

# PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE UNA BACTERINA CONTRA LA LEPTOSPIROSIS BOVINA

## PRODUCTION AND SEROLOGIC EVALUATION OF A BACTERIN AGAINST BOVINE LEPTOSPIROSIS

Edna Sánchez C<sup>1</sup>, Microb, Benito Gutiérrez<sup>1</sup>, MV, Cindy Fernández L<sup>2</sup>, Microb, Janeth Arias P<sup>2\*</sup>, M.Sc.

<sup>1</sup>Laboratorios Limor de Colombia. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, <sup>2</sup>Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial, Departamento de Microbiología. Bogotá, D.C., Colombia \*Correspondencia: jdcarias@javeriana.edu.co

Recibido: Abril 15 de 2007; Aceptado: Noviembre 12 de 2007

### RESUMEN

**Objetivo.** Producir una bacterina contra leptospirosis bovina. **Materiales y métodos.** La producción de la bacterina se realizó a partir de cultivos de *L. pomona*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjobovis*, *L. hardjoprajitno*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. canicola* con concentraciones entre  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^{10}$  células/ml. Las leptospiras se inactivaron con formol y se adsorbieron en hidróxido de aluminio para formular la vacuna. La concentración final de cada serovar fue de  $1 \times 10^8$  Leptospiras/ml. Para realizar la evaluación serológica del producto biológico, se inmunizó una población de 20 terneros sanos los cuales fueron sangrados antes y después de la vacunación para realizar titulaciones de los sueros por medio de la técnica de microaglutinación y de esta forma determinar la producción de anticuerpos generada a causa de la bacterina. **Resultados.** El serovar que mayor título de anticuerpos produjo fue *L. icterohaemorrhagiae*, seguido por *L. canicola*. La serología realizada 15 días después de la revacunación fueron los que presentaron mayor número de anticuerpos para todos los serovares, excepto para *L. grippotyphosa* que fue el único que no estimuló la producción de anticuerpos en los animales vacunados. **Conclusiones.** La bacterina fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral en los bovinos, sin embargo, la cepa *L. grippotyphosa* no fue inmunógena comparada con los demás serovares que hicieron parte de la vacuna.

**Palabras clave:** Leptospira, bovinos, bacterina, vacuna.

### ABSTRACT

**Objective.** To produce a bacterin against bovine leptospirosis. **Materials and methods.** The production of bacterin was made using the serovares: *L. pomona*, *L.*

*grippotyphosa*, *L. hardjobovis*, *L. hardjoprajitno*, *L. icterohaemorrhagiae* and *L. canicola* with concentrations between  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^{10}$  cells/ml. Leptospiras were immobilized with formaldehyde and adsorption of aluminum hydroxide to formulate the vaccine. Final concentration of each serovar was of  $1 \times 10^8$  Leptospiras/ml. A population of 20 healthy calves bleeding before and after vaccination was immunized to analyze serum evaluation of the biological product to make titrations of serums by means of micro-agglutination technique and this way to determine antibodies production generated by bacterin. **Results.** *L. icterohaemorrhagiae* was the serovar with higher titres of antibodies followed by *L. canicola*. Serums from bleeding made 15 days before revaccination were those with higher number of antibodies for all serovars except for *L. grippotyphosa* that was the only one that did not stimulate antibodies production in vaccinated animals. **Conclusions.** The bacterin was able to induce a humoral response in bovines, however, *L. grippotyphosa* was not immunogen compared with other serovars that participated in the vaccine.

**Key words:** Leptospira, bovines, bacterin, vaccine.

## INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una de las zoonosis más difundidas en el mundo; constituye un grupo de enfermedades bacterianas que determinan una infección aguda generalizada. De manera primaria, es una enfermedad de animales salvajes y domésticos; los humanos son infectados ocasionalmente a través de contactos directos o indirectos con animales, y con aguas contaminadas, a través de las abrasiones en la piel o de las mucosas (1, 2).

Las leptospiras patogénicas pertenecientes a la especie *Leptospira interrogans*, a la cual se le conocen más de 200 serovares; son los microorganismos causales de la enfermedad, parásitos primarios de vertebrados distintos del ser humano, como roedores, perros, cerdos, bovinos y mapaches, en los cuales las bacterias, persisten en la forma de una infección renal asintomática permanente (2, 3).

Las leptospiras son bacterias Gram negativas, helicoidales, flexibles y delgadas; la parte terminal de la célula

puede aparecer en forma de gancho. Su longitud oscila entre 6 - 20 mm y su diámetro entre 0.1 - 0.2mm (4,5).

