



# Estudio de seroprevalencia de leptospirosis canina en Manizales – Colombia, mediante aglutinación microscópica (MAT)

Raúl Fernando Silva-Molano<sup>1</sup>, Fernando Castro<sup>2</sup>,  
Juan Manuel Montoya<sup>2</sup>, Ana María Loaiza-Echeverri<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Salud Animal, Universidad de Caldas, A.A. 275, Manizales, Colombia.

<sup>2</sup> Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas.

raul.silva@ucaldas.edu.co

(Recibido: 1 agosto, 2008; aprobado: 30 octubre, 2008)

**RESUMEN:** En el presente estudio se determinó la frecuencia de leptospirosis en 200 perros atendidos en clínicas de la ciudad de Manizales; tal determinación se realizó mediante el test de aglutinación microscópica (MAT). Cada suero se enfrentó a seis serovares de leptospira (*icterohaemorrhagiae*, *grippityphosa*, *canicola*, *pomona*, *bratislava* y *hardjo*), y se encontró un 20,5% de caninos positivos, de los cuales el mayor porcentaje reaccionó a los serovares *icterohaemorrhagiae*, *grippityphosa* y *canicola*. La mayoría de estos sueros lo hizo a títulos entre 1/100 y > 1/400. Los resultados obtenidos en el presente trabajo no muestran diferencias significativas en relación con el sexo, procedencia (rural/urbano), raza, animales vacunados y no vacunados.

**Palabras clave:** perros, suero, serovares, grippityphosa.

## Frequency study of canine leptospirosis in Manizales – Colombia, with the aid of microscopic agglutination test (MAT)

**ABSTRACT:** In the present study the frequency of Leptospirosis in 200 dogs treated in veterinary clinics of Manizales city, was determined with the aid of the Microscopic Agglutination Test (MAT). Each serum was confronted to six leptospira serovars (*icterohaemorrhagiae*, *grippityphosa*, *canicola*, *pomona*, *bratislava* and *hardjo*). The results showed that 20.5% of the tested dogs were positive for Leptospirosis, of which the majority reacted to the serovars, *icterohaemorrhagiae*, *grippityphosa* and *canicola*. Most of these serums had titles of between 1/100 and > 1/400. The results presented in this study do not show a significant difference in relation to gender, origin (urban/rural), breed or vaccination status.

**Key words:** dogs, serum, serovars, grippityphosa.

## Introducción

La leptospirosis es considerada una de las zoonosis más difundidas y un serio problema de salud pública en el mundo entero (Haake et al., 2000; Guerreiro et al., 2001; Effler et al., 2002); es causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira*, que afecta a una gran cantidad de huéspedes mamíferos, entre ellos humanos, equinos, caninos, cerdos, bovinos y animales silvestres (Flannery et al., 2001; Nally et al., 2001). El agente provoca desde infecciones inaparentes hasta casos fatales (Lottersberger et al., 2002; Russ et al., 2003). Los signos clínicos en la leptospirosis canina dependen de la edad e inmunidad del hospedador, de factores medioambientales y de la virulencia del serovar infectante (Groves et al., 2000). Afecta a perros de cualquier edad, pero la incidencia es mayor en machos (Tilley, 1998).

En términos generales, el reconocimiento clínico de la leptospirosis canina no es factible de realizar, dado que las leptospiras pueden afectar diferentes sistemas de órganos, resultando en una extensa variedad de presentaciones clínicas (Effler et al., 2002), la mayor parte de las cuales son crónicas y subclínicas (Grauer, 1998) y sin sintomatología patognomónica. La confirmación por parte del laboratorio se obtiene cuando se identifica o aísla el patógeno en muestras clínicas o cuando se demuestra la presencia de títulos de anticuerpos indicadores de infección activa contra uno o más serovares de leptospiras (Smits et al., 1999). La prueba de aglutinación microscópica conocida por sus siglas MAT (Microscopic Agglutination Test), es la técnica de referencia internacional para la detección de anticuerpos específicos anti-leptospiras (Lottersberger et al., 2002).

