

PREVALENCIA DE LEPTOSPIROSIS EN PORCINOS PROVENIENTES DE BOYACA

Pablo Raúl Clímentes Murillo(1)
William Raúl Suárez Clímentes(1)
Helia de Cardona DMVZ(2)
Isaac Gallego Marín DMVZ, MS.(3)

INTRODUCCION.

La leptospirosis ataca a una gran variedad de animales y al hombre, y se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial (2,4,1). En América se han descrito 14 serogrupos (14) y en Colombia, de acuerdo con el informe anual del Centro Internacional de Agricultura Tropical, la leptospirosis es una enfermedad de importante repercusión.

Las enfermedades Infecciosas, constituyen uno de los factores limitantes en el desarrollo de la industria porcina colombiana. No hay datos estadísticos concretos sobre las pérdidas que puede occasionar,

pero sí nos podemos formar una idea si analizamos una investigación hecha en una porqueriza, en el Departamento del Valle del Cauca, la cual revela grandes pérdidas ocasionadas por el padecimiento de la enfermedad en 1070 hembras, con 117 abortos (11).

En Colombia se ha estudiado poco la leptospirosis en porcinos; no se ha investigado en una forma continua, sino más bien aisladamente por lo cual no hay conclusiones concretas acerca del estado actual de la enfermedad(11). Si se tiene en cuenta que los cerdos son considerados como los principales diseminadores de la leptospirosis en las fincas ganaderas e inclusive para el hombre (9, 12) y que por consiguiente acarrea problemas en la producción y reproducción del ganado y en la salud y el trabajo del hombre, se hace necesario hacer encuestas serológicas en cerdos de las diferentes regiones del país y así determinar el serotipo o serotipos predominantes en cada una de ellas y en consecuencia elaborar un plan de preven-

(1) Estudiantes que adelantaron el Proyecto como Tesis de Grado.
(2) Profesor asistente Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. UNIVERSIDAD NACIONAL - Director de Tesis.
(3) Codirector de Tesis - Profesional adscrito al Programa de Epidemiología y Enfermedades Infecciosas - ICA - LIMV - Bogotá.

ción, y erradicación de la enfermedad. El presente trabajo pretende contribuir en parte a este fin.

MATERIALES Y METODOS.

1. Determinación del Tamaño de la Muestra.

El tamaño de la muestra (n) se obtuvo según el modelo I del Centro Panamericano de Zoonosis, 1973 (6). Grado de confianza del 95% y un margen de error del 20%.

$$n = \frac{P(100 - P)Z^2}{\left(\frac{E \cdot P}{100}\right)^2}$$

n = Tamaño de la muestra

P = Prevalencia crítica o porcentaje esperado de reactores positivos a leptospirosis.

E = Margen de error.

Z = Nivel de confianza del 95% al cual le corresponde un valor del 1.96 de acuerdo con la distribución de la curva normal; para efecto de cálculo se aproximó a 2.

Una vez obtenido el tamaño de la muestra, se incrementó el mismo en un 30%.

$$\text{Fracción de muestreo} = \frac{n}{N}$$

n = Tamaño de la muestra = 520

N = Población: 158.836 Departamento de Boyacá (Ministerio de Agricultura, 1976 - 1978) (10).

$$\text{Fracción de muestreo} = \frac{520}{158.836} = \frac{1}{305,45} = 0,327\%$$

Lo cual indica que cada animal tuvo una probabilidad de 0.327% de ser seleccionado para el muestreo entre los cerdos llevados al matadero para sacrificio y que cada uno de los animales seleccionados y examinados, representa o debe tener las mismas características de 305 animales de la población general bajo las mismas condiciones sanitarias.

2. Métodos Estadísticos.

2.1 Cálculo del intervalo de confianza o prevalencia corregida. Para esto se hace necesario determinar el error estándar de la prevalencia, utilizando la siguiente fórmula: (13, 16, 17).

$$E.S.P. = \frac{P(100 - P)}{n}$$

E.S.P. = Error estándar

P = Prevalencia de la muestra

n = Tamaño de la muestra

Se tomaron 2 E.S.P. para un margen del 95% de confianza.