Las pérdidas por leptospirosis están caracterizadas principalmente por abortos, infertilidad, baja productividad y muerte (6). Debido al desconocimiento generalizado que se tiene sobre la Leptospirosis y a la deficiencia en las medidas de control, ésta es una de las enfermedades bovinas que más ha ganado terreno en Colombia. De acuerdo con los diagnósticos del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), *L. hardjo* es la serovariedad más frecuente en Colombia, seguida por *L. pomona*. El porcentaje total de prevalencia en el país, para *L. hardjo* es del 27% (7). En el año de 1965 se comprobó por aislamiento la presencia de *Leptospira spp.*, en bovinos, pero la leptospirosis sólo se diagnosticó hasta 1976; aunque la divulgación e investigación de la leptospirosis bovina tomó importancia 4 años después. Inicialmente la mayor importancia se enfatizó en los perros debido a la relación más frecuente con la salud pública (7, 8).

La leptospirosis está ampliamente distribuida en el ganado de carne en las áreas tropicales de Colombia. La transmisión de Leptospirosis es relativamente más importante en trópicos húmedos que en los climas medio o frío, debido a que la sobrevivencia de las leptospirosis fuera del huésped se prolonga bajo condiciones calientes y húmedas (9).

Evidencias serológicas y aislamientos realizados indican que *L. hardjo* tiene importancia epidemiológica en los bovinos productores de carne de los Llanos Orientales de Colombia, donde la prevalencia es del 63.5%, menor a la que se presenta en hatos del Valle del Cauca (80.9%) y la Costa Atlántica (89.1%) (9,10). La prevalencia de leptospirosis en Colombia ha presentado las siguientes cifras para *L. hardjo*: el 32.8% en la región del Caribe, en el Piedemonte llanero se halló una positividad del 24.8%, seguido por la región Andina que presentó un porcentaje de 14.4. El porcentaje promedio total para el país fue de 21.7% (7, 10).

Otros estudios realizados en ganaderías colombianas muestran al serovar *hardjo* como el de mayor prevalencia (32%), seguido por *L. icterohaemorrhagiae* (18.22), *L. pomona* (9.6%), *L. canicola* (8.5%) y *L. grippotyphosa*. Este orden de prevalencia y sus cifras varían considerablemente de una zona ganadera a otra pero el serovar *hardjo* siempre es el de mayor prevalencia para la ganadería colombiana. Es así como por ejemplo en Córdoba y áreas adyacentes de Sucre y Antioquia la prevalencia individual más alta corresponde a *hardjo* (37.9%), *L. grippotyphosa* (16.3%), *L. icterohaemorrhagiae* (13.2%), *L. pomona* (9.0) y *L. canicola* (11 - 13).

La vacunación se ha ido generalizando como medida preventiva contra la leptospirosis y es el método más eficaz para controlar la enfermedad en aquellas

zonas endémicas que lo ameritan. En el país, las vacunas contra la leptospirosis son importadas. El desarrollo de una bacterina antileptospirosis permitiría con cepas reconocidas nacionalmente, controlar el problema y poder suministrar un producto para controlar uno de los problemas más importantes que afecta el sistema reproductivo de la ganadería nacional. Con el control de la enfermedad se aspira a aumentar el porcentaje de preñez y fertilidad en aquellos hatos y regiones donde la leptospirosis es causa de baja productividad y en las regiones donde aún no se ha presentado, ayudaría a inmunizar la ganadería y prevenir la aparición de futuras epidemias (12).

El objetivo de este estudio fue producir una bacterina contra la leptospirosis bovina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio de estudio.** El estudio se realizó en Laboratorios Limor Colombia, un análisis de tipo bifactorial evaluó, la variable de interés, que para este caso específico fue el promedio de los títulos obtenidos frente al posible efecto de factores que incidieron en esta respuesta, es decir el tipo de serovariedad y título durante la experimentación.

**Elaboración de la bacterina.** Se probaron dos medios de cultivo diferentes, "Medio A" y "Medio B". El medio EMJH, fue modificado por incremento en la concentración de Tween, suplementado con suero de conejo o suero de ternera al 2% y albúmina sérica bovina. Los medios fueron enriquecidos con Vit. $B_2$  y  $B_{12}$  para estimular el crecimiento (14). Se cultivaron los 6 serovares en los dos medios empleando igual volumen de inóculo e iguales condiciones de incubación. Cada uno de los 6 serovares

de *L. interrogans* (*L. hardjobovis*, *L. hardjoprajitno*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa* y *L. canicola*) provenientes del Centro Panamericano de Zoonosis (Tabla 1). Se cultivaron por separado en 10 ml del medio líquido "A", a pH de 7.2 +/- 0.2 y temperatura controlada de 30°C, durante 5 a 10 días en condiciones de aerobiosis y agitación. Luego se escaló, teniendo en cuenta los mismos parámetros, hasta que se obtuvo un volumen final de 500ml.

