
VALORACIÓN DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS TIPO IgM e IgG FRENTE A *Leptospira* EN BOVINOS

Héctor Jaime Aricapa¹
Jorge Enrique Pérez²
Ingrid Carola Cabrera³
Katherine Rivera³

RESUMEN

Por medio del uso de los métodos de microaglutinación lisis (MAT) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI), se determinó la presencia de anticuerpos tipo IgM e IgG en 101 sueros de bovinos remitidos al Centro de Diagnóstico regional del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), seccional Caldas. En los resultados obtenidos se encontró que el 68,3% de los sueros fueron positivos para MAT y 84,2% fueron positivos por IFI frente a diferentes serovares de *Leptospira interrogans*; por ambos métodos el serovar frente al que hubo mayor frecuencia de anticuerpos fue *L. icterohaemorrhagiae*. Al relacionar los resultados obtenidos mediante ambas pruebas se encontró una baja frecuencia de animales con IgM (8%) y una alta frecuencia de animales con títulos de IgM e IgG (60%) frente a diferentes serovares de *Leptospira*; estos últimos, se consideró que eran animales reinfectados, mientras que los primeros se consideraron casos nuevos de la enfermedad. El 76% de los sueros probados por IFI presentaron títulos para dos o más serovares; 46 fueron positivos para uno o más serovares con títulos altos (igual o mayor de 1:512) y a la vez fueron positivos para uno o más serovares en títulos bajos (igual o menor de 1:256); este hallazgo puede ser una evidencia de reacción cruzada de anticuerpos frente a los diferentes serovares de *Leptospira*.

Palabras clave: *Leptospira*, bovino, anticuerpos, estudios seroepidemiológicos

VALORATION OF IgM AND IgG ANTIBODIES RESPONSE AGAINST *Leptospira* IN BOVINES

ABSTRACT

This study determined, by means of the use of the microagglutination lysis (MAT) and Indirect Immunofluorescence (IFI) methods, the presence of IgM and IgG in 101 samples of bovine serum sent to the diagnostic regional Center of the Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (Colombian Livestock and Agricultural Institute), sectional Caldas-Colombia. The findings obtained showed that 68.3% of the serum samples were positive for the MAT method, and 84.2% was positive for the IFI method against different serovars of *Leptospira interrogans*. For both methods the serovar with the highest antibody frequency was *L. icterohaemorrhagiae*. Relating the results obtained by both methods, a low frequency for IgM was found, only (8%), and a high frequency for IgM and IgG (60%), regarding different *Leptospira* serovars. These serovars were classified as reinfecting animals, while the first animals were classified as new cases of the disease. 76% of the

¹ MVZ Esp. Microbiología. Profesor asistente U. Caldas.

² Bacteriólogo Msc. Profesor asociado U. Caldas.

³ Estudiante de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U. Caldas.

serum samples tested by IFI presented titles for two or more serovars, while 46 were positive for one or more serovars in low titles (1:512 or higher), simultaneously they were positive for one or more serovars in low titles (1:256 or less). This finding can be evidence of cross-reactions

of antibodies regarding different serovars of *Leptospira*.

Key words: *Leptospira*, bovines, antibodies, seroepidemiologic studies.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad causada por una espiroqueta del género *Leptospira* en la cual sólo hay una especie, *Leptospira interrogans*, que de acuerdo con sus propiedades aglutinantes se divide en más de 20 serogrupos, dentro de los cuales se incluyen a por lo menos 20 serovariedades capaces de producir enfermedad en los mamíferos, tanto domésticos como silvestres, y también pueden afectar al hombre (1,21); siete de estos serotipos patógenos son de alta frecuencia en Colombia: *L. grippothyposa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. hardjo bovis*, *L. bratislava* y *L. pomona* (2).

La leptospirosis se caracteriza desde el punto de vista clínico por causar septicemia, nefritis intersticial, anemia hemolítica con hemoglobinuria, aborto en el último tercio de la gestación en la mayoría de las especies o la presentación de abortos simultáneos en el hato; también, produce mastitis en bovinos, que se caracteriza por disminución en la producción de leche, que puede ser amarillenta y con coágulos sanguíneos (3).

Afecta todas las explotaciones pecuarias, provocando pérdidas millonarias en dichas producciones; es de gran importancia en salud pública ya que afecta al hombre; su diagnóstico se ha visto afectado por el tiempo que tarda el laboratorio en la producción de un resultado que permita confirmar o descartar la impresión clínica, tiempo que es de gran importancia para un tratamiento certero y la salvación de una vida humana o animal (4,22,23). El diagnóstico

final también se ve afectado por que las pruebas usadas actualmente desconocen el estado de evolución de la enfermedad que resulta de gran ayuda para un adecuado manejo una vez instaurada la enfermedad en la producción (3).