2.2 Prueba de Independencia para análisis de frecuencias.

En esta prueba se utiliza la distribución ji-cuadrada y se emplea para probar la hipótesis nula de que los criterios de clasificación, cuando se aplican al mismo conjunto de entes son independientes. Para llevar a cabo esta prueba se utiliza una tabla de contingencia del siguiente tipo (3):

Para cada una de las celdas se calculan las frecuencias esperadas, bajo la hipótesis de que los dos criterios de clasificación son independientes y se comparan las frecuencias esperadas con las frecuencias observadas. Para esto se utiliza la fórmula: (7)

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_1 - E_1)^2}{E_1}$$

\sum = Sumatoria

O₁ = Frecuencia observada

E₁ = Frecuencia esperada

Esta prueba de independencia fue utilizada para determinar la influencia del sexo en la positividad de sueros a leptospirosis.

3. Obtención de las Muestras.

Las muestras de sangre empleadas para el presente trabajo, fueron obtenidas de los

Nivel del segundo criterio	Nivel del primer criterio de clasificación				Total
	1	2	3	C	
1	N_{11}	N_{12}	N_{13}	N_{1c}	N_1
2	N_{21}	N_{22}	N_{23}	N_{2c}	N_2
3	N_{31}	N_{32}	N_{33}	N_{3c}	N_3
•	•	•	•	•	•
r	N_{r1}	N_{r2}	N_{r3}	N_{rc}	N_r

Total	N_1	N_2	N_3	N
-------	-------	-------	-------	-----

cerdos que se faenan en el frigorífico San Martín de Bogotá y provenientes del departamento de Boyacá en el lapso comprendido entre agosto 11 y noviembre 17 de 1981. Se tomaron en frascos estériles en el momento del degüello y luego fueron centrifugadas para en esta forma obtener los sueros, los cuales previa identificación fueron congelados hasta el momento del examen.

Como se trató de animales aptos para mataderos, todos fueron adultos y adquiridos por los comerciantes del ramo, mediante compra en las diferentes plazas de las distintas regiones del mencionado departamento, para luego ser trasladados a Bogotá y sacrificados en el matadero de San Martín, circunstancia por la cual no se pudo precisar la procedencia exacta (en cuanto a regiones del departamento) de los diferentes grupos de animales muestrados.

4. Trabajo de Laboratorio.

4.1. Medios de Cultivo: STUART Y FLETCHER.

4.2. Preparación de antígenos.

Las cepas usadas en la presente investigación, fueron las siguientes: *L. pyrogenes*, *L. Pomona*, *L. canicola*, *L.*

icterohaemorragiae, *L. ballum*. Dichas cepas se repicaron en medio semisólido Fletcher y se incubaron a 28°C durante siete días; luego se coleccionaron al medio ambiente y en la oscuridad.

Se tomó 1 ml. de cada tubo o como máximo hasta alcanzar el anillo formado por el crecimiento de las leptospirosis en el medio Fletcher y se inoculó en medio Stuart. Como al realizar esta operación se precipita el agar en el fondo de los tubos, se repicó cada cinco días a nuevos tubos de medio Stuart para eliminar el agar, obtener mayor cantidad de antígeno y adaptar las cepas a este medio. Los repiques se incubaron a 28°C por cuatro a cinco días al cabo de los cuales se observaron al microscopio, utilizando condensador de campo oscuro, con el fin de valorar concentración, motilidad y pureza.

Aquellos que presentaron una concentración de espirillos muy alta, se diluyeron con solución salina tamponada de Sorensen, lo suficiente para obtener una concentración aproximada de 200 leptospirosis por campo con objetivo de 45X y ocular de 10X (15).

Los antígenos viciados con deficiencia de concentración de microorganismos, poca motilidad, signos de autoaglutinación y contaminación, fueron descartados. La operación se repitió cuantas veces fue

necesario para obtener la suficiente cantidad de antígeno utilizado en el transcurso del trabajo. Los repiques se efectuaron en una cabina de flujo laminar para asegurar las condiciones de esterilidad.

4.3. Desarrollo de la prueba de microaglutinación-lisis.

Cada suero problema una vez descongelado fue diluido 1:25 con solución salina fisiológica tamponada (Sorensen).

Se hizo un sondeo inicial a todos los sueros, utilizando únicamente la dilución de 1:50 para en esta forma descartar aquellos que no presentaron aglutinación o que aún presentándola no lo hicieron en un 50% o más de las leptospiras. Para el desarrollo de esta prueba se tomaron 0.2 ml de la dilución 1:25 de cada suero y se agregó 0.2 ml de antígeno. Una vez realizado el sondeo, se separaron los sueros que reaccionaron positivamente a uno o varios de los serotípos estudiados y se procedió a hacer la respectiva titulación.