Los objetivos planteados para la realización del presente estudio fueron: determinar la frecuencia de presentación de leptospirosis mediante el test serológico de aglutinación microscópica (MAT), en la población de perros asistentes a atención clínica veterinaria en Manizales-Colombia; determinar los títulos de anticuerpos frente a los serovares de leptospira en los perros positivos

al test de aglutinación microscópica (MAT), y determinar la distribución de los individuos serológicamente positivos en relación con el sexo, la edad, la raza y el estado de vacunación.

## Materiales y Métodos

Geográficamente Manizales está localizada en el centro occidente de Colombia, en la cordillera central. Tiene una altitud de 2.160 msnm, con una temperatura media de 18,5°C y una población humana de 414.389 habitantes (DANE, 2005).

Dado que la prevalencia de leptospirosis en perros de Manizales era desconocida, se estimó el tamaño muestral para una prevalencia estimada del 50%, con un nivel de confianza del 93%, mediante la aplicación de la siguiente fórmula (Thrusfield, 1995):  $n = 1,96^2 P_{exp} (1 - P_{exp}) / d^2$ ; donde: n = tamaño muestral requerido,  $P_{exp}$  = prevalencia esperada, d = precisión deseada absoluta. De esta forma: n = 196. Para efectos de este trabajo se aproximó el tamaño muestral a 200 perros.

Para determinar la frecuencia de presentación de leptospirosis y los títulos de anticuerpos frente a diferentes serovares, en perros de Manizales, Colombia, se recolectaron muestras de sangre venosa de perros atendidos en clínicas de la ciudad, provenientes tanto de la zona rural como urbana, mayores de seis meses, sin distinción de raza, sexo, ni estado de vacunación, y con diagnóstico clínico (leptospirosis u otro) o sin él. De cada animal se obtuvo aproximadamente 5 ml de sangre mediante punción en la vena cefálica, safena o yugular, la cual fue colectada en tubos estériles sin anticoagulante. Esta muestra fue trasladada al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), donde 24 horas después por centrifugación a 500 g y a una temperatura de 10°C, se separó el suero, transvasándolo a tubos eppendorf, en los cuales se congeló a -20°C hasta su procesamiento.

Las muestras de suero fueron analizadas mediante el test de aglutinación microscópica (MAT), para lo cual se utilizaron como antígeno los siguientes serovares del cepario del Instituto Colombiano

Agropecuaria (ICA): *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *canicola*, *pomona*, *bratislava* y *hardjo*

En una primera fase, de descarte de negativos (screening), los sueros en una dilución de 1:50 se enfrentaron a cada uno de los serovares y se incubaron a 37°C por 2:30 horas. La lectura se realizó en microscopio de campo oscuro, poniendo una gota de control al 50% y una gota de la mezcla antígeno-suero problema.

La segunda fase consistió en titular todos los sueros positivos al screening, a títulos de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600. Al igual que para el screening, se incubaron a 37°C por 2:30 horas y se utilizó un control del 50% para cada serovar. La lectura se realizó de la misma forma que para el screening, poniendo una gota del control y una gota de cada dilución, determinando el título más alto (entre las diluciones realizadas) en el cual se presentó reacción. Entre algunos de los sueros positivos se presentaron al mismo tiempo reacciones frente a diferentes serovares, considerándose como el causante de la reacción (seropositividad) al de mayor título, y como coaglutinaciones a los que presentaron títulos iguales frente a distintos serovares.

Para realizar el análisis estadístico, se utilizaron los programas Epi Info 2002 – Revisión 2 (2003) y Win Episcope 2.0. Los resultados de la frecuencia de presentación de leptospirosis se expresaron como proporciones, que fueron determinadas por intervalos de confianza, para lo cual se usó aproximación normal. Para determinar la aparición o no de leptospirosis bajo la influencia de variables como sexo, estado de vacunación, edad y raza, se realizó un análisis de regresión logística simple, que, acompañado de la medición de la odds ratio o probabilidad de prevalencia, constituye una medición básica en estudios transversales y es un estimador de riesgo.

