

ANÁLISIS RETROSPECTIVO DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LEPTOSPIROSIS BOVINA PROCESADAS EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA, 1998-2001

Retrospective Analysis of Bovine Leptospirosis Diagnostic Tests Performed at the Research and Diagnosis Unit of Leptospirosis of Zulia University, 1998-2001

Joany Van Balen¹, Armando Hoet², Gerardo D'Pool¹, Marcelo Gil¹, Freddy Escalona³ y Dubraska Díaz¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. ²Department of Veterinary Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, The Ohio State University. ³Decanato de Veterinaria, Universidad Lisandro Alvarado, Barquisimeto, estado Lara, Venezuela. E-mail: joany_vb@yahoo.com, dubraska_d@yahoo.com

RESUMEN

En el presente estudio se analizaron los resultados de sueros de bovinos procesados en la Unidad de Investigación y Diagnóstico de Leptospirosis de la Universidad del Zulia durante el período 1998-2001. De un total de 819 muestras provenientes de la región occidental de Venezuela, procesadas mediante la Técnica de Microaglutinación (MAT), se observó que 38% animales fueron seropositivos a uno o más serovares. Los serovares *icterohaemorrhagiae* (49%), *hardjo* (45%) y *hebdomadis* (44%) fueron los más frecuentes, sin evidenciar diferencias estadísticamente significativas entre sí. En cuanto a la vacunación, se observó un 56% de seropositividad en animales no vacunados y 26% en animales vacunados. En relación a la edad, se obtuvo un 46% de seropositividad en animales mayores de 48 meses de edad, 35% en animales entre 12 y 48 meses de edad y 100% en bovinos menores de 12 meses de edad. De 270 animales con registros clínicos completos, 99% reportaron abortos como signo clínico más relevante, de los cuales el 49% fueron realmente positivos a leptospirosis. Se concluye que *L. icterohaemorrhagiae* y *L. hardjo*, fueron los serovares que circularon mayormente en el ganado bovino en la región occidental de Venezuela desde 1998 hasta 2001, siendo asociados en varias oportunidades a problemas abortivos. También se observó que los animales no vacunados presentaron una mayor seropositividad que los vacunados. Este estudio permitirá establecer una línea base para comparar las seroprevalencias actuales y futuras de la leptospirosis bovina en esta región, aportando información

epidemiológica importante que permita el mejoramiento de medidas de prevención y control en contra de esta enfermedad.

Palabras clave: Leptospirosis bovina, seroprevalencia, factores de riesgo.

ABSTRACT

Results from bovine serum samples processed at the Unit of Investigation and Diagnose of Leptospirosis of Zulia University, during the period 1998-2001 were analyzed in the present study. From a total of 819 samples submitted across the Western region in Venezuela, 38% were positive to one or more serovars by the Microagglutination Test (MAT). The most frequent serovars observed were *icterohaemorrhagiae* (49%), *hardjo* (45%) and *hebdomadis* (44%), however, no statistical significant differences were found between them. In regards to vaccination, 56% of the non-vaccinated animals and 26% of the vaccinated were seropositive. The age distribution showed that 46% of the animals older than 48 months, 35% of the animals between 12 and 48 months-old, and 100% of the animals younger than 12 months-old were positive to leptospira. From 270 animals with complete clinical records, 99% reported abortion as the main clinical sign, and 49% of them were indeed positives to leptospirosis. In conclusion, *L. icterohaemorrhagiae* and *L. hardjo* were the most common serovars circulating in the cattle population in the Western region in Venezuela between 1998 and 2001, in which several cases were associated with reproductive problems. It was also observed that non-vaccinated animals presented a higher seropositivity

than animals that were vaccinated. This study will allow the establishment of a baseline to compare present and future studies on Bovine Leptospirosis in this region, providing important epidemiological information to be used in improving preventive and control measures against this disease.

Key words: Bovine leptospirosis, seroprevalence, risk factors.

INTRODUCCIÓN

Cada año, las enfermedades infecciosas reproductivas del bovino (*Bos taurus-indicus*), tales como brucelosis, leptospirosis, campilobacteriosis, rinotraqueitis infecciosa, diarrea viral bovina, entre otras, inciden gravemente en la rentabilidad de las explotaciones agropecuarias a nivel mundial [13, 14]. Se destaca entre ellas la leptospirosis bovina [5]. La distribución global de las especies patógenas de leptospirosis es un reflejo de su gran capacidad para adaptarse, tanto al ambiente como a diferentes hospedadores. Las leptospirosis son capaces de infectar a la mayoría de los animales domésticos, aves, algunos anfibios, y al hombre [3]. En el bovino provoca una enfermedad con diferentes manifestaciones, donde en algunos casos se presentará un síndrome clínico de tendencia aguda (infección accidental) caracterizado por inducir abortos, hemoglobiuria e ictericia, así como caída brusca de la producción de leche observándose coágulos de sangre y en algunos casos agalactia [8]. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los bovinos presentarán una enfermedad de tendencia sub-clínica a crónica (infección de mantenimiento), caracterizada por alteraciones de tipo reproductivo: infertilidad, repetición de servicios, nacimiento de crías débiles, entre otros. En cualquiera de los casos esta enfermedad incide negativamente en la rentabilidad de la finca [10].