Se partió nuevamente de la dilución inicial 1:50 y se prepararon series de diluciones dobles hasta 1:3.200 con solución salina fisiológica tamponada (Sorensen). A cada 0.2 ml de cada dilución se agregó un tubo control que contenía 0.2 ml. de antígeno y

0.2 ml de solución salina fisiológica tamponada. Se agitaron los tubos y se incubaron a temperatura de laboratorio por dos horas antes de comenzar la lectura. Con ayuda de una asa bacteriológica, se examinó una gota de cada tubo al microscopio, utilizando condensador de campo oscuro y con objetivo de 10X y ocular 15X sin cubreobjetos (5, 15).

Los sueros que presentaron una aglutinación del 100% de las leptospiras en la dilución de 1:50 (8) y los que lo hicieron en un rango mayor del 50% en la dilución 1:10 o más, se consideraron positivos para el serotípo para el cual aglutinaron. La forma como se observa la microaglutinación-lisis se ilustra en las figuras 1,2,3,4.

La figura 1 ilustra la reacción positiva de un suero diluido 1:50 con objetivo 10X, ocular 15X, donde hay lisis total de las leptospiras. Se aprecian únicamente los grumos producidos por la reacción antígeno-anticuerpo. La figura 2, el mismo suero de la figura anterior diluido 1:100, observándose algunas leptospiras libres. La figura 3, el mismo caso anterior pero mirado con objetivo de 40X y ocular 15X. La figura 4 representa el anillo formado por el crecimiento de las leptospiras en el medio Fletcher.

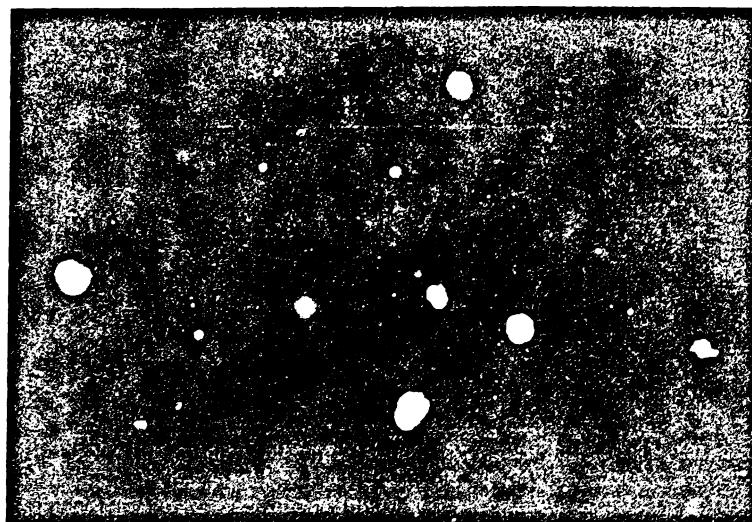


Figura 1: Reacción positiva de un suero diluido 1:50

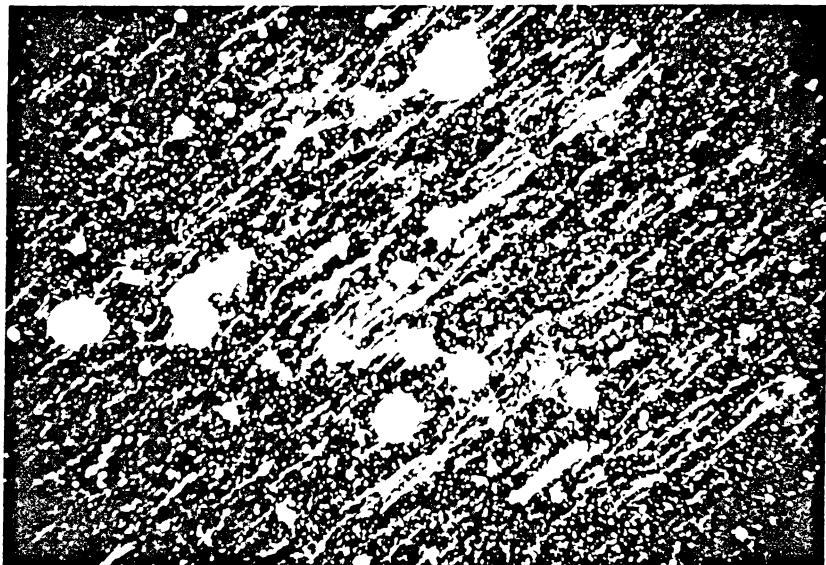


Figura 2: Reacción positiva de un suero diluido 1:100 con objetivo 10 y ocular 15.