Las pruebas diagnósticas que se usan usualmente son la micro aglutinación lisis (MAT) la cual detecta inmunoglobulinas M (IgM) que corresponde únicamente a estados agudos de la enfermedad; es una prueba de alta especificidad y sensibilidad. (5). Una reciente investigación adecuó la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el diagnóstico de los diferentes serovares patógenos de *Leptospira* en bovinos (6). Se encontró una frecuencia de IgG contra *Leptospira* mayor a la esperada y con reacciones positivas frente a serovares que no fueron positivos en la prueba de microaglutinación. La inmunofluorescencia indirecta es una de las técnicas inmunológicas más simples y ha sido ampliamente utilizada debido a su rapidez y sensibilidad para detectar e identificar antígenos y anticuerpos. La técnica permite visualizar la fase primaria de la reacción antígeno-anticuerpo detectando no solo anticuerpos bivalentes sino también univalentes; para ello, un antianticuerpo (anti IgG o anti IgM), conjugado a una sustancia fluorescente se une al complejo inmune resultante (7). Esta prueba permite identificar concretamente la dinámica y el estado de evolución de la enfermedad, como también la frecuencia de anticuerpos contra *Leptospira* para cada uno de los serovares y el título de anticuerpos frente a ellos (6). Asimismo, la prueba IFI resulta útil para hacer seguimiento de la evolución de la enfermedad frente a la

instauración o no de un tratamiento o frente al desafío de una entidad en un hato ganadero ya que detecta estados de portador (5).

La micro aglutinación lisis (MAT) sigue siendo la prueba estándar para el diagnóstico de leptospirosis porque posee excelente sensibilidad en la detección de la IgM frente a serovares específicos, por lo que debe ser complementada con otras pruebas que detecten IgG, y para esto la IFI es una prueba diagnóstica útil por su rapidez, facilidad de ejecución, bioseguridad, sensibilidad y especificidad pues es una herramienta apropiada para complementar el diagnóstico (8).

Ya que la prueba de microaglutinación lisis solamente detecta aquellos estados agudos de la enfermedad, es necesario contar con otros métodos de laboratorio que permitan determinar los estados de portador, el estado inmunológico del animal o simplemente monitorear la evolución de la enfermedad frente a un tratamiento antibiótico instaurado; por esta razón, la presente investigación determinó el comportamiento de la IgM e IgG frente a diferentes serovares de *Leptospira* y relacionó los hallazgos obtenidos con estados agudos de la enfermedad, estados crónicos, así como también se determinó posibles reacciones cruzadas al encontrar niveles de anticuerpos altos frente a un determinado serovar acompañados de niveles bajos de anticuerpos frente a otros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del antígeno

Los serovares: *L. grippothyposa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. hardjo bovis*, *L. bratislava* y *L. pomona*, fueron gentilmente donados por el Centro de Diagnóstico del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) de Manizales. Dichas cepas se cultivaron en el medio EMJH a 27°C por 4 semanas.

Obtención de los sueros

Los 101 sueros de bovino fueron recolectados en el Centro de Diagnóstico del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) de Manizales; dichos sueros fueron previamente probados por la técnica MAT.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Fijación del antígeno

Las placas de inmunofluorescencia fueron fijadas con diferentes diluciones del antígeno para determinar la concentración óptima de trabajo con el antígeno. Cada serovar se cultivó a 27°C durante cuatro semanas en tubos de ensayo estériles. Al cabo de este tiempo se homogenizó por agitación suave cada cultivo durante 5 minutos, se tomó una alícuota de cada serovar en un tubo cónico estéril (Falcon), para inactivar el microorganismo con formol bufferado (pH 7,2) al 10% durante 10 minutos, se centrifugó durante 30 minutos a 3500 rpm, posteriormente se retiró el sobrenadante y se agregó buffer fosfato salino 0,015 M (PBS) pH 7,2, se repitió el procedimiento 2 veces más, finalmente se reconstituyó con PBS. Para cada serovar se utilizó una dilución diferente del antígeno: *L. icterohaemorrhagiae*: 1:64, *L. canicola*: 1:128, *L. grippothyposa*: 1:16, *L. hardjo bovis*: 1:64, *L. pomona*: 1:64 y *L. bratislava*: 1:32. A cada pozo de las placas de inmunofluorescencia se le depositó 15 µL de cada una de las anteriores diluciones; se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas, se colocó en acetona pura durante 30 minutos, luego se dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente conservarlas a -30°C.