La forma ideal de realizar el diagnóstico definitivo es mediante el aislamiento de la espiroqueta en medios de cultivos [21, 22, 24]. Sin embargo, la leptospira solo puede ser aislada en sangre u orina durante las fases de leptospiremia y leptospiruria, respectivamente, lo cual ocurre intermitentemente [24]. También el crecimiento lento de estos microorganismos, la facilidad de contaminación de los medios de cultivo y lo complicado del proceso a nivel de laboratorio disminuye la sensibilidad del cultivo de leptospira [1, 22]. Debido a lo anteriormente expuesto, el diagnóstico se realiza principalmente por serología mediante la técnica de Microaglutinación (con sus siglas en inglés, MAT), siendo esta técnica el método de diagnóstico estándar de referencia internacional [3].

Estudios de prevalencia realizados en Venezuela usando MAT, revelan que esta enfermedad es común en la mayoría de las explotaciones ganaderas [2]. El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela (INIA), en la III Reunión de la Red Nacional de Diagnóstico y Control de la Leptospirosis Bovina, en el período comprendido desde 1998 a 2002, reportó haber recibido muestras de 302 fincas de la mayoría de los Estados del país, donde el 76,2% de las explo-

taciones poseían animales positivos a leptospirosis bovina [25]. Durante dicho período, 3.380 muestras fueron procesadas, de las cuales 46% resultaron con títulos seroaglutinantes. En relación a los serovares detectados, *hardjo* fue el más predominante en todos los años, 79,5% para 1998, 70,2% para 1999, 58,4% para el 2001, 67,5% para el 2002; excepto durante el 2000, donde se observó un predominio del serovar *icterohaemorrhagiae* en un 58,9%. El segundo serovar más común en bovinos fue *hebdomadis* [25]. En otros estudios, Ramírez y Rivera [29], reportaron una prevalencia de 60,1% en suero de 384 bovinos ubicados en 32 fincas del municipio Alberto Adriani, estado Mérida, en 1999. Angelosante y col. [4] determinaron que en el año 1999, fincas del municipio Rosario de Perijá, sector 1, estado Zulia, Venezuela, tenían una prevalencia de 21,66% para leptospirosis bovina.

Frente a esta situación, la Universidad del Zulia en su rol de formación de profesionales y consciente de las necesidades de la Nación, inaugura en 1998 en la Facultad de Ciencias Veterinarias la Unidad de Investigación y Diagnóstico de Leptospirosis (UIDL). El objetivo del presente estudio fue presentar un análisis retrospectivo de los resultados serológicos y demás datos epidemiológicos que acompañaron las muestras recibidas y procesadas mediante MAT durante el período 1998-2001 en dicho laboratorio. Esto con la finalidad de establecer una línea base para comparar las seroprevalencias actuales y futuras, aportando al mismo tiempo información epidemiológica que permita el mejoramiento de medidas de prevención y control en contra de la leptospirosis bovina en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el período transcurrido entre 1998 y 2001, la UIDL recibió un total de 1063 muestras de sueros bovinos sospechosos de padecer leptospirosis, pero sólo 819 de ellas fueron incluidas en el presente trabajo ya que poseían información epidemiológica completa. En su mayoría, las muestras recibidas procedieron de los diferentes Municipios que conforman el estado Zulia (n=637), algunos sueros fueron recibidos de Estados vecinos, incluyendo Falcón, Lara, Mérida, Táchira, y Trujillo (n=182). Al momento de recibir las muestras se procedió a registrar la información en una ficha epidemiológica (FIG. 1), lo que permitió obtener datos, tanto de los animales muestreados, como de la explotación.

Procesamiento de las muestras: Técnica de Microaglutinación (MAT)

Los sueros fueron procesados por medio de la MAT, siguiendo recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [24], del INIA y del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rángel" (INHRR). Se utilizó una batería de antígenos vivos de varios serovares de leptospira: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. pomona*, *L. hebdomadis*, *L. gryppotyphosa* y *L. hardjo*; proporcionados por el INHRR.

UNIVERSIDAD DEL ZULIA
 FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
 CATEDRA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
 LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN LEPTOSPIROSIS

N° Protocolo: _____
 Fecha de Recepción: _____
 Remitido por: _____
 Fundo: _____
 Teléfono: _____

*Siga las instrucciones al reverso de la
 planilla si tiene dudas sobre algún dato
 solicitado*

DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS BOVINA

DATOS DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN (FINCA):

1) Nombre: _____ Propietario: _____ Teléfonos: _____
 Dirección (Finca): _____ Municipio: _____
 Parroquia: _____ Sector: _____ Coordenadas _____

DATOS DE LAS MUESTRAS:

3) Tipo de muestras: _____ 4) Suero I: _____ Suero II: _____ Suero III: _____ Otros: _____
 5) Fecha de la toma de muestras: _____ 6) Mantenimiento: _____
 7) Muestras tomadas antes del inicio del suministro de antibióticos: NO SI Cual: _____
 8) Número de Animales Enfermos: _____ 9) Animales existentes: _____

N° muestras	Sexo		Bec	Maut	Nov	V.Prod	V.seca	Toro	¿Vacunas?	Fecha Vacuna.	Tipo Vacuna.
	♀	♂									