Las bacterias fueron retiradas del cultivo, una vez lograda la concentración requerida ( $1 \times 10^8$  células/ml), evaluada por dos métodos diferentes: turbidez, a través del nefelómetro de MacFarland y mediante una adaptación de la técnica de Reed y Muench, para titulaciones de virus empleando la dosis letal 50 (DL50) (15). Se realizaron diluciones de los cultivos con sus dos réplicas, verificando la presencia de leptospiras en estas después de los períodos de incubación. Los resultados se registraron en una tabla similar a la utilizada por el método de Reed y Muench (15) y finalmente se realizó titulación de los cultivos.

#### **Adsorción al hidróxido de aluminio.**

Se realizaron tres ensayos con el hidróxido de aluminio a concentraciones de 1.25 mg/ml para verificar la capacidad para adsorber las leptospiras. Para esto, se tomó una muestra de cada uno de los cultivos y se les adicionó hidróxido de aluminio, se realizaron titulaciones de los cultivos, utilizando el método de titulación de Reed y Muench (15). Con los datos obtenidos de las titulaciones se obtuvo el porcentaje de adsorción del hidróxido para cada uno de los cultivos.

**Inactivación y formulación.** A cada uno de los cultivos, se les realizó una prueba de pureza y esterilidad mediante siembra en caldo tioglicolato y caldo Saboreaud, a fin de verificar la ausencia de agentes contaminantes. Luego que

las pruebas de pureza fueron satisfactorias, se inactivaron los cultivos, utilizando formaldehído a la concertación del 0.5% (v/v). Para la preparación final de la bacterina, los cultivos inactivados con formaldehído de los diferentes serovares se distribuyeron junto con el hidróxido de aluminio en un volumen de 2ml, teniendo en cuenta la concentración de los cultivos para que cada dosis correspondiera con la formulación y concentración de leptospiras deseada ( $1 \times 10^8$  células/ml).

La esterilidad de la bacterina se verificó a través de siembras en los medios tioglicolato, agar sangre, BHI, Saboreaud, Tarozzi. La evaluación de la inocuidad del producto se realizó tanto "*in vitro*", por medio de siembras en el medio de producción y posterior verificación de la ausencia de leptospiras por observaciones al microscopio de campo oscuro, como "*in vivo*", por vacunación subcutánea de la bacterina experimental en hámster.

#### **Evaluación serológica de la bacterina.**

Para la evaluación de la bacterina experimental, se emplearon 20 bovinos raza Cebú, de 6 meses de edad, sanos y sin vacunar. Para detectar el nivel de anticuerpos inducidos por la inmunización de la vacuna producida, se recolectaron muestras de sangre de los terneros antes de la vacunación (sangría 1). Cumplidos 30 días de la primera vacunación, se les suministró la segunda dosis (2ml) y se realizó la segunda sangría, 15 y 45 días después se realizó la tercera y cuarta. Los niveles de anticuerpos presentes en los sueros de los bovinos inmunizados con la bacterina, fueron medidos mediante titulaciones utilizando la técnica de microaglutinación MTA (16).

**Análisis estadístico de los datos.** Para el diseño experimental, se utilizó la evaluación serológica de la bacterina experimental mediante el Análisis

Bifactorial de efectos fijos completamente aleatorizado (17, 18). Para esto, se plantearon dos hipótesis:

$H_{01}$ :  $\mu_{\text{sangría 1}} = \mu_{\text{sangría 2}} = \mu_{\text{sangría 3}}$

Donde:  $H_{01}$ : Por lo menos un promedio de titulación es diferente al variar la fecha de la sangría (revacunación).

Interpretación. Esta hipótesis supone que el promedio de titulaciones son iguales al variar la fecha de la sangría, (revacunación).

$H_{02}$ :  $\mu_{\text{serovar1}} = \mu_{\text{serovar2}} = \mu_{\text{serovar3}} = \mu_{\text{serovar4}} = \mu_{\text{serovar5}} = \mu_{\text{serovar6}}$

$H_{12}$ : Por lo menos un serovar es distinto al variar la fecha de sangría (revacunación).