Detección de anticuerpos

Se siguió el método descrito por Pierluigie y Richard (7). Se hizo una dilución 1:64 de cada suero; a cada pozo de la placa de

inmunofluorescencia se le colocó 15 μ L de la dilución; se incubó a 37°C durante 30 minutos en baño maría; posteriormente se jugó con agua destilada y se colocó en un vaso de koplín con PBS 0,015 M, pH 7,2 durante 5 minutos en agitación constante; se hizo un segundo lavado con PBS por 5 minutos y un tercer lavado con agua destilada por el mismo periodo de tiempo. Se removió el exceso de líquido y se adicionó a cada pozo 15 μ L de IgG anti bovino conjugada a isotiocianato de fluoresceína (Sigma) en una dilución de 1:128 en Azul de Evans 1:8000. Se incubó a 37°C durante 30 minutos en baño maría, se repitió el procedimiento de lavado anteriormente descrito; se eliminó el exceso de solución de lavado; se colocaron algunas gotas de buffer glicerol fosfato (pH 9,0), las que se dispersaron en la placa al colocar la laminilla cubreobjetos (22 x 60 mm). La reacción se visualizó en un microscopio de epifluorescencia con fuente de luz halógena, utilizando para ello el objetivo de 100X.

En cada placa se incluyó un suero control positivo, uno negativo, ambos en una dilución 1:64, así como también una alícuota de buffer. Para la interpretación de los resultados obtenidos se consideró que la reacción era positiva, cuando se observó la presencia de fluorescencia homogénea sobre las estructuras espiroquetales; y que la reacción era negativa, cuando se presentó ausencia de fluorescencia.

El criterio para fijar el punto final del título del suero fue la más alta dilución que diera una lectura de fluorescencia comparada con el control positivo.

A cada una de las muestras positivas (título mayor o igual a 1:64), se le realizó diluciones hasta 1:16384, con el fin de determinar los niveles de IgG para cada serovar.

Determinación del estado inmunológico de las muestras frente a las diferentes cepas de *Leptospira*

Al relacionar los datos obtenidos por los métodos utilizados para la detección de anticuerpos para cada muestra, se formaron 4 grupos que se definieron de la siguiente manera:

Sanos: animales que no presentaron títulos de anticuerpos por MAT e IFI.

Agudos: los animales que únicamente presentaron anticuerpos tipo IgM (MAT).

En transición: animales que presentaron títulos de anticuerpos por MAT e IFI frente al mismo serovar.

Crónicos: animales que presentaron títulos de IgG únicamente.

Reinfectados: animales que presentaron títulos de IgM e IgG frente a diferentes serovares.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron medidas de dispersión y de tendencia central para determinar los sueros positivos o negativos frente a los diferentes serovares de *Leptospira* tanto por MAT como por IFI; además, se utilizó la prueba de Chi cuadrado para el estado de la enfermedad, con respecto al tipo de inmunoglobulina detectada en las diferentes pruebas, (MAT detectó IgM e IFI detectó IgG), con el fin de probar la hipótesis nula que indica si dos criterios de clasificación son independientes cuando se aplican al mismo conjunto de entidades. Se dice que dos criterios de clasificación son independientes si la distribución de un criterio es la misma sin importar cuál sea la distribución del otro. Se buscó dependencia entre las variables de tipo cualitativo mediante la prueba Chi cuadrado para comprobar una de las siguientes hipótesis:

Ho: las variables son independientes.

Ha: las variables son dependientes.

De otro lado, se determinó el porcentaje de concordancia de los resultados obtenidos mediante tres repeticiones, mediante el uso de una prueba de Kappa.

RESULTADOS

Se utilizaron 101 sueros de bovino previamente probados por el Centro de Diagnóstico del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) de Manizales, de los cuales 69 fueron positivos para diferentes serovares de *Leptospira* y 32 negativos por MAT (Figura 1); por IFI el número de animales positivos fue 85 (Figura 2).

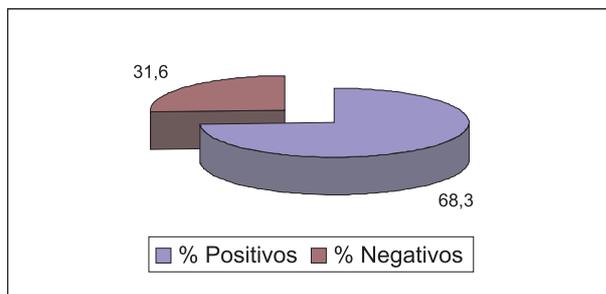


Figura 1. Resultados obtenidos al aplicar la técnica MAT.