9) Prueba Solicitada: _____

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS:

10) Contacto con otros animales enfermos: SI NO Especies: _____
 11) Contacto con material proveniente de abortos: SI NO Características: _____

SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA:

12) Fecha de Inicio de la Enfermedad: _____
 13) Fiebre: NO SI 14) Anorexia: NO SI 15) Debilidad: NO SI
 16) Hemoglobinuria: NO SI 17) Ictericia: NO SI 18) Mastitis: NO SI
 19) ↓ de la producción láctea: NO SI Características de la leche: _____
 20) Abortos: NO SI Fase de la gestación (características): _____
 21) Otros trastornos reproductivos: _____
 22) Trastornos oculares NO SI 23) Trastornos renales: NO SI
 24) Otros: _____

ANEXOS:

25) Fecha de muerte: _____ 26) Necropsias: NO SI Datos: _____

INFORMACIÓN INTERNA:
 Recibido por: _____ Fecha de entrega de Resultados: _____
 Observaciones: _____

Ciudad Universitaria – Núcleo Agropecuario Av. Guajira Maracaibo – Venezuela
 Para cualquier información comuníquese a los Teléfonos 759 61 56/ 0418 605 89 58
 enfermedadesinfecciosas@hotmail.com

FIGURA 1. FICHA EPIDEMIOLÓGICA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA / EPIDEMIOLOGICAL SURVEY FOR DATA COLLECTION AT THE UNIT OF INVESTIGATION AND DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS OF THE UNIVERSITY OF ZULIA.

Procedimiento de la MAT

Prueba de selección preliminar: Cada suero problema fue procesado por duplicado y en diluciones 1:25; 1:50 y 1:100, siendo enfrentados con cada uno de los antígenos (serovares) de referencia procedentes del INHRR e incubados a temperatura ambiente por dos horas. Para cada uno de los serovares de referencia se incluyó un tubo control. Al momento de la lectura con el microscopio de campo oscuro (binocular, modelo Axiolab, Zeiss, Jena, Alemania), se tomó 0,01 mL de cada una de las diluciones previamente descritas para ser evaluadas. Dicha evaluación consistió en la observación de las aglutinaciones de cada una de las diluciones, comparándolas con el antígeno control y clasificándolas según su porcentaje de aglutinación (25; 50; 75 ó 100%).

Determinación de títulos: Todos los sueros que aglutinaron 50% o más, contra uno o varios de los antígenos de referencia, fueron seleccionados para una extensión de títulos. Para ello se realizaron diluciones dobles partiendo de la dilución original del suero 1:25. Luego de diluir el suero, se agregó el mismo volumen de antígeno vivo (0,2 mL) a cada uno de los tubos, obteniéndose las siguientes diluciones finales: 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400 y 1:12800. Si alguno de los sueros presentaba $\geq 50\%$ de aglutinación en la última dilución (1:12800) con cualquiera de los antígenos, se repetía el proceso efectuando diluciones adicionales del suero. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente por dos horas, procediéndose a la lectura.

Lectura e Interpretación de resultados de la MAT

La interpretación de los resultados obtenidos al realizar la MAT se realizó siguiendo una modificación de los criterios diagnósticos descritos en la Guía de Procedimientos para el Diagnóstico y Control de la Leptospirosis en Venezuela [21], tal y como se describe en la TABLA I. Por lo tanto, en el presente análisis se consideró como positivos (animales infectados) a aquellos animales no vacunados aglutinando en la dilución $\geq 1:400$ y a los vacunados que reaccionan a la dilución $\geq 1:800$.

Análisis de los Resultados

La data fue clasificada, organizada y codificada, agrupándose en categorías previamente establecidas (p.e.: vacunación, edad, sexo). Se realizó estadística descriptiva de las diferentes variables mediante el programa estadístico SAS versión 6,0 [33]. Con la finalidad de analizar las posibles asociaciones y el riesgo entre los serovares de mayor casuística y las diferentes variables (edad, sexo, vacunación, y aborto reciente) se calcularon las razones de desigualdad así como la prueba de Ji-cuadrado; usando un valor de P de $\leq 0,05$ para determinar el nivel de significancia estadística [11].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reaccionantes y seropositivos. En la FIG. 2 se presenta el número de muestras procesadas por año durante el período

TABLA I
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS SEROLÓGICOS EN ANIMALES AL REALIZAR LA TÉCNICA DE MICROAGLUTINACIÓN / INTERPRETATION OF SEROLOGICAL RESULTS IN ANIMALS WHEN CARRYING OUT THE MICROAGGLUTINATION TECHNIQUE.

Títulos Serológicos	No Vacunados	Vacunados
Negativos	Negativo	Negativo
1:100	Sospechoso	Negativo
1:200	Sospechoso ^a	Negativo
1:400	Positivo (infección Activa)	Sospechoso ^b
$\geq 1:800$	Positivo (infección Activa)	Positivo (infección Activa)

^aLos anticuerpos detectados pueden ser producto de la vacunación, o de un proceso infeccioso en su fase inicial.