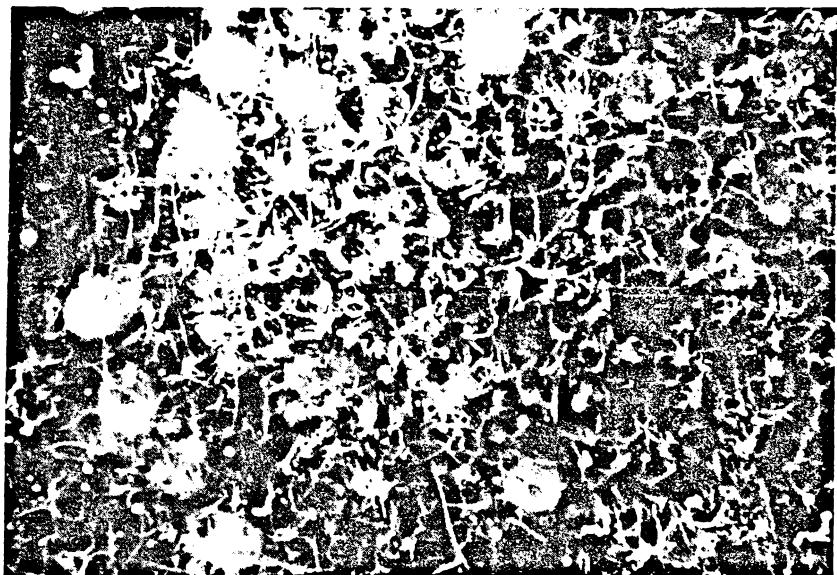


Figura 3: Reacción positiva de un suero diluido 1:100 con objetivo 40 y ocular 15.

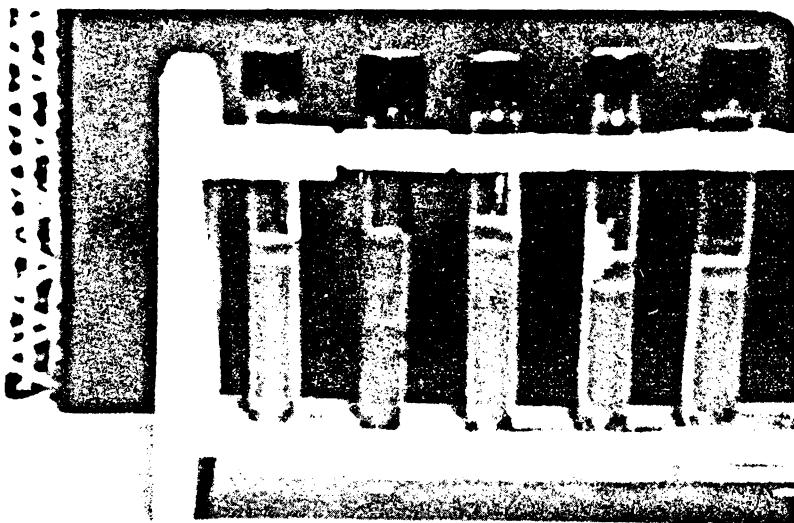


Figura 4: Anillo formado por crecimiento de leptospiras medio Fletcher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se estudiaron serológicamente un total de 520 porcinos provenientes del Departamento de Boyacá. De éstos positivos a leptospirosis, 193 que corresponden a una prevalencia del 37.11% en la mencionada región (Tabla 1). Para valorar este dato se construye un Intervalo de confianza, calculando el error estándar.

$$E.S.P. = \frac{37.11 (100 - 37.11)}{520} = 2,12$$

Para un margen del 95% de confianza se tomaron 2 E.S.P. de donde:

$$P \pm 2 E.S.P. = 37.11 \pm 2 (2,12) = 32.99 \text{ a } 41.35$$

Este intervalo de confianza significa que con una probabilidad del 0.95 (95%), la prevalencia de leptospirosis para el departamento de Boyacá y para las cinco cepas de leptospira usadas en este estudio, estaría

dentro de 32.99% y no excedería del 41.35%.

En la Tabla 2, se muestran los resultados del número de muestras positivas y el respectivo porcentaje para cada uno de los serotipos. El porcentaje mayor se halló para *L. pyrogenes* (20.57%), siguiendo en orden descendente *L. pomona* (12.11%), *L. canicola* (8.65%), *L. Icterohaemorrhagiae* (4.42%) y la menos frecuente que fue *L. ballum* (2.88%) (Figura 5).