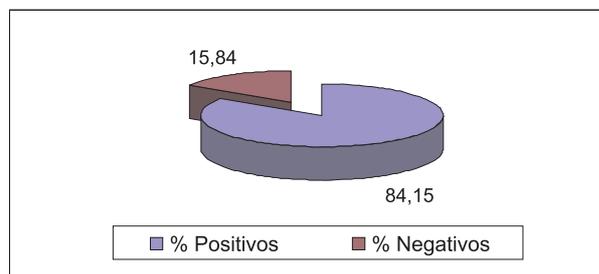


Figura 2. Resultados obtenidos por inmunofluorescencia indirecta.

Como se observa en la Tabla 1, por MAT el mayor porcentaje de sueros positivos fue solamente para un serovar (39 sueros), sólo una muestra presentó anticuerpos a cuatro cepas ensayadas; por IFI el mayor porcentaje de sueros corresponde a los que reaccionaron a tres serovares (22 muestras); 16 muestras no presentaron anticuerpos tipo IgG frente a *Leptospira* y 32 no reconocieron.

Tabla 1. Porcentaje de sueros positivos para una o más cepas mediante MAT e IFI.

Número de cepas	MAT %	IFI %
0	31,68	15,8
1	38,61	8,9
2	16,83	16,83
3	11,88	21,78
4	0,99	13,86
5	0	11,88
6	0	10,89

La frecuencia de muestras positivas para cada una de las cepas por MAT e IFI se observa en la Figura 3.

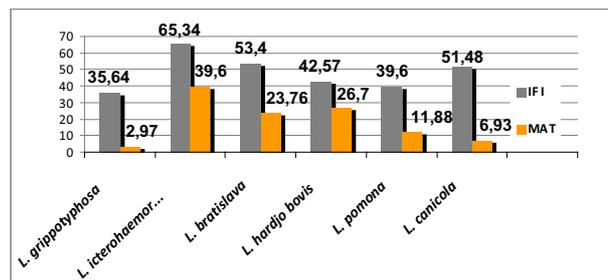


Figura 3. Porcentaje de bovinos que presentaron anticuerpos tipo IgM (MAT) e IgG (IFI) frente a los diferentes serovares de *Leptospira*.

Como se observa en la Figura 3, la mayor frecuencia de anticuerpos por las dos técnicas utilizadas corresponde al serovar *L. icterohaemorrhagiae*; de la misma manera, *L. grippothyposa* es el serovar que presenta menor frecuencia de anticuerpos.

Con base en los resultados obtenidos, tanto por IFI como por MAT, se analizó el estado de la leptospirosis para cada animal (Tabla 2); el mayor número de animales se encuentran reinfectados al presentar títulos de IgM e IgG frente a diferentes serovares de *Leptospira*.

Tabla 2. Estado de la enfermedad para cada animal según el patrón de anticuerpos detectado.

ESTADO DE LA ENFERMEDAD	No. SUEROS
SANOS	9
AGUDOS	7
TRANSICIÓN	1
CRÓNICOS	23
REINFECTADOS	61

Los resultados obtenidos por los métodos aplicados fueron analizados para cada cepa por medio de la prueba estadística de Chi cuadrado; los resultados de dicho análisis se observan en la Tabla 3; el serovar menos prevalente es *L. grippothyposa*; el serovar más prevalente es *L. icterohaemorrhagiae*; los más asociados con casos agudos de la enfermedad son: *L. icterohaemorrhagiae* y *L. hardjo bovis*; el serovar más prevalente en pacientes en transición es *L. icterohaemorrhagiae*; y el serovar más prevalente en los casos crónicos es *L. canicola*.

Tabla 3. Estado de la enfermedad para cada serovar de *Leptospira* según el patrón de anticuerpos presentado por IFI y MAT.

ESTADO INMUNOLÓGICO	<i>L. canicola</i>	<i>L. grippothyposa</i>	<i>L. ictero...</i>	<i>L. hardjo bovis</i>	<i>L. bratislava</i>	<i>L. Pomona</i>
Reacción Negativa IFI y MAT	46,53%	62,37%	20,79%	44,55%	36,63%	54,45%
AGUDOS	1,98%	1,98%	13,86%	12,87%	9,90%	5,94%
TRANSICIÓN	4,95%	0,99%	25,74%	13,86%	13,86%	5,94%
CRÓNICOS	46,53%	34,65%	39,6%	28,71%	39,6%	33,66%

Al hacer la medición del título de IgG, para cada uno de los serovares estudiados se encontró que el título más frecuente fue de 1:512 (74 sueros), siendo *L. icterohaemorrhagiae* la que presentó un mayor número de muestras con este título (26 sueros) (Figura 4).