La interpretación de  $H_{02}$  es que todos los títulos de los serovares son iguales aún variando las dosis de vacunación.

Estas hipótesis se probaron mediante el análisis de varianza, los datos obtenidos

del análisis de varianza se insertaron en el paquete estadístico de Scheffé, para calcular el valor P. Las hipótesis  $H_{01}$  y  $H_{02}$ , fueron rechazadas cuando  $p < 0.5$ .

## RESULTADOS

**Elaboración de la bacterina.** Todos los cultivos de los serovares alcanzaron la concentración de  $1 \times 10^8$  células/ml y algunos sobrepasaron este número de leptosiras (Tabla 1). Las concentraciones obtenidas según el nefelómetro de MacFarland fueron de  $3 \times 10^8$  células/ml para cada uno de los serovares cultivados. Los resultados de los ensayos con el hidróxido de aluminio  $Al(OH)_3$ , se muestran en la tabla 2.

### Evaluación serológica de la bacterina.

El análisis de varianza y el estadístico de Scheffé condujeron al rechazo de las hipótesis nulas y al mismo tiempo a la aceptación de las hipótesis alternas. Los promedios de títulos de anticuerpos en los bovinos, variaron con la fecha de sangrado al igual que con el tipo de serovar.

**Tabla 1.** Títulos de los serovares

Serovar	Título (Leptospiras/ml)
<i>L. pomona</i>	$1 \times 10^{10}$
<i>L. grippotyphosa</i>	$1 \times 10^{9.2}$
<i>L. canicola</i>	$1 \times 10^{8.8}$
<i>L. hardjoprajitno</i>	$1 \times 10^{8.7}$
<i>L. hardjobovis</i>	$1 \times 10^{8.65}$
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	$1 \times 10^8$

**Tabla 2.** Titulaciones de *Leptospira* con hidróxido de aluminio.

Serovares de <i>Leptospira interrogans</i>	Sobrenadante	Precipitado
<i>L. pomona</i>	$10^{4.6}$	$10^{10.6}$
<i>L. grippotyphosa</i>	$10^{4.7}$	$10^{11.3}$
<i>L. hardjoprajitno</i>	$10^5$	$10^{10.3}$
<i>L. hardjobovis</i>	$10^{3.5}$	$10^{10.2}$
<i>L. canicola</i>	$10^{5.2}$	$10^{10.6}$
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	$10^4$	$10^{11}$

Los títulos de las sangrías 1, 2 y 4 fueron estadísticamente iguales, por el contrario la sangría 3 fue la única diferente estadísticamente respecto a las otras sangrías, es decir, a los 15 días después de la revacunación el promedio de reactivos aumentó considerablemente (Tabla 3).

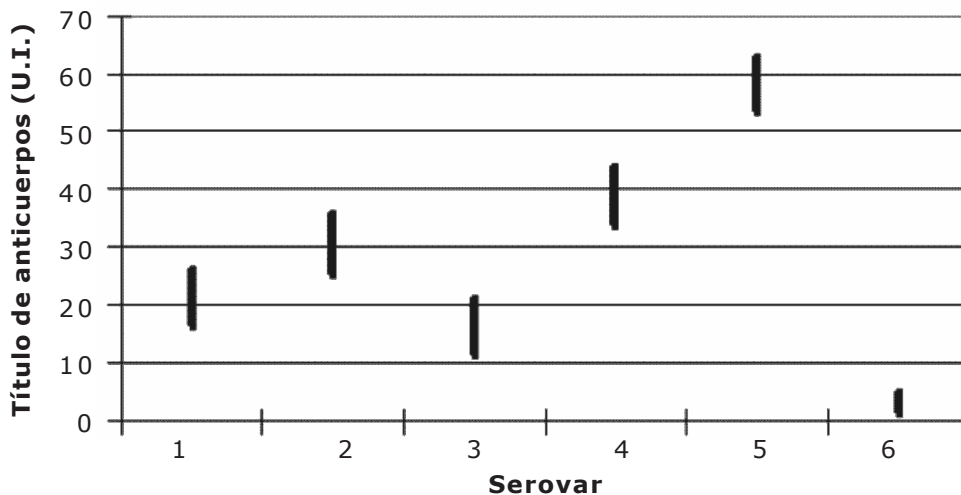
Por otro lado, los títulos fueron diferentes para cada serovar. Como se observa en la figura 1, el serovar que presentó mayor título de anticuerpos fue *L. icterohaemorrhagiae*. En esta figura

también se puede observar que no hubo diferencia estadística entre los títulos de anticuerpos de este serovar y *L. canicola* pues sus intervalos se solapan.

