine on type hardjo-bovis infection of cattle. *Am. J. Vet. Res* 52, 1639-1643.
- BOLIN C.A., THIERMANN A.B., HADNSAKER A.L., FOLEY J.W., 1989a. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type hardjo-bovis infection in pregnant cattle. *Am. J. Vet. Res* 50, 161-165.
- BOLIN C.A., ZUERNER R.L., TRUEBA G., 1989b. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type hardjo-bovis in bovine urine. *Am.J. Vet. Res* 50, 1001-1003.
- BRIEGER C, BRACK A., 1986. *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in cattle prevalence and importance as an abortion agent in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierh.Kd.* 128, 43-44.
- CANALE-PAROLA E., 1984. Order I. Spirochaetales Buchanan 1917, 163^{al}. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol I. Krieg N.R. y Holt J.G. (Eds.) Williams & Wilkins, Ed. Baltimore, USA. pp. 38-39.
- CARROL A.G., CAMPBELL R.S.F., 1987. Reproductive and leptospiral studies on beef cattle in central Queensland. *Aus. Vet. J.* 64, 1-5.
- COLLARES-PEREIRA M., 1991. Bovine leptospirosis in cattle in Portugal: bacteriological and serological findings. *Vet. Rec.* 128, 549-550.
- COUSINS D.V., ELLIS T.M., PARKINSON J., McGLASHAN C.H., 1989. Evidence for sheep as a maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Vet. Rec.* 124, 123-124.
- COVALEDA J, PUMAROLA A., 1956. Encuesta serológica en el ganado equino y bovino sacrificado en los mataderos municipales de Barcelona y Badalona. Existencia de aglutininas frente a diversas especies de leptospirosas. (1956). *Rev. Iber. Parasitol.* XVI, 315-318.
- COVALEDA J., PUMAROLA A., CANTARELL I., 1953. Leptospirosis por *L. ballum* en los trabajadores de arrozal de la región de Camarales (Delta del Ebro). *Rev. Iber. Parasitol.* XIII, 289-299.
- DE ALMEIDA S.C., MOREIRA E.C., GOMES A.G., VALE C., 1988. Infecção por *Leptospira interrogans*, numa fazenda de Minas Gerais, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 40, 137-144.
- DESMECHT M., 1986. Importance of leptospirosis in Belgium, In: Ellis W.A. y Little T.W.A. (Eds.) The Present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, pp. 197-203.
- DIKKEN H., KMETY E., 1978. Serological typing methods of leptospire. *Methods in Microbiology* 11, 259-307.
- EAGLESOME M.D., GARCÍA M.M., 1992. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter foetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Bull.* 62, 743-775.
- EGAN J., 1986. *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in the Republic of Ireland, In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) Present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, pp. 211.
- ELLIS W.A., 1983. Recent developments in bovine leptospirosis. *Vet. Annu.*, 23, 91-95.
- ELLIS W.A., 1986. The diagnosis of leptospirosis in farm animals, In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) Present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, pp.13-31.
- ELLIS W.A., 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. clin. North. Am., Food anim. pract.* 10, 463-478.
- ELLIS W.A., 1996. Leptospirosis. O.I.E. Manual: Amedment I, 1-8.
- ELLIS W.A., CASSELLS J.A., DOYLE J., 1986a. Genital leptospirosis in bulls. *Vet. Rec.* 118, 333.
- ELLIS W.A., MICHNA S.W., 1976a. Bovine leptospirosis: demonstration of leptospire of the Hebdomadis serogroup in aborted fetuses and a premature calf. *Vet. Rec.*, 99, 430-432.
- ELLIS W.A., MICHNA S.W., 1976b. Bovine leptospirosis: a serological and clinical study. *Vet. Rec.*, 99, 387-391.
- ELLIS W.A., MICHNA S.W., 1977. Bovine leptospirosis: experimental infection of pregnant heifers with strain belonging to the Hebdomadis serogroup. *Res. Vet. Sci.* 22, 229-236.

- ELLIS W.A., LOGAN E.F., O'BRIEN J.J., NEILL S.D., FERGUSON H.W., HANNA J., 1978. Antibodies to leptospira in the sera of aborted fetuses. *Vet. Rec.* 103, 237-239.
- ELLIS W.A., MONTGOMERY J., CASSELLS J.A., 1985. Dihydrostreptomycin treatment of bovine carriers of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Res. Vet. Sci.* 39, 292-295.
- ELLIS W.A., O'BRIEN J.J., CASSELLS J., 1981. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype *hardjo* infection in North Ireland. *Vet. Rec.* 108, 555-557.
- ELLIS W.A., O'BRIEN J.J., NEILL S.D., HANNA J., 1982a. Bovine leptospirosis: serological findings in aborting cows. *Vet. Rec.* 110, 178-180.