Al analizar las muestras de bovinos que presentaron títulos de anticuerpos para dos o más cepas, se encontró que 46 sueros presentaron niveles de IgG iguales o mayores de 1:512 frente al menos dos cepas, pero a la vez frente a otras cepas presentaron títulos iguales o inferiores a 1:256; la frecuencia de relación de dependencia entre las variables (cepas) de dichos sueros se muestra en la Tabla 4.

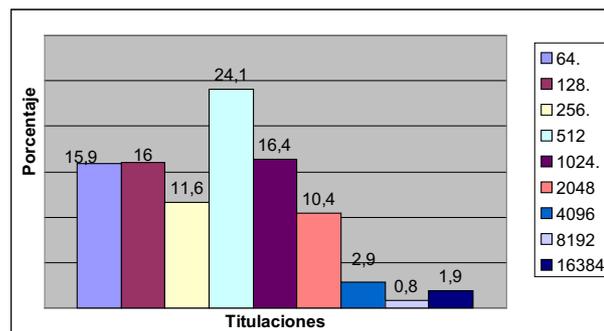


Figura 4. Frecuencia de los diferentes títulos de IgG frente a los serovares de *Leptospira* probados mediante inmunofluorescencia indirecta.

Tabla 4. Frecuencia de asociación de muestras de bovinos con titulaciones altas de IgG frente a un serovar de *Leptospira* y con títulos bajos de IgG dirigida a diferentes serovares de *Leptospira*.

		Número de sueros con títulos iguales o inferiores a 1:256						
Sueros con		<i>L. gripp</i>	<i>L. ictero</i>	<i>L. bratis</i>	<i>L. h. bovis</i>	<i>L. pomona</i>	<i>L. canicola</i>	TOTAL
Títulos iguales o mayores a 1:512	<i>L. gripp</i>		2	4	4	5	3	20
	<i>L. ictero</i>	11	0	14	6	15	11	57
	<i>L. bratis</i>	7	1		4	6	4	22
	<i>L. h. bovis</i>	8	3	9		8	6	34
	<i>L. pomona</i>	1	2	0	1		3	7
	<i>L. canicola</i>	6	2	5	2	6		21
TOTAL		33	10	32	17	40	27	

Los títulos altos de IgG encontrados en 57 sueros, contra *L. icterohaemorrhagiae*, fueron los que más se relacionaron con títulos iguales o inferiores a 1:256 del mismo anticuerpo con otros serovares de *Leptospira*, destacándose con mayor frecuencia *L. Pomona* y *L. Bratislava*; títulos altos de IgG frente a *L. Bratislava* a su vez se relacionaron con mayor frecuencia con títulos bajos dirigidos contra *L. icterohemorrhagiae* y *L. pomona*; por el contrario, un efecto similar no se observó con los sueros con títulos altos frente a *L. pomona* ya que los sueros que presentaron títulos altos frente a este serovar, presentaron títulos bajos con mayor frecuencia frente a *L. canicola* y *L. icterohemorrhagiae*; esta cepa a su vez fue la que con mayor frecuencia presentó títulos bajos de anticuerpos en muestras de suero que presentaron títulos altos frente a otras *Leptospiras*.

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos al aplicar los métodos empleados en este estudio, se encuentra una frecuencia de leptospirosis del 92%, con una incidencia del 6% que corresponde a los 7 sueros que mostraron únicamente títulos de IgM por MAT; hay un alto índice de animales que presentan una respuesta tipo IgG que corresponde a un estado crónico de

la enfermedad o que posiblemente estén en un estado transicional, estos resultados son consistentes con estudios que refieren que la leptospirosis es una enfermedad de alta prevalencia en el país y en el mundo (3).

Si se comparan los resultados entre las dos pruebas utilizadas en este estudio, se observa que los resultados obtenidos por IFI muestran una mayor seroprevalencia para leptospirosis que MAT, ya que esta última está limitada solo a detectar estados agudos de la enfermedad donde solo se activan las IgM, mientras que por IFI se detectaron además los estados crónicos y en transición, aunque es una técnica que permite también detectar los estados agudos dependiendo del tipo de conjugado utilizado (5); la respuesta humoral cambia desde el primer día de la infección ya que el primer estímulo de anticuerpos es dado por la activación de IgM, a los 15 días aproximadamente dichos anticuerpos comienzan a descender y simultáneamente las IgG se activan, este momento es denominado estado de transición ya que si se realiza una serología en esta fase de la enfermedad se encuentran presentes las dos inmunoglobulinas, revelando que el animal está pasando de un estado agudo a uno crónico en el cual se va a encontrar IgG solamente; por esta razón, se ha considerado que MAT e IFI son complementarias en el diagnóstico inmunológico de la leptospirosis (7).