El serovar 2 *L. hardjoprajitno* produjo menos (Figura 1) títulos que *L. canicola*, aunque fueron estadísticamente iguales. *L. hardjobovis* (serovar 1) y *L. pomona* (serovar 3) presentaron títulos muy parecidos y aunque el serovar 2 tuvo niveles de titulación más altos, la diferencia no fue significativa.

**Tabla 3.** Títulos promedio de los serovares de *Leptospira interrogans*, obtenidos durante las diferentes sangrías.

Sangría	Promedios de títulos por cepas					
	<i>L. hardjobovis</i>	<i>L. hardjoprajitno</i>	<i>L. pomona</i>	<i>L. canicola</i>	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	<i>L. grippotyphosa</i>
1	2.5	2.5	1.25	1.25	5	0
2	2.5	2.5	3.75	7.5	15	0
3	20	35	21.25	122.5	170	0
4	20	62.5	18.75	15	22.5	3.75



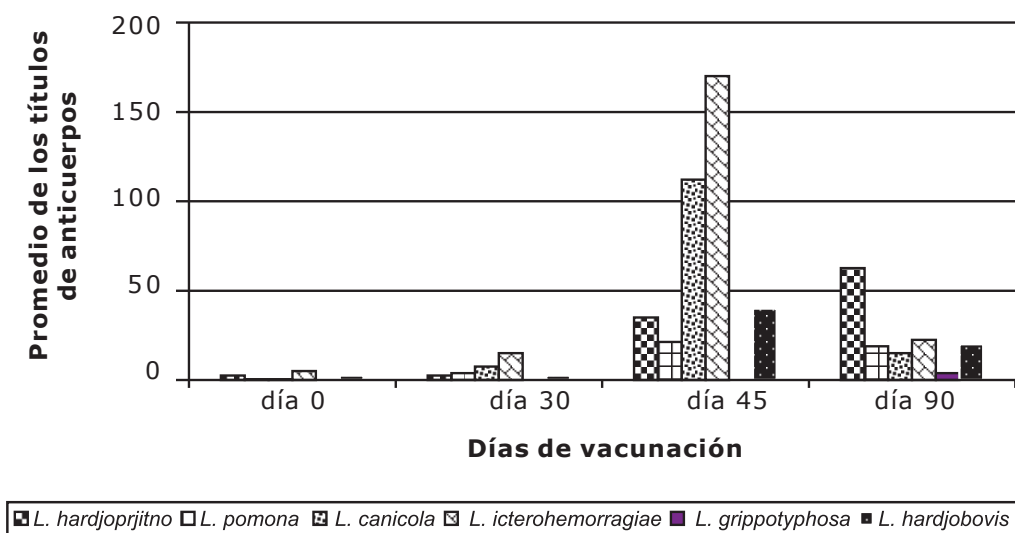
**Figura 1.** Serovares y medias de los títulos de anticuerpos. 1. Serovar arjobovis, 2. Serovar hardjoprajitno, 3. Serovar Pomona, 4. Serovar canicola, 5. Serovar icterohaemorrhagiae, 6. Serovar grippotyphosa.

El serovar 6 (*L. grippotyphosa*) fue el que menos títulos de anticuerpos desarrolló en los bovinos; los serovares 1 y 3 fueron iguales estadísticamente (Figura 1).

*L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae* arrojaron resultados de titulación parecidos en los que se observó inicialmente ausencia de títulos, pero estos progresaron con el tiempo (número de sangría) y descendieron rápidamente en la cuarta sangría (Tabla 3). Por el contrario la titulación para *L. hardjoprjitno* en los bovinos vacunados no presentó variación sino hasta la tercera sangría, y en la cuarta se observó un aumento notorio de anticuerpos, es decir, que no se alcanzó a registrar el descenso de los títulos (Tabla 3). Para el caso de *L. hardjobovis* en los bovinos vacunados, no se evidenciaron variaciones antes de la vacunación y un mes después de esta. Los títulos aumentaron en la sangría 3, 45 días después de la vacunación y 15 días después de la revacunación; pero en la cuarta sangría este nivel se mantuvo sin cambio en el promedio de anticuerpos. El título de anticuerpos para *L. pomona* a lo largo de las sangrías fue similar al de *L. hardjobovis*, sólo varió

en los valores de los promedios de los títulos. Además, hubo aumento de anticuerpos después de 30 días de la vacunación y disminución del nivel de inmunoglobulinas entre la tercera y cuarta sangría, es decir, 45 días después de la revacunación. *L. grippotyphosa* evidenció títulos únicamente hasta la sangría número 4; este serovar, no incrementó títulos durante las sangrías, 1, 2 y 3; los promedios de los títulos detectados en la cuarta sangría, día 90 post vacunación fueron títulos de 3.75 muy inferiores dentro del grupo (Tabla 3).