^bLos anticuerpos detectados podrían ser producto del inicio de un proceso infeccioso por *leptospira spp.*, pero también podrían relacionarse a un animal en fase de convalecencia

Fuente: Instituto Nacional de Higiene, modificación de los autores.

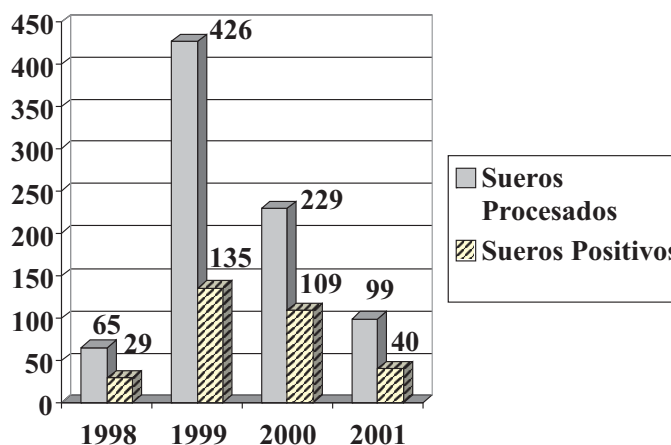


FIGURA 2. NÚMERO DE MUESTRAS PROCESADAS Y ANIMALES SEROPOSITIVOS POR AÑO, SEGÚN LA TÉCNICA DE MICROAGLUTINACIÓN UTILIZADA EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA, EN EL PERÍODO 1998-2001 / NUMBER OF SAMPLES PROCESSED AND SEROPOSITIVE ANIMALS PER YEAR, ACCORDING TO THE MICROAGGLUTINATION TECHNIQUE USED IN THE UNIT OF RESEARCH AND DIAGNOSIS OF LETOSPIROSIS OF ZULIA UNIVERSITY DURING THE PERIOD 1998-2001.

1998-2001, y el total de sueros diagnosticados como seropositivos en cada año. En el año 1998 se procesaron 65 sueros y se obtuvo un 44,62% de positividad. En el año 1999 se procesó el mayor número de muestras (426) pero el porcentaje de positividad disminuyó a 31,69%. Para el año 2000 se procesaron 229 muestras con un 47,59% de positividad. Finalmente,

para el año 2001 se procesaron 99 muestras y se obtuvo un 40,40% de positividad. Del total de sueros procesados durante los 4 años (819) el porcentaje de positividad fue de 38,21%.

De las 819 muestras consideradas en este estudio, 724 (88,4%) fueron seroreaccionantes (es decir presentaron títulos de anticuerpos $\geq 1:100$) al menos uno de los serovares de leptospira examinados; 95 (11,6%) no reaccionaron con ninguno de los serovares (no presentan anticuerpos aglutinantes o seronegativos). De las 819 muestras, 313 (38,2%) resultaron ser positivas a uno o más serovares y 506 (61,8%) resultaron sospechosos o negativos. En el grupo de animales positivos a uno o más serovares (313), el serovar con mayor frecuencia fue *icterohaemorrhagiae* con 154 (49,2%), seguido de *hardjo* con 141 (45,0%).

Distribución de serovares. En la TABLA II se muestra el total de animales por cada serovar que resultó negativo, sospechoso y positivo. Es importante recordar que bajo condiciones naturales es posible que en un mismo animal puedan detectarse anticuerpos aglutinantes a más de un serovar.

Vacunación. Como se muestra en la FIG. 3, según datos de la encuesta epidemiológica, 41,8% sueros (342/819) fueron provenientes de animales no vacunados y 58,2% (477/819) de animales vacunados. Dentro del grupo de los no vacunados 55,6% (190/342) animales resultaron positivos, mientras que dentro del grupo de los vacunados resultaron positivos 25,8% (123/477). Dicha diferencia entre los dos grupos fue estadísticamente significativa ($P < 0,0001$), donde los animales no vacunados eran 3,6 veces más probables de ser seropositivos a leptospira que aquellos animales no vacunados.

Distribución por edad y sexo. De las 819 muestras se logró registrar en la ficha epidemiológica la edad de 144 animales clasificándose dichos animales en tres grupos: 0 a 12 meses (6 animales), 12 a 48 meses (60 animales) y mayores de 48 meses (78 animales). Dentro del grupo 0 a 12 meses, el 100% resultó positivo; en los grupos 12 a 48 meses y mayores de 48 meses, 35% (21) y 46,2% (36) fueron positivos, respectivamente. En relación al sexo, de las 819 muestras recibidas se registró este dato en 567 animales, de los cuales 546 (96,3%) fueron hembras y 21 (3,7%) machos. De los sueros analizados, 194 (62%) hembras resultaron positivas y 11 (3,7%) machos positivos. Debido a que estos datos no presentaron una distribución homogénea entre los grupos, no fue posible realizar un análisis estadístico en relación al sexo o la edad.