De las 107 muestras positivas a *L. pyrogenes*, 12 lo fueron la dilución 1:50, 51 a 1:100, 27 a 1:200, 13 a 1:400 y 4 a título 1:800. Para las 63 muestras a *L. pomona*, 15 fueron positivas a título 1:50, 40 a 1:100, 6 a 1:200, 1 a 1:400 y 1 a 1:800. En el caso de *L. canicola*, se hallaron los títulos más elevados de todos los serotipos (Figura 6), así, obtuvimos 2 sueros 1:50, 15 a 1:100, 14 a 1:200, 5 a 1:400, 5 a 1:800, 2 a 1:1.600 y 2 a 1:3.200 sobre las 45 muestras positivas. Para *L. Icterohaemorrhagiae*, 3 fueron

TABLA 1. Reactividad de los sueros frente a los diferentes serotipos de leptospira.

Serotipos	No. Positivos	Porcentaje
ballum	2	0.384
*pyrogenes		
canicola	13	2.500
*pyrogenes		
icterohaemorrhagiae	6	1.153
*pyrogenes		
ballum	1	0.192
*canicola		
canicola	2	0.384
*pomona		
icterohaemorrhagiae	1	0.192
*canicola		
pomona	1	0.192
*pyrogenes		
icterohaemorrhagiae	1	0.192
*pomona		
ballum	8	1.538
*canicola		
pyrogenes		
icterohaemorrhagiae	5	0.961
*canicola		
pyrogenes		
icterohaemorrhagiae	2	0.384
*pomona		
pyrogenes		
icterohaemorrhagiae		
*ballum	1	0.192
canicola		
pyrogenes		
**pyrogenes	69	13,260
**pomona	57	10.961
**canicola	14	2.692
**icterohaemorrhagiae	7	1.346
**ballum	3	0.576
TOTALES	193	37,110

* Sueros positivos simultáneamente a varios serotipos de leptospira.

** Sueros positivos únicamente a un tipo de leptospira.

TABLA 2

TASA DE REACTORES PARA CADA UNO DE LOS SEROTIPOS

SEROTIPOS	No. Positivas	Rango Títulos	Porcentajes
Pyrogenes	107	1:50 - 1:800	20.57
Pomona	63	1:50 - 1:800	12.11
Canicola	45	1:50 - 1:3.200	8.65
Icterohaemorrhagiae	23	1:50 - 1:200	4.42
Ballum	15	1:50 - 1:400	2.88

TABLA 3

DISTRIBUCION POR SEXO, DE LOS SUEROS POSITIVOS PARA LOS DIFERENTES SEROTIPOS

S E R O T I P O S

	Ballum	Icterohaemorrhagiae	Canicola	Pomona	Pyrogenes
Hembras	7	16	22	35	59
Machos	8	7	23	28	48
Total	15	23	45	63	107

positivas en 1:50, 13 en 1:100 y 7 en 1:200. Sobre las 15 muestras positivas a *L. ballum*, 1 a título 1:50, 4 a 1:100, 6 a 1:200 y 4 a 1:400 (Tabla 4).

De las 520 muestras, 290 correspondieron a hembras y 230 a machos; 103 (17.3%)

hembras y 90 (19.8%) machos reaccionaron positivamente a leptospirosis (Tabla 3).

Se usó la prueba de Independencia, para analizar la hipótesis de que la positividad o negatividad de los sueros a leptospirosis no depende del sexo.

TABLA No. 4

DISTRIBUCION DE TITULOS AGLUTINANTES FRENTE A LOS DIFERENTES SEROTIPOS DE LEPTOSPIRA

D I L U C I O N E S

SEROTIPOS	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	Totales
Pyrogenes	12	51	27	13	4	-	-	107
Pomona	15	40	6	1	1	-	-	63
Canicola	2	15	14	5	5	2	2	45
Icterohaemorrhagiae	3	13	7	-	-	-	-	23
Ballum	1	4	6	4	-	-	-	15
Totales	33	123	60	23	10	2	2	

DATOS OBSERVADOS

	+	-	Total
Hembras	103	187	290
Machos	90	140	230
Total	193	327	520

DATOS ESPERADOS

	+	-	Total
Hembras	108	182	290
Machos	85	145	230
Total	193	327	520

PORCENTAJE