Los títulos para los serovares evaluados estuvieron entre 1:25 y 1:800. Los títulos de 1:25 estuvieron presentes para todos los serovares y en todas las sangrías. Mientras que el título de 1:800 solamente se obtuvo en la sangría 3 y para un sólo animal, frente a *L. icterohaemorrhagiae*. Los títulos de 1:50 y 1:100 se presentaron a partir de la sangría número 2, es decir después de empezar el plan de vacunación. En la sangría número 3, 15 días después de la revacunación, es donde se detectó el mayor número de bovinos reactivos, asimismo se registraron títulos desde 1:25 hasta 1:800 (Figura 2).



**Figura 2.** Comparación del comportamiento serológico de los serovares.

## DISCUSIÓN

La producción de la bacterina se realizó a partir de los cultivos en el medio A; medio en el que se presentaron concentraciones celulares altas, en menor tiempo. Esto se atribuye a que las leptospiras inicialmente vienen adaptadas y provienen de pases en medios de composición semejante al medio A; lo cual facilita y acorta la etapa de adaptación y permite obtener en forma más rápida la biomasa celular requerida (19).

Todos los serovares crecieron hasta llegar y sobrepasar la concentración esperada  $1 \times 10^8$  células/ml. El serovar que obtuvo mayor concentración fue *L. pomona* con  $1 \times 10^{10}$  leptospiras/ml. Aunque todos los cultivos se manejaron bajo las mismas condiciones, el rendimiento en biomasa, no fue igual para todos. Esto se debe a que cada microorganismo actúa en forma diferente frente a las condiciones ambientales y algunos como *L. pomona* y *L. grippotyphosa* aprovechan más eficientemente los ácidos grasos disponibles en el medio como fuente de energía y carbono, o son capaces de superar la toxicidad que estos ácidos a su vez confieren al medio.

Los resultados de las concentraciones también evidencian, que serovares como *L. icterohaemorrhagiae*, *L. hardjobovis* y *L. hardjoprajitno* son más exigentes a nivel nutricional o que son más sensibles a las condiciones ambientales (19, 20).

Las divergencias obtenidas entre las concentraciones de las Leptospiras demuestran nuevamente que a pesar de que estos microorganismos pertenecen a la misma especie, *L. interrogans*, presentó diferencias a nivel serológico y a nivel nutricional (1, 21).

Las concentraciones obtenidas no fueron

un impedimento para la realización de la bacterina porque, aunque estas no presentan similitud, todos los serovares superaron la biomasa esperada,  $1 \times 10^8$  células/ml; sin embargo, la búsqueda de un medio de cultivo en el que cada uno de los serovares obtenga crecimientos cercanos al de *L. pomona* ( $1 \times 10^{10}$  células/ml) es una alternativa de trabajo para la optimización del proceso de elaboración de la vacuna, ya que de esta forma se producirían cultivos de leptospira más concentrados, disminuyendo así los volúmenes de cultivo requeridos para la formulación de las dosis de la bacterina vacuna. Esto haría el proceso más efectivo y económico.

El método de Reed y Muench (15), que se utilizó para titular los cultivos de leptospira, es una alternativa para determinar el recuento de las leptospiras debido a que métodos como recuento en placa y espectrofotometría no son manejables en el caso de *Leptospira*, pues el crecimiento en medio sólido se logra con dificultad y en mucho tiempo (15 días o más) y por otro lado, estos microorganismos son más pequeños que las bacterias convencionales (1,7). De tal forma, los datos obtenidos por medio de espectrofotometría o por el nefelómetro de MacFarland, no confieren resultados precisos. Al comparar los dos métodos de recuento empleados, el uso de la nefelometría es menos acertado, pues según este todos los cultivos presentaron igual concentración, mientras que por Reed y Muench (15), se observaron diferencias en el crecimiento de cada serovar.

El tratamiento con formaldehído garantizó la inactivación de *Leptospira*, ya que las pruebas de inocuidad practicadas después de este proceso fueron satisfactorias.