Distribución geográfica. En su mayoría (77,78%) las muestras fueron procedentes de los Municipios que conforman el estado Zulia, las restantes (22,22%) provinieron de Estados vecinos (Falcón, Lara, Mérida, Táchira y Trujillo). El Municipio zuliano con el mayor número de muestras procesadas fue Rosario de Perijá (52,01%), seguido de Jesús Enrique Lossada (8,05%) y La Cañada de Urdaneta (4,51%). Este alto número de muestras remitidas de estos Municipios no necesariamente refleja una incidencia mayor de la enfermedad, sino posiblemente es sólo un reflejo de su cercanía a la Unidad de Investigación. Es importante resaltar que con la información recolectada, no es posible realizar un análisis estadístico por zona geográfica a nivel de Estado debido a la heterogeneidad en el número de muestras recibidas por Municipios, y que en algunas circunstancias varias muestras en un Municipio provenían realmente de una sola finca.

TABLA II
BOVINOS POSITIVOS, NEGATIVOS Y SOSPECHOSOS A DIFERENTES SEROVARES DE LEPTOSPIRA DURANTE EL PERIODO 1998–2001 EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIROSIS DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA SEGÚN LA TÉCNICA DE MICROAGLUTINACIÓN / POSITIVE, NEGATIVE AND SUSPECT BOVINE TO DIFFERENT SEROVARS OF LEPTOSPIRA DURING THE PERIOD 1998-2001 IN THE UNIT OF RESEARCH AND DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS OF ZULIA UNIVERSITY ACCORDING TO THE MICROAGGLUTINATION TECHNIQUE.

Serovar	Negativos ($\leq 1:100$)	Sospechosos ($\leq 1:200$ no vacunados / $\leq 1:400$ vacunados)	Positivos ($\geq 1:400$ no vacunados / $\geq 1:800$ vacunados)	Total Animales Muestreados Por Serovar* ¹
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	500 (61,05%)	165 (20,14%)	154 (18,8%)	819 (100%)
<i>L. canicola</i>	711 (86,81%)	68 (8,30%)	40 (12,7%)	819 (100%)
<i>L. pomona</i>	698 (85,22%)	32 (3,90%)	89 (28,4%)	819 (100%)
<i>L. gryppotyphosa</i>	677 (82,66%)	83 (10,13%)	59 (18,8%)	819 (100%)
<i>L. hebdomadis</i>	478 (58,36%)	202 (24,66%)	139 (44,4%)	819 (100%)
<i>L. hardjo</i>	476 (58,11%)	202 (24,66%)	141 (17,2%)	819 (100%)

*1 Nota: Es importante recordar que bajo condiciones naturales es posible que en un mismo animal se puedan detectarse anticuerpos aglutinantes a más de un serovar. Es por ello que los porcentajes son analizados en estudios epidemiológicos en forma individual para cada serovar debido a que cada uno es un agente infeccioso particular.

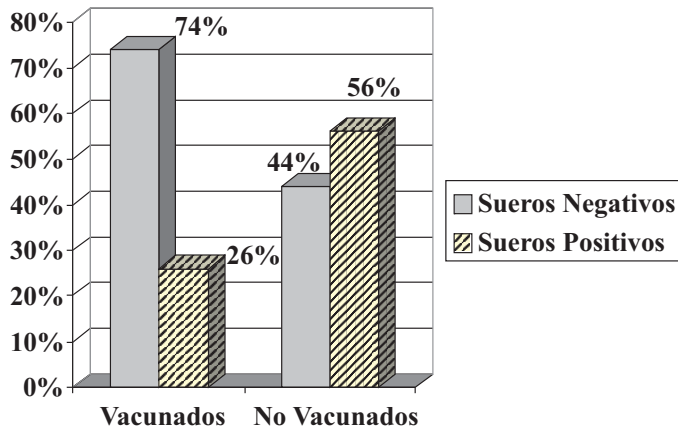


FIGURA 3. PORCENTAJE DE ANIMALES SEROPOSITIVOS Y NEGATIVOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROAGLUTINACIÓN PROCESADOS EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA, DURANTE EL PERÍODO 1998-2001 CONSIDERANDO SU STATUS SEROLÓGICO: VACUNADOS Y NO VACUNADOS / PERCENTAGE OF ANIMALS SEROPOSITIVE AND NEGATIVES BY THE MICROAGGLUTINATION TECHNIQUE PROCESSED IN THE UNIT OF RESEARCH AND DIAGNOSIS OF LETOSPIROSIS OF ZULIA UNIVERSITY, DURING THE PERIOD 1998-2001 CONSIDERING THEIR SEROLOGICAL STATUS: VACCINATED AND NOT VACCINATED.

Signos clínicos. En relación a los signos clínicos, la información recolectada por cada animal en forma individual es escasa; en muchos casos, la encuesta epidemiológica se realizó por grupo de muestras remitidas por finca y no por muestras individuales. Por lo tanto, sólo 270 muestras poseían datos específicos del individuo remitido incluyendo signos clínicos. Entre éstas, 266 (98,5%) reportaron abortos como la principal causa para que el veterinario o el productor sospechara de leptospirosis bovina y sólo 4 (1,5%) animales se relacionaron con reportes de vacas con nacimientos de crías débiles. Al realizar la prueba MAT se encontró que de los 266 casos de abortos referidos al laboratorio con sospecha de leptospirosis bovina, 132 (49,5%) animales resultaron positivos a uno a más serovares de leptospira.