Un alto porcentaje de sueros fueron positivos a 2 o más serovares mediante IFI, mientras que por MAT el mayor porcentaje lo obtuvieron los sueros que reaccionaron solamente a una cepa; otros estudios revelan que los sueros muestreados responden a una o más cepas por cualquier prueba que se realice, presentando reactividad frente a máximo tres cepas con mayor frecuencia (9). Gavaldón R. D. et al. (10) en su estudio en México obtuvieron en el análisis de 4.043 muestras que existió un 31,1% de seropositividad a una o a más serovariedades de *L. interrogans*.

Los diferentes serovares de *Leptospira* se encuentran de manera endémica en el medio ambiente, donde los animales se ven infectados inicialmente por un solo serovar; a medida que la reacción inmunológica cambia (de IgM a IgG) y acompañado por un posible estado de inmunosupresión, el animal fácilmente es reinfectado por otros serovares manifestando de manera crónica la enfermedad (3). En nuestro estudio, se observó que los serovares más frecuentes que causan reinfección en estados crónicos corresponden a *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. bratislava*.

En los resultados obtenidos por este estudio, se determinó que el serovar más prevalente correspondió a *L. icterohaemorrhagiae*; estudios realizados en Colombia y el mundo han mostrado mayor frecuencia para *L. hardjo* (8, 11) y *L. icterohaemorrhagiae* (6, 12, 13). Otros estudios realizados en humanos en Colombia, han demostrado también la alta frecuencia de estos dos serovares. Falconar et al. (14), reportaron que en el departamento de Atlántico el 9,7% de los casos fueron positivos para *Leptospira*, siendo los serovares *L. icterohaemorrhagiae* (62%) y *L. hardjo* (12,8%) los más frecuentes.

L. icterohaemorrhagiae y *L. hardjo bovis* fueron las cepas frente a las que se detectó con mayor frecuencia IgM, indicando esto que dichas *Leptospiras* son las que en el momento del estudio presentaron una mayor incidencia. Resultados

similares, fueron encontrados por Otte et al. (15) en Córdoba y áreas adyacentes de Sucre y Antioquia, pero difiere de los obtenidos por Bermúdez et al. (16) en el municipio de Puerto Berrío, por Alonso C. et al. (17) en Monagas (Venezuela), Dubraska V. et al. (13) en Maracaibo (Venezuela) y Murillo y Pareja (18) en la hacienda *El Progreso* de la Universidad de Antioquia.

En el estado crónico hubo mayor frecuencia de anticuerpos frente a *L. canicola* y el menos prevalente fue *L. grippothyposa*, coincidiendo con los estudios realizados por Murillo y Pareja (18) en la hacienda *El Progreso* de la Universidad de Antioquia, por Bermúdez et al. (16) en el municipio de Puerto Berrío y por Gaviria et al. (19) en el municipio de Santa Rosa de Osos (Antioquia); este hallazgo puede estar indicando varias cosas: la primera, una mayor persistencia de estos dos serotipos en esta especie animal o, la segunda, una cicatriz inmunológica de mayor duración, posiblemente asociada con una mayor capacidad de generación de memoria inmunológica; así mismo, este resultado podría estar indicando un mayor índice de infección con esta cepa que permite un estado activo de la respuesta inmunológica reflejado por una mayor frecuencia de IgG.

Un estudio anteriormente realizado en sueros colectados en la región cafetera, muestra que la mayor frecuencia correspondió a *L. hardjo bovis*, seguida por *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. canicola*; la divergencia en los resultados obtenidos puede deberse a diferentes factores relacionados con la dinámica de movilidad de las poblaciones de bovinos y otros animales, y posiblemente también a factores climáticos o ambientales (3).

Nuestro estudio reporta que la titulación más frecuente por IFI en los sueros procesados fue de 1:512, siendo *L. icterohaemorrhagiae* la más frecuente en esta titulación; estudios revelan que las cepas que son propias de los bovinos presentan niveles bajos de anticuerpos que

las pruebas inmunológicas corrientes no son capaces de detectar, mientras que los serovares que no son específicos de la especie pueden generar titulaciones muy altas o estar sobre el punto de corte (3). Para serovares propios de los bovinos, este estudio encontró titulaciones bajas para *L. hardjo bovis* y *L. pomona*.