### Resultados y Discusión

La cantidad de sueros caninos positivos a títulos 1:50 y superiores fue 41, de un total de 200, lo que representa una seroprevalencia del 20,5% para la población muestreada. La totalidad de estos reaccionó a títulos de 1/100 (58,5%), 1/200 (36,6%) y 1/400 (4,9%), correspondiendo la gran mayoría a los serovares *icterohaemorrhagiae* (11 casos), *grippotyphosa* (8 casos), *canicola* (8 casos), *pomona* (8 casos) y *bratislava* (6 casos) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Distribución de los sueros positivos que detallan los serovares reaccionantes y el título alcanzado.

| Título                     | 1/100        | 1/200        | 1/400      | Total | %    |
|----------------------------|--------------|--------------|------------|-------|------|
| <i>icterohaemorrhagiae</i> | 6            | 5            | 0          | 11    | 26,8 |
| <i>grippotyphosa</i>       | 5            | 2            | 1          | 8     | 19,5 |
| <i>canicola</i>            | 2            | 5            | -          | 7     | 17,1 |
| <i>pomona</i>              | 4            | 2            | -          | 6     | 14,6 |
| <i>bratislava</i>          | 4            | 1            | -          | 5     | 12,2 |
| <i>Hardjo</i>              | -            | -            | -          | 0     | 0    |
| Coaglutinaciones           |              |              |            |       |      |
| <i>grippotyphosa</i>       | 3            | -            | 1          | 4     | 9,8  |
| <i>canicola</i>            |              |              |            |       |      |
| Total                      | 24<br>58,5 % | 15<br>36,6 % | 2<br>4,9 % | 41    | 100% |

Para determinar la aparición o no de leptospirosis bajo la influencia de variables como sexo, procedencia, estado de vacunación, edad y raza, se realizó un análisis de regresión logística simple, sin encontrar diferencias significativas entre las variables en estudio ( $P > 0,05$ ).

La seroprevalencia del 20,5%, obtenida en el presente trabajo, es relativamente baja en contraste con el único trabajo realizado en la zona por Giraldo de León et al. (2000), quienes hicieron dos evaluaciones con 17 y 18 muestras de sangre de perros pertenecientes a porcícolas de la región, y obtuvieron 37,2% y 38,9 de seropositividad respectivamente. De la misma forma, es relativamente baja en comparación con lo reportado por Rodríguez et al. (2004) en 197 perros callejeros de la ciudad de Cali, que presentaron una seropositividad del 41,1%. La variación en la seroprevalencia obtenida en los diversos estudios podría deberse al número de animales muestreados, al tipo de muestreo realizado y a las características de estos animales. Además, frecuentemente, las infecciones y la prevalencia de la enfermedad se producen por un número limitado de serovares endémicos de un país o una región y están íntimamente ligadas a factores ecológicos y medio ambientales (Acha & Szyfres, 2001; Alonso-Andicoberry et al., 2001).

En el presente estudio, se perfilan como serovares de importancia para la población canina muestreada, los serovares *grippotyphosa*, *pomona* y *bratislava*, lo cual concordaría con las observaciones hechas por Groves et al. (2000) y Cai et al. (2002), quienes indican una tendencia cambiante en la epidemiología de la enfermedad en los Estados Unidos, donde los serovares *grippotyphosa* y *pomona* han reemplazado a *icterohaemorrhagiae* y *canicola* como los serovares prevalentes responsables de leptospirosis canina. Y de acuerdo con Wohl (1996), esta disminución de los casos asociados con *canicola* e *icterohaemorrhagiae* probablemente se deba a los muchos años de usar vacunas que contienen dichos serovares.

La obtención de un 4,9% de los perros reaccionantes con títulos de 1/400, podría corresponder a lo

planteado por Zamora & Riedemann (1986), en un trabajo realizado con bovinos, pero que podría extrapolarse a caninos, según los cuales la obtención de títulos superiores a 1/400 se consideraría indicativo de infección. Por otro lado, Rentko & Ross (1994) afirman que un título único contra un serovar contra el cual no ha sido vacunado se considera como positivo, lo cual sería aplicable para los animales reaccionantes para los títulos entre 1/100 y 1/200.

### Conclusiones

Mediante la realización del presente trabajo se concluye que la seroprevalencia de leptospirosis en la población canina muestreada en Manizales fue del 20,5%. No se presentaron diferencias significativas con relación al sexo, edad, raza, animales vacunados y los que no lo estaban. Los serovares más frecuentes fueron *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa* y *canicola*. No se encontraron animales serorreaccionantes frente al serovar *hardjo*. Los sueros reaccionaron a títulos entre 1/100 y 1/400.