Durante el periodo 1998-2001 se recibieron y procesaron con la prueba MAT un total de 819 muestras de bovinos en el laboratorio de Investigación y Diagnóstico de Leptospirrosis. Se observó que 313 (38,2%) animales resultaron positivos a uno o más serovares de leptospira, siendo la *L. icterohaemorrhagiae* y *hardjo*, 49,2 y 45,0%, respectivamente, los serovares más frecuentemente reportados. El porcentaje de positividad encontrado coincide con trabajos realizados en Venezuela durante los años 1984-1988 donde se reporta un 38% de seropositividad en bovinos [27] y resulta aproximado al 46% reportado por el INIA durante el período 1998-2002 [25]; sin embargo, se observa una disminución comparado con el periodo 1969-1974, donde se indicaba un 52,20% de positividad [17].

También es importante resaltar que, del total de animales vacunados (342), sólo el 25,8% resultó ser positivo a leptospirosis, contrastando con un 55,6% de positividad en el total de animales no vacunados (477).

El porcentaje de animales seroreactores a los seis serovares utilizados en la prueba MAT es alto (> 30% por serovar). Estos bovinos son seroreaccionantes, es decir poseen anticuerpos circulantes, contra uno o varios serovares, como consecuencia de una vacunación o a un contacto reciente con uno o varios serovares de *leptospira* spp. También es posible que un animal pueda reaccionar y/o resultar positivo a más de un serovar debido a que existe la posibilidad de reacciones cruzadas con otros serovares [5, 21]. Este fenómeno de seroreacción y/o seropositividad a más de un serovar, tal y como se observa en este estudio, debe tenerse siempre en cuenta cuando se interpreten los resultados de la prueba de MAT. Por lo tanto, si al realizarse la prueba de MAT más de un serovar da títulos los suficientemente altos para ser considerados positivos (signo de infección), el serovar con los títulos más altos deberá ser considerado como el serovar causante del cuadro infeccioso.

Los tres serovares con mayor seropositividad en este estudio fueron *L. icterohaemorrhagiae*, *L. hardjo* y *L. hebdomadis*, respectivamente, lo cual coincide con los reportes del INIA [25], quién los identifica como los principales agentes causales de leptospirosis bovina en Venezuela durante el período 1998-2001. Sin embargo, es importante hacer notar que para el INIA el serovar *hardjo* es quién causa el mayor porcentaje de infecciones en bovinos [27]. Igualmente, los resultados de este trabajo también coinciden con estudios realizados en otros países; por ejemplo en Estados Unidos, Canadá y Australia se reportó la presencia de anticuerpos contra uno o más serovares de leptospira desde un 39% hasta un 60,8% de las muestras analizadas, siendo *hardjo* el serovar predominante en todos estos países [19, 20, 26, 30]. En cuanto a Latinoamérica, México y Brasil reportaron una seroprevalencia de 62,8 y 47,63%, respectivamente, resultando nuevamente el serovar *hardjo* como el más frecuente [23, 32].

El hallazgo de *L. icterohaemorrhagiae* en el presente estudio como uno de los más prevalentes, reportado también por el INIA y el INHRR en humanos [25], indica que este serovar ha ido ganando espacio en los rebaños bovinos de Venezuela, esto podría ser consecuencia de la alta población de roedores y animales silvestres que tienen acceso a las explotaciones ganaderas del país. Las ratas (*R. rattus*) son consideradas el principal reservorio de este serovar, aunque éstas no desarrollan la enfermedad clínicamente, se convierten en potenciales transmisores del agente causal a los bovinos [3, 21, 28].

Como se describió anteriormente se encontraron una gran cantidad de animales dentro del rango de los sospechosos con cada uno de los serovares (*hardjo*: 24,6%, *hebdomadis*: 24,6% *icterohaemorrhagiae*: 20,14%, *gryppotyphosa*:

10,13%, *canicola*: 8,3% y *pomona*: 3,9%). Este hecho dificulta el diagnóstico de laboratorio, ya que es posible que una gran cantidad de los sueros sospechosos sean producto de la vacunación, del inicio de la infección o de la convalecencia [21, 22]; por lo que en estos casos se requiere una segunda muestra para definir la curva de anticuerpos que permita emitir un diagnóstico definitivo. Lamentablemente, el manejo adicional para la toma de la segunda muestra (suero convaleciente) y los gastos que acarrea su procesamiento, limita muchas veces la realización de esta segunda prueba.

Al comparar el grupo de animales vacunados contra los no vacunados, se observó que los animales no vacunados eran 3,6 veces más probables de ser seropositivos a leptospira, observándose así la disminución en la proporción de seropositivos a casi la mitad en el grupo de animales vacunados. En base a estos resultados se deduce que, la vacunación aparentemente influye de forma favorable en la protección de los bovinos contra la leptospirosis. Estos datos confirman resultados de estudios anteriores donde se demuestra que la vacunación protege contra la colonización e infección por leptospira en diferentes circunstancias [6, 7, 9, 16, 18]. Por ejemplo, Hancock y col. [16] evaluaron la eficacia de una vacuna con los serovares *hardjo* y *pomona*, encontrando que sólo 2,7% de los animales vacunados presentó leptospiruria, contrastando con un 58,5% en los animales no vacunados. Así mismo, Bolin y Alt, en los años 2001 [6] y 2003 [7], determinaron la efectividad de vacunas monovalentes para evitar la colonización de animales expuestos a *L. hardjo*. Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente investigación deben ser interpretados con precaución dado que este estudio no fue diseñado, ni posee los controles y covariables adecuadas, para hacer extrapolaciones mayores que las aquí indicadas. Finalmente, es importante resaltar que la mayor proporción de sueros positivos en animales no vacunados indica que en todos estos casos hubo contacto con leptospira de campo y no por exposición a cepas vacúnales.