- ELLIS W.A., SONGER J.G., MONTGOMERY J., CASSELLS J.A., 1986b. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. *Vet. Rec.* 118, 11-13.
- ESPÍ A., PRIETO J.M., FERNÁNDEZ M. ÁLVAREZ M., 2000. Serological prevalence to six leptospiral serovars in cattle in Asturias (Northern Spain). *Epidemiol. Infect.* 124, 599-602.
- EZEH A.O., ADDO P.B., ADESIYUN A.A., BELLO C.S.S., MAKINDE A.A., 1989. Serological prevalence of bovine leptospirosis in Plateau State, Nigeria. *Revue Élev Méd vét Pays trop* 42, 505-508.
- FAINE S., 1982. Guideliness for the control of leptospirosis. Faine S. (Ed.). WHO Offset Publication, 67. World Health Organization, Geneva.
- FAINE S., 1991. The genus *Leptospira*, In: Barlows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K-H. (Eds.) *The prokariotes*. Springer-Verlag, 2nd edition. pp. 3568-3582.
- FAINE S., STALLMAN N.D., 1982. Amended descriptions of the Genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 461-463.
- GAUMONT R., TRAP D., 1986. Leptospirosis in domestic animals in France: current situation, In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) *Present state of leptospirosis diagnosis and control*. Martinus Nijhoff Publishers, pp. 179-184.
- GERRITSEN M.J., KOOPMANS M.J., PATERSE D., OLYHOEK T., 1994. Sheep as maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* subtype Hardjobovis. *Am. J. Vet. Res.*, 55, 1232-1237.
- GUITIÁN J., GARCÍA F.J., SUÁREZ P., OLIVEIRA J., YUS E., 1998. Prevalencia de vacas seropositivas frente a diferentes serovares de *Leptospira interrogans* en explotaciones lecheras de Galicia con baja eficacia reproductiva. V Congreso de Medicina Bovina, Sitges, 29 abril-3 mayo, pp. 235-236.
- HARTSKEERT R.A., TERPSTRA W.J., 1996. Leptospirosis in wild animals. Supplement 3 of *Vet. Q.* 18/S3, S159-S160.
- HEATH S.E., JOHNSON R., 1994. Leptospirosis. *JAVMA* 205, 1518-1523.
- HOLT J.G., KRIEG N.R., SNEATH P.H.A., STALEY J.T., WILLIAMS S.T. (Eds.), 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins, Ed., Baltimore, USA. 9.^a edición. pp. 27-37.
- JONSHON R.C., FAINE S., 1984. Family II. *Leptospiraceae* Pillot 1965, 79th. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol I. Krieg N.R. y Holt J.G. (Eds.) Williams & Wilkins, Ed. Baltimore, USA. pp. 39-66.
- KINGSCOTE B., 1985. *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in cattle in the South Okanagan District of British Columbia. *Can. Vet. J.* 26, 328-332.
- KMETY E., DIKKEN H., 1988. Revised list of *Leptospira* serovars. Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*. University Press, Groningen.
- KMETY E., DIKKEN H., 1993. Classification of the species of *Leptospira interrogans* and history of its serovars. University Press Groningen. Groningen, Neatherlands.
- LEÓN VIZCAÍNO L., MIRANDA GARCÍA A., 1976. Investigación epidemiológica sobre leptospirosis en Cádiz. Suplemento Científico del Boletín Informativo del Consejo General de Colegios Veterinarios de España 204-205, 15-32.
- LEÓN VIZCAÍNO L., MIRANDA GARCÍA A., GARCÍA PÉREZ M., 1977. Nuevos focos de leptospirosis bovina y porcina en Córdoba. Suplemento Científico del Boletín Informativo del Consejo General de Colegios Veterinarios de España 207-208, 73-84.
- LEÓN VIZCAÍNO L., MIRANDA GARCÍA A., PEREA A., CARRANZA J., 1978. Estudio epizootológico, mediante encuesta serológica, de la leptospirosis en la provincia de Sevilla. *Archivos de zootecnia* 27, 1-9.
- LEONARD F., QUINN P.J., ELLIS W.A., 1992. Possible effect of pH on the survival of leptospirines in cattle urine. *Vet. Rec.* 131, 53-54.
- LEONARD F.C., QUINN P.J., ELLIS W.A., 1993. Association between cessation of leptospiruria in cattle and urinary antibody levels. *Res. Vet. Sci.* 55, 195-202.
- LITTLE T.W.A., 1986. Changes in our understanding of the epidemiology of leptospirosis. In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) *Present state of leptospirosis diagnosis and control*. Martinus Nijhoff Publishers, pp. 149-173.

- LITTLE T.W.A., HATHAWAY S.C., BROUGHTON E.S., SEAWRIGHT D., 1992. Control of *Leptospira hardjo* infection in beef cattle by whole herd vaccination. Vet. Rec. 131, 90-92.