Generalmente los serovares, inducen la formación de anticuerpos así como



también de tipos celulares de reacciones inmunes, aunque hay casos en que se estimula preferentemente uno u otro tipo (22). En el caso de la leptospirosis la respuesta inmune que se prefiere es la humoral (23), la cual se traduce en la producción de anticuerpos que pueden ser detectados unos 5 días después de la infección inicial y luego de la bacteremia. De tal forma la evaluación serológica de la vacuna por medio de la MTA es un gran indicio de la efectividad de la misma, es decir, de su capacidad para inducir una respuesta específica, pues la aplicación de las leptospiras muertas o atenuadas condicionan la respuesta inmune de tipo humoral y celular, proporcionando una memoria sin necesidad que se manifieste la enfermedad (18, 20).

La bacterina polivalente probada en los 20 terneros fue efectiva ya que al tener en cuenta los resultados, se observó un desarrollo del título de anticuerpos después de las sangrías postvacunales, lo que indica que la vacuna es capaz de estimular la producción de anticuerpos.

Los bovinos que se vacunaron, presentaron respuestas serológicas diferentes a cada uno de los serovares contenidos en la vacuna polivalente; lo que hace conveniente analizar el por qué de las divergencias en el comportamiento de los títulos de anticuerpos desarrollados para los serovares durante las diferentes sangrías.

Según los datos obtenidos del análisis estadístico, *L. icterohaemorrhagiae* fue la que presentó un mayor promedio de títulos de anticuerpos en todas las sangrías postvacunales, haciéndola diferente estadísticamente respecto a las demás (Figura 1).

Al observar los resultados de las concentraciones de los cultivos, *L.*

*icterohaemorrhagiae* es uno de los serovares que menor concentración presentó, así es que este hecho descarta la posibilidad de que la diferencia de títulos se deba a la ventaja de concentración celular del serovar; además, la formulación de la vacuna se realizó de tal forma que todos los serovares quedaron con igual concentración en el volumen final de la dosis.

La notable titulación de anticuerpos de *L. icterohaemorrhagiae* se debió a la estimulación del sistema inmune por la revacunación. Al realizar los análisis de los títulos de los anticuerpos, se pudo determinar que los títulos de 1:400 y 1:800, fueron los que en el diagnóstico de leptospirosis indicaron infección por una cepa patógena ambiental y se presentaron en menor proporción que los de 1:25, 1:50 y 1:100, títulos que habitualmente se registran para animales vacunados. La similitud que los ácidos nucleicos de *L. icterohaemorrhagiae*, presenta con los de los serovares *hardjobovis* y *hardjoprajitno*, hace que se presenten reacciones cruzadas, es decir, que el serovar *icterohaemorrhagiae*, aglutine y/o lise en presencia de anticuerpos generados para las dos genoespecies de *L. hardjo* (16,22).

Los resultados de la evaluación serológica demostraron que el serovar incluido en la vacuna aplicada fue capaz de inducir una respuesta humoral ya que en las sangrías 2 y 3 se observó que la vacunación estimuló la producción de anticuerpos, y que la revacunación hizo que este estímulo se elevara y que como es normal, estos cayeron rápidamente después de un tiempo (Figura 2). Las inmunoglobulinas generadas como respuesta a una infección o a la vacunación, alcanzaron un nivel máximo a los 14-15 días y luego decayeron gradualmente (7); razón por la cual el nivel de anticuerpos encontrados después de un mes de la vacunación

mostró promedios bajos para todos los serovares. Así pues, si se hubieran realizado sangrías antes del mes (15 días después de la vacunación) el título de anticuerpos detectados pudo haber sido mayor que el encontrado al mes, época en la que los niveles de anticuerpos ya habían disminuido, lo que condujo a una pobre identificación de anticuerpos en la sangría 2. La razón anterior se sustenta también con los datos obtenidos en la sangría 3, que registraron promedios de títulos de anticuerpos más altos que para las demás sangrías.

Los anticuerpos desarrollados frente a la vacunación alcanzaron un nivel máximo a los 15 días y luego descendieron gradualmente. Los primeros anticuerpos que se elevaron son los de tipo IgM, seguidos por los de tipo IgG, cuando ocurre una respuesta secundaria por vacunación el tipo de anticuerpos que se producen en mayor proporción son los IgG, por lo tanto alcanzan niveles más altos y permanecen durante casi 12 meses.

Los títulos de anticuerpos después de la primera vacunación no fueron muy altos

porque la toma de muestras de sangre se realizó un mes después de la vacunación, época en la cual los IgM se encontraban en los niveles más bajos, lo que condujo a una pobre detección de anticuerpos. De tal forma la ausencia de títulos para algunos serovares y en algunos bovinos no significa que la bacterina sea incapaz de estimular el sistema inmune humoral y celular, y producir en consecuencia anticuerpos que garanticen la protección del animal vacunado (16).