En relación al sexo, se observa que el ingreso de muestras provenientes de machos fue inferior, sólo un 3,7% de las muestras recibidas, a diferencia de las muestras provenientes de hembras bovinas que abarcaron un 96,3%. Esta distribución concuerda con la relación hembra: macho que existe en la mayoría de las explotaciones ganaderas de Venezuela, en donde no se implementa la inseminación artificial, aunque no fue posible establecer diferencias estadísticas entre estas dos variables por la disparidad entre el número de muestras. Lo anteriormente expuesto refleja que, usualmente no se remiten muestras al laboratorio en búsqueda de leptospirosis en machos bovinos, en su mayoría las muestras remitidas tienen historia de hembras presentando abortos, olvidándose que los machos infectados pueden convertirse en portadores de la enfermedad, especialmente cuando están infectados con el serovar *hardjo* [3, 5, 12, 15, 26, 31].

La principal causa identificada por el veterinario y/o ganadero para remitir una muestra, sospechando de leptospiro-

sis, es el aborto en hembras bovinas, lo cual se refleja al observar que de 270 animales, el aborto fue el común denominador en 266 de los casos, sólo en cuatro animales se refirió que el nacimiento de crías débiles hacía sospechar de leptospirosis. Dentro del grupo de los 266 animales que presentó abortos, se encontró que el 49,5% resultó positivo a leptospirosis, por lo que en un 50,5% de dichos abortos es posible que fueran causados por otros agentes infecciosos (*Brucella*, *Neospora*, *DVB*, *Campylobacter*, etc.), causas físicas (p.e. traumas), o desbalances hormonales; entre muchas otras posibilidades. También es importante resaltar que la leptospirosis bovina ocasiona otras alteraciones desde el punto de vista reproductivo, tales como: muerte embrionaria precoz, repetición de servicios (vaca repetidora), nacimiento de crías débiles, todos estos signos reportados por varios autores. [4, 12, 13].

CONCLUSIONES

- De los sueros remitidos a la UIDL, 38% resultó seropositivo lo cual es indicativo de un proceso infeccioso activo, relacionado principalmente a *L. icterohaemorrhagiae*, *L. hardjo*, y/o *L. hebdomadis*; siendo el aborto el principal signo clínico reportado en estos animales.
- A diferencia de estudios anteriores, se observó un cambio en el serovar predominantemente diagnosticado en bovinos, pasando al primer lugar *icterohaemorrhagiae* desplazando a *hardjo*, el cual ha sido el serovar tradicionalmente reportado como el más común en la región y el país.
- La vacunación aparentemente provee un efecto protector contra la leptospirosis bovina, donde animales no vacunados eran 3 veces más probables de ser seropositivos (infectados). Dicha asociación amerita estudios adicionales para confirmar este aparente efecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADLER, B.; FAINE, S.; CHRISTOPHER, W.; CHAPPEL, R. Development of an improved Selective Medium for Isolation of Leptospirosis from Clinical Material. **Vet. Microbiol.** 12:377-381. 1986.
- [2] ALFARO, C.; ARANGUREN, Y.; CLAVIJO, A.; DÍAZ, C. Prevalencia Serológica de Leptospirosis en Ganado Doble Propósito del noreste de Monagas, Venezuela. **Zoot. Trop.** 22(2):117-132. 2004.
- [3] ALONSO-ANDICOBERRY, C.; GARCÍA, F.; ORTEGA, L. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión). **Invest Agr: Prod. Sanid. Anim.** 16(2):205-225. 2001.
- [4] ANGELOSANTE, G.; PÉREZ-BARRIENTOS, M.; D'POOL, G.; GARCÍA, A.; SÁNCHEZ, E. Seroprevalencia de Leptospirosis Bovina en el Sector 1 del Municipio