Alfaro, C. et al. (3), en su estudio demostraron que la situación general de las fincas es diversa, la mayoría de los títulos de anticuerpos tipo IgM son bajos, es decir entre 1:100 a 1:200; tomando en consideración que los animales no han sido vacunados, estos títulos permiten inferir que la enfermedad se presenta en forma endémica; la evidencia de problemas reproductivos y las condiciones agroecológicas de la zona, favorecen el mantenimiento de *Leptospira* en el medio y la presentación de la enfermedad en forma subclínica con tendencia a la cronicidad. Aunque las titulaciones frente a un serovar sean bajas, puede presentarse una enfermedad de curso grave en el paciente; por esta razón, los títulos obtenidos en este estudio no son predictivos de la presencia o no de sintomatología, pero sí de la intensidad de la respuesta inmunológica de los animales que está relacionada con el tiempo de contacto, con la persistencia de dicho serovar, con la frecuencia y el tipo de vacunas utilizadas y con factores genéticos del hospedero.

46 muestras presentaron títulos altos de IgG (iguales o mayores a 1:512) frente a diferentes serovares; estos a su vez presentaron títulos bajos (menores o iguales a 1:256) frente a uno o más de los serovares restantes (Tabla 4); esta asociación puede estar indicando reacciones cruzadas en la prueba de inmunofluorescencia indirecta; para este estudio, se observa cómo *L. icterohaemorrhagiae*, que fue el serovar frente al cual se presentó con mayor frecuencia títulos altos de anticuerpos, es el que presenta también mayor número de sueros con títulos bajos frente a otras *Leptospiras*, resaltándose la alta frecuencia de reconocimiento de *L. bratislava* y *L. pomona*; sueros con títulos altos frente a *L. bratislava*, reconocen a su vez con títulos bajos a *L. icterohaemorrhagiae* y *L. pomona*; este hallazgo

puede ser un indicio de reacción cruzada por presencia de antígenos comunes entre estos tres serovares de *Leptospira*, lo cual se refuerza por el hecho de que *L. pomona* es el serovar que con mayor frecuencia es reconocido a títulos bajos por sueros de animales que presentan títulos altos de IgG frente a otros serovares de este microorganismo; este hallazgo puede significar que este serovar comparte antígenos con las otras 5 *Leptospiras*; debido al tamaño de la muestra no pudo ser aplicada ninguna prueba estadística que pudiera servir para tratar de demostrar dicha relación; además, no hay estudios que demuestren que puede haber reactividad cruzada entre serovares, aunque algunos autores refieren que esto puede ser posible (9).

De los resultados obtenidos en la presente investigación, se concluye que la frecuencia de anticuerpos tipo IgG frente a *Leptospira* en bovinos en la Región Cafetera es alta, correspondiendo estos niveles altos a casos crónicos de la enfermedad, aunque también podrían corresponder a estados inmunes por vacunaciones previas, datos que no pudieron ser obtenidos para dicha investigación; así mismo, se concluye que el serovar *L. icterohaemorrhagiae* es el más reconocido por las muestras de bovinos a títulos altos de anticuerpos, los cuales a su vez podrían estar generando reacciones cruzadas con antígenos presentes en otros serovares, principalmente con *L. bratislava* y *L. pomona*, siendo esta última la más frecuentemente reconocida a títulos bajos por muestras de suero que reconocen a títulos altos los otros serovares.

Es necesario, entonces, implementar otros proyectos que puedan servir para demostrar la relación de causalidad entre los serovares con reacción cruzada, identificando antígenos comunes que pueden ser utilizados en un futuro para el diseño de vacunas de menor costo y mayor efectividad que puedan generar un cubrimiento inmunológico amplio frente a los serovares más prevalentes de nuestra región.