### Referencias bibliográficas

- Acha, P.; Szyfres, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3<sup>th</sup> ed. **O.P.S.**, Washintong D.C.: USA, 2001. p. 175-185.
- Alonso-Andicoberry, C.; García, F.; Ortega, L. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión). **Investigación Agropecuaria: Producción y Sanidad Animal**. v.16, p. 205-225, 2001.
- Cai, H.; Hornby, G.; Key, D. et al. Preliminary study on differentiation of *Leptospira grippotyphosa* and *Leptospira sejroe* from other common pathogenic leptospiral serovars in canine urine by polymerase chain reaction assay. **Journal Veterinary Diagnosis Investigation**. v.14, p. 164-168, 2002.
- DANE. **Censo general 2005**. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. República de Colombia. [www.dane.gov.co/censo/](http://www.dane.gov.co/censo/) [Accesado en 12/10/2006]

- Effler, P.; Bogard, A.; Domen, H. et al. Evaluation of Eight Rapid Screening Test for Acute Leptospirosis in Hawaii. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, p. 1464-1469, 2002.
- Flannery, B.; Costa D.; Carvalho F. et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, p. 3303-3310, 2001.
- Giraldo de Leon, G.; Orrego, A.; Castro, A.F. Leptospirosis en caninos de porcícolas de la zona central cafetera. **CORPOICA**. 2000.
- Grauer, G. **Leptospirosis canina**. En: Morgan, R. Clínica de pequeños animales. Harcourt – Brace, Madrid. España, 1998. p. 498-500.
- Groves, M.; Harrington, K.; Taboada, J. **Canine leptospirosis**. En: Ettinger, S.; Feldman, E. Textbook of veterinary internal medicine, disease of the dog and cat. 5<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders, Philadelphia. USA, 2000. p. 397-398.
- Guerreiro, H.; Croda, J.; Flannery, B. et al. Leptospiral protein recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infectology e Immunology**. v. 69, p. 4958-4968, 2001.
- Haake, D.; Chao, G.; Zuerner, R. et al. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. **Infectology e Immunology**. v. 68, p. 2276-2285, 2000.
- Lottersberger, J.; Pauli, R.; Vanasco, N. Desarrollo y validación de un enzimoimmunoensayo para el diagnóstico de Leptospirosis bovina. **Archivos de Medicina Veterinaria**. v.34, p. 89-95, 2002.
- Nally, J.; Timoney, J.; Stevenson, B. Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*. **Infectology e Immunology**. v.69, p. 400-404, 2001.
- Rentko, V.; Ross, L. **Leptospirosis canina**. En: Kirk, R.; Bonagura J. Terapéutica veterinaria de pequeños animales XI. Madrid, España: Interamericana McGraw-Hill, 1994, p. 289-292.
- Rodríguez, A.L.; Ferro, B.E.; Varona, M.X. et al. Evidencia de exposición a *Leptospira* en perros callejeros de Cali. **Biomédica**. v. 24, p. 291-295, 2004.
- Russ, A.K.; Jali, I.E.; Bahaman, A.R. et al. Seroepidemiological Study of Leptospirosis Among The Indigenous Communities Living in The Periphery of Crocker Range Park Sabah, Malaysia. **ARBEC**. p.1-5, 2003.
- Smits, H.; Ananyina, Y.; Cheresky, A. et al. International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, p. 2904-2909, 1999.
- Thrusfield, M. **Veterinary epidemiology**. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Blackwell Science. Inglaterra, 1995, p. 182-184.
- Tilley, L. **Leptospirosis canina. La consulta veterinaria en 5 minutos**. Inter-médica, Buenos Aires. República Argentina, 1998. p. 806-807.
- Wohl, J.S., Canine leptospirosis. **The Compendium**. v.18, n.11, p. 1215-1241, 1996.
- Zamora, J.; Riedeman, S. Consideraciones para la interpretación de la prueba de aglutinación microscópica en el diagnóstico de leptospirosis bovina. **Archivos de Medicina Veterinaria**. v.18, p. 145-147, 1986.