- Rosario de Perijá del Estado Zulia, Venezuela. **Multi-cien.** 1(2):129-139. 2001.
- [5] BOLIN, C. Diagnosis and control of bovine leptospirosis. **Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference.** Reno, Nevada. 155-160 pp. 2003.
- [6] BOLIN, C.; ALT, D. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **Am. J. Vet. Res.** 62(7):995-1000. 2001.
- [7] BOLIN, C.; CASSELLS, J.; ZUERNER, R.; TRUEBA, G. 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(10):1639-1643. 1991.
- [8] BOLIN, C.; DAVID, P. Use of a monovalent leptospira vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **Am. J. Vet. Res.** 62(7):995-1000. 2001.
- [9] BOLIN, C.T., A.; HANDSAKER, A.; FOLEY, J. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis infection of pregnant cattle. **Am. J. Vet. Res.** 50(1):161-165. 1989.
- [10] CORBEIL, L.; R, B. Immunity to bovine reproductive infections. **Vet. Clin. of North Amer: Food Anim. Pract.** 17(3):567-583. 2001.
- [11] DANIEL, W. **Biostatistics.** A Foundation for Analysis in the Health Sciences, 6th Ed. United States of America: John Wiley & Sons, Inc. 503-537 pp. 1995.
- [12] DAVID, P.; ZUERNER, R.; BOLIN, C. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 219(5):636-639. 2001.
- [13] GIVENS, D.M. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. **Theriogenol.** 66:648-654. 2006.
- [14] GIVENS, D.M.; MARLEY, M.S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenol.** 70:270-285. 2008.
- [15] GUITIAN, F.; GARCIA-PEÑA, F.; OLIVEIRA, J.; SANJUAN, M.; YUS, E. Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farmers with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. **Vet. Microbiol.** 80:275-284. 2001.
- [16] HANCOCK, G. W., C.; KOTIW, M.; ALLEN, J. The long term efficacy of a hardjo-pomona vaccine in preventing leptospirosis in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **Aust. Vet. J.** 61(2):54-56. 1984.
- [17] JELAMBI, F.; PEÑA, A.; PADILLA, C.; IVANOV, N.; POLANCO, J. La leptospirosis de los animales domésticos en Venezuela. **Vet. Trop.** 1(1):63-71. 1976.
- [18] LITTLE, T. H. S.; BROUGHTON, E.; SEAWRIGHT, D. Control of *Leptospira hardjo* infection in beef cattle by whole-herd vaccination. **The Vet. Rec.** 131(5):90-92. 1992.
- [19] MILLER, D.; WILSON, M.; BERAN, G. Survey to estimate prevalence of *Leptospira Interrogans* infection in mature cattle in United States. **Am J Vet Res.** 52(11):1761-1765. 1991.
- [20] MILNER, A.; WILKS, C.; CALVERT, K. The prevalence of antibodies to members of *Leptospira Interrogans* in cattle. **Austr. Vet. J.** 56:327-330. 1980.
- [21] MINISTERIO DE SALUD Y DESARROLLO SOCIAL. MINISTERIO DE LA PRODUCCIÓN Y EL COMERCIO. SISTEMA AUTONOMO DE SANIDAD ANIMAL (SASA). INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE "RAFAEL RANGEL". Guía de Procedimientos para el Diagnóstico y Control de la Leptospirosis en Venezuela. Caracas, Venezuela. 45 pp. 2003.
- [22] OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Leptospirosis. En: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008.** Chapter 2.1.9. 251-264 pp. 2008.
- [23] OLIVEIRA, A. A. M. R.A.; PEREIRA, G.C.; LANGONI, H.; SOUZA, M.I.; NAVAGANTES, W.A.; SA, M.E. Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns Municipal District, Pernambuco State, Brazil. **Onderstepoort J. Vet. Res.** 68(4):275-279. 2001.
- [24] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Leptospirosis. **Manual de Métodos para el Diagnóstico de Laboratorio.** Nota técnica. 30: 46. 1987.
- [25] PLAZA, N. Situación de la leptospirosis animal en Venezuela, años 1998 - 2002. En: Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", UCV. **III Reunión de la red Nacional de Diagnóstico y Control de la Leptospirosis en Venezuela.** Caracas, Venezuela, 15-16 pp. 2003.
- [26] PRESCOTT, J.; MILLER, R.; NICHOLSON, V.; MARTIN, S.; LESNIK, T. Seroprevalence an association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontario. **Can J. Vet. Res.** 52:210-215. 1988.
- [27] MÁRQUEZ-QUIVERA, N.; FOSSI, L. La leptospirosis como una de las principales enfermedades reproductivas de los bovinos de carne de Venezuela. **I Taller Regional de la Leptospirosis Bovina.** Asociación de Ganaderos Alberto Adriani (ASODEGAA). Mérida, Venezuela. 18 pp. 1996.

- [28] RADOSTITS, O.; GAY, C.; BLOOD, D.; HINCHCLIFF, K. W. **Medicina Veterinaria**. 9a Ed. Editorial Mc Graw Hill. 1150-1168pp. 2001.
- [29] RAMÍREZ, M.; RIVERA, S. Seroprevalencia de Leptospirosis Bovina en relación a los Factores de Riesgo en el Municipio Alberto Adriani, estado Mérida, Venezuela. **Rev. Científ. FCV - LUZ**. IX(5):418-426. 2001.
- [30] RICHARDSON, G.; SPANGLER, E.; MACAULAY, B. A serological survey of four *Leptospira* serovars in dairy cows on Prince Edward Island. **Can Vet. J.** 36:769-770. 1995.
- [31] SANDERSON, M.; GNAD, D. Biosecurity for reproductive diseases. **Vet. Clin. Food Anim.** 18:79-98. 2002.
- [32] SEGURA-CORREA, V.; CALDERON, S.; SEGURA-CORREA, J. Seroprevalence and risk factors for leptospiral antibodies among cattle in the state of Yucatan, Mexico. **Trop. Anim. Health and Prod.** 35:293-299. 2003.
- [33] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. SAS, 6th Ed. Ver. 6.04. North Carolina, USA. 584 pp. 1986.