BIBLIOGRAFÍA

1. Silva, M.R.F. Leptospirosis canina. Memorias I seminario de zoonosis emergentes, prevención y perspectivas. Manizales, Febrero 2004;p.45-65.
2. Martínez, G. Estado actual de la leptospirosis. [En línea]: ICA - CEISA, Bogotá. Informe Anual (2000) p. 61-63. [Citado 26 junio del 2007]. Disponible en: <<http://www.unicordoba.edu.co/revistas/revistamvz/MVZ-51/61.pdf>>
3. Alfaro, C., Y. Aranguren y A. Clavijo. Epidemiología y diagnóstico de la leptospirosis como fundamentos para el diseño de estrategias de control. CENIAP HOY 2004;1:1-15.
4. Muriel, D.I. Diagnóstico de los diferentes serotipos de leptospirosis. Manizales, 1999. 25 p. Trabajo para obtener el título de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
5. Orrego U, A; Giraldo de L, G; Ríos A, B. Leptospirosis en personas de riesgo de quince explotaciones porcinas y de la central de sacrificio de Manizales, Colombia. Archivos médicos veterinarios 2003;35:6-7.
6. Aricapa H, Orozco Y, Guerrero J. H., Pérez J. Aplicación de la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra *leptospira*. Manizales. 2004; p. 3-20. Trabajo para obtener el título de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
7. PIERLUIGI E. B. and RICHARD C. T. Inmunoflorescence and inmunoenzyme procedures. In: PIERLUIGI E. B. and RICHARD C. T. (eds). Methods in Immunodiagnosis. Second edition. Editorial A. Wiley Medical publication. New York, 1980. P: 161-202.
8. Moles, C.L.P. Estudio serológico de Leptospirosis bovina en México. Rev. Cubana Medicina Tropical 2002;54:24-27.
9. Agudelo F, P; Restrepo, M; Lotero, M.A. Evaluación de la prueba de Inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de leptospirosis humana. Biomédica 2006;26:216-223.
10. Gavaldón R. D. Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. Rev. Cubana Medicina Tropical 2002;54:24-27.
11. Segura C, V.M; Solís Calderón, J.J. Seroprevalence of and Risk Factors for Leptospiral Antibodies among Cattle in the State of Yucatan, Mexico. Rev. Tropical Animal Health and Production 2003;35:293-299.
12. Giraldo, G; Orrego, U. A; Aristizábal, J. A; Bohórquez, A; Ríos, A. B; Quiceno, J.; Giraldo, M. J.; Valencia, D. J.; Parra, V. E.; Hincapié, M. I. Identificación de focos de *Leptospira* en porcinos cría de la zona cafetera, para su prevención y control. Informe final. Pronata Corpoica. Eje Cafetero, 1999; p.284-296.
13. Dubraska V.; Díaz C. Leptospirosis. [En línea]: Universidad de Zulia. Venezuela. Manual de ganadería doble propósito. Artículo 4. 2005; p. 300-306. [Citado 10 junio de 2007]. Disponible en: <http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion5/articulo4-s5.pdf>
14. Falconar A., Macías, J. C., Vergara C., Romero C. Comportamiento de la leptospirosis en el departamento del Atlántico (Colombia). Rev. Salud Uninorte 2005;20:18-29.
15. Otte E, J; Otte, M; Navarrete, Y.M.; Orjuela. La leptospirosis bovina en el departamento de Córdoba, Colombia. Informe técnico N° 9. ICA. Montería 1991;p.50.

16. Bermúdez C, Botero J, Castañeda J. Prevalencia de anticuerpos leptospirales en el ganado bovino del Municipio de Puerto Berrío Antioquia. 1991; 51p. Trabajo para obtener el título de Medicina Veterinaria. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias. Programa de Medicina Veterinaria.
17. Alonso. A. C., García P. F.J., Ortega. M.L.N. Epidemiología, diagnóstico y control de la Leptospirosis bovina. Revista Investigación agropecuaria sanidad animal 2001;16:205-221.
18. Murillo, N; Pareja, H. Prevalencia de anticuerpos Leptospirales en el hato bovino de la Hacienda El Progreso de la Universidad de Antioquia, Medellín. Trabajo para obtener el título de Medicina Veterinaria. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias. Programa de Medicina Veterinaria 1992;p.6-42.
19. Gaviria G; Ramírez V; Restrepo B; Gómez N. Diagnóstico epidemiológico referente a varias patologías de bovinos en tres haciendas de la Universidad de Antioquia. [En línea]: Universidad de Antioquia. Informe Universidad de Antioquia. 2001; p. 26-28. [Citado 26 julio de 2007]. Disponible en: <http://kogi.udea.edu.co/articulos/Med_Bovina/proyecto%20diagn%F3stico.pdf>
20. Aricapa, H. Síndrome reproductivo infeccioso bovino. Memorias III seminario internacional en reproducción y metabolismo en bovinos, Universidad de Caldas-Colombia, 2002;p.47-57.
21. Blood, D.C. y Radostitis, O. Enfermedades causadas por bacterias. En: Blood, D.C. y Radostitis, O. (ed). Medicina Veterinaria. Quinta edición. Interamericana de España, México 1992;p.816-826.
22. Ochoa, J.A; Sánchez E. I. Ruiz. Epidemiología de la Leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. Rev. Panamericana de Salud Pública 2000;7:325-331.
23. Ruiz, I. Avance de resultados municipio de San José de la Montaña. Estudio de infertilidad bovina en las zonas lecheras de Antioquia. Universidad de Antioquia y otras. 1995;p.29.