La técnica de microaglutinación se utilizó para evaluar la capacidad inmunogénica de la vacuna porque es uno de los métodos aceptados por la Organización Mundial de la Salud y más seguros para el diagnóstico de la leptospirosis. Con este método se han identificado varios serotipos de leptospira en el país. Además, es una prueba sencilla, económica, rápida y estandarizada. En conclusión, la bacterina fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral en los bovinos, sin embargo, la cepa *L. grippotyphosa* no fue inmunógena comparada con los demás serovares que hicieron parte de la vacuna.

## REFERENCIAS

1. Guidugli F, Castro A, Atallah A. Systematic reviews on leptospirosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2000; 42(1):47-9.
2. Biberstein E. Tratado de Microbiología Veterinaria. Zaragoza: Acribia; 1990.
3. Dhaliwal G, Murray R, Dobson H, Montgomery J, Ellis W. Reduced conception rates in dairy cattle associated with serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection. Vet Rec 1996; 139 (5): 110-114.
4. Carter G, Claus G, Rikihisia Y. Fundamentos de Bacteriología y Micología Veterinaria. Zaragoza: Acribia; 1989.
5. Krieg R, Murray E, Bergey Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore; 1989.
6. Whyte P, Ratcliff R, Cargil C, Dobson K. Protection of pregnant swine by vaccination against leptospira infection. Aus Vet J 1982; 59: 41-45.

7. Gallego M, Gallego J. Leptospirosis bovina diagnostico serologico y control. Revista del CEISA. 1994; 1 (1-2): 48-68.
8. Manrique G. Leptospirosis bovina en Colombia. Acovez 1978; 1 (6): 21-24.
9. Dhaliwal G, Murray R, Dobson H, Montgomery J, Ellis W. Effect of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection on milk yield endemically infected dairy herds. Vet Rec 1996; 139; (13): 319-320.
10. Rivera B, Aycardi E, Torres B. Estudio serologico de leptospirosis bovina en los llanos orientales de Colombia. Acovez 1981; 5 (15): 11-14.
11. Giraldo G, Orrego A, Betancourt A. Los roedores como reservorios de Leptospiras en planteles porcinos de la zona central cafetera de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas. Arch Med Vet 2002; 34 (1): 25-32.
12. Najera S, Babilonia D, Alvarez L, Mattar S. Leptospirosis ocupacional en una región del caribe colombiano. Salud Publica Mex 2005; 47: 240-244.
13. Ossa J. Principios de virología médica. Medellín (Colombia): ed. Universidad de Antioquía; 1990.
14. González R, Batista S, Valdes A. et al. Crecimiento, virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar mozdok en medio EMJH modificado. Rev Cubana Med Trop 2002; 54(1): 32-36.
15. Duclaux E, Calculation of Reed and Muench's 50 percent point in survival time measured in a recording cage. Ann Inst Pasteur 1952; 83(3):372-80.
16. Sulzer C, Jones W. Leptospirosis. Methods in laboratory diagnosis. Department of Health, Education and Welfare Publication (CDC); 1976.
17. Scheffé H. A method for judging all contrasts in analysis of variance. Biometrika 1953; 40: 87-104.
18. Scheffé H. Practical Solutions of the Behrens-Fisher Problem. J Amer Stat Asc 1970; 65 (332): 1501-1508.
19. García S. Leptospirosis. En: Zoonosis. Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. ed. Instituto Nacional de Higiene. México, D.F., México. 2000; p.64.
20. Woodward M, Swallow C, Kitching A, Dalley A, Sayers A. *Leptospira hardjo* serodiagnosis: a comparison of MAT, ELISA; immunocomb. Vet Rec 1997; 141 (23): 603-604.
21. Lottersberger J, Pauli R, Vanasco N. Desarrollo y validación de un enzimoimmunoensayo para el diagnóstico de Leptospirosis bovina. Arch Med Vet 2002; 34(1): 35-42.
22. Díaz L, Zapata N, Góngora A, Parra J, Gómez L. Determinación de anticuerpos a *Leptospira* por la técnica de Elisa en siete grupos de humanos de alto riesgo ocupacional en el municipio de Villavicencio. Rev Col Cienc Pec 2005; 18: 4.
23. González R, Rodríguez J, Batista S. et al. Caracterización microbiológica de cepas candidatas vacunales de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. Rev Cubana Med Trop 2003; 55(3): 146-152.