- MICHNA S.W., 1970. Leptospirosis. Vet. Rec. 86, 484-496
- MILLAR B.D., CHAPPEL R.J., ADLER B., 1987. Detection of leptospires in biological fluids using DNA hybridisation. Vet. Microbiol. 15, 71-78.
- MILLER D.A., WILSON M.A., BERAN G.W., 1991a. Relationships between prevalence of *Leptospira interrogans* in cattle, and regional, climatic and seasonal factors. Am. J. Vet. Res 52, 1766-1768.
- MILLER D.A., WILSON M.A., BERAN G.W., 1991b. Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. Am. J. Vet. Res 52, 1761-1765.
- MILNER A.R., WILKS C.R., CALVERT K., 1980. The prevalence of antibodies to members of *Leptospira interrogans* in cattle. Aus. Vet. J. 56, 327-330.
- O.I.E., 1992. International Animal Health Code (mammals, birds and bees). O.I.E., Paris.
- PÉREZ Q., DORADO E., BORRALLO J., 1982. Estudio de un foco de leptospirosis bovina en España. 10.^a Conferencia de la Comisión Regional de la O.I.E. para Europa. O.I.E., Londres. pp. 59-67.
- PRESCOTT J.F., 1993. Leptospirosis. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N. (Eds.) Pathology of domestic animals. Academic Press, Inc, 4th edition. pp. 503-511.
- PRITCHARD D.G., 1986. National situation of leptospirosis in the United Kingdom, In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) Present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, pp. 221-233.
- PUMAROLA A., 1995. Leptospira. En: Microbiología y Parasitología Médica. Pumarola A., Rodríguez A., García A., y Piédrola G. (Eds.). Ed. Masson Salvat Medicina. 2.^a edición. pp. 554-550.
- ROCHA T., 1998. A review of leptospirosis in farm animals in Portugal. Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz. 17, 699-712.
- RODRIGUES E., 1986. Infección leptospírica en la República de Panamá, I. Frecuencia de aglutininas anti-*leptospira* sp. en el rebaño bovino de razas lecheras. II. Frecuencia de las aglutininas anti-*leptospira* sp. en Grupos Ocupacionales. III. Frecuencia de las aglutininas anti-*leptospira* sp. en Bancos de sangre y Laboratorios de análisis. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 38, 604-607.
- SALT G.F.H., LITTLE T.W.A., 1977. Leptospires isolated from wild mammals caught in the south west of England. Res. Vet. Sci. 22, 126-127.
- SCHONBERG A., BREM S., STAAK C., KAMPE U., 1986. Leptospirosis in the Federal Republic of Germany. Preliminary results of a 1984 animal investigation program. In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) Present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, pp.205-209.
- SKILBECK N.W., FORSYTH W.M., DOHNT M., 1988. Bovine leptospirosis: microbiological and histological findings in cattle at slaughter. Aus. Vet. J. 65, 73-75.
- SLEIGHT S.D., 1965. The role of penicillin and streptomycin in the prevention of transmission of bovine leptospirosis by artificial insemination. Am. J. Vet. Res. 26, 365-368.
- SMITH C.R., KETTERER P.J., MCGOWAN M.R., CORNEY B.G., 1994. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in cattle. Aus. Vet. J. 71, 290-294.
- SONGER J.G., THIERMANN A.B., 1988. Leptospirosis. JAVMA 193, 1250-1254.
- SULLIVAN N.D., 1974. Leptospirosis in animals and man. Aus.Vet.J. 50, 216-223.
- THIERMANN A.B., 1982. Experimental leptospiral infection in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. Am. J. Vet. Res. 43, 780-784.
- THIERMANN A.B., 1983. Bovine leptospirosis: bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. Am. J. Vet. Res 44, 2244-2245.
- THIERMANN A.B., 1984. Leptospirosis: current developments and trends. JAVMA 184, 722-725.
- THIERMANN A.B., GARRET L.A., 1983. Enzyme-linked immunoabsorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars *hardjo* and *pomona* in cattle. Am. J. Vet. Res. 44, 884-887.
- TIMONEY J.F., GILLESPIE J.H., SCOTT F.W., BARLOUGH J.E., 1988. The Spirochetes, In: Hagan & Bruner's Microbiology and infectious diseases of domestic animals. Comstock Publishing Associates, Ithaca, USA, 8th edition, pp. 45-57.
- TRAP D., 1988. Les petits mammifères sauvages, source de leptospire. Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz. 7, 885-892.
- VAN DER HOEDEN J. (1958). Epizootiology of Leptospirosis. Adv. Vet. Sci. 4, 278-339.
- VAN EYS G.J.J.M., GRAVEKAMP C., GERRITSEN M.J., QUINT W., CORNELISSEN M.T.E., TER SCHEGGET J., TERPSTRA W.J., 1989. Detection of leptospires in urine by polimerasa chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27, 2258-2262.
- WHO, 1965. Bull. W.H.O 32, 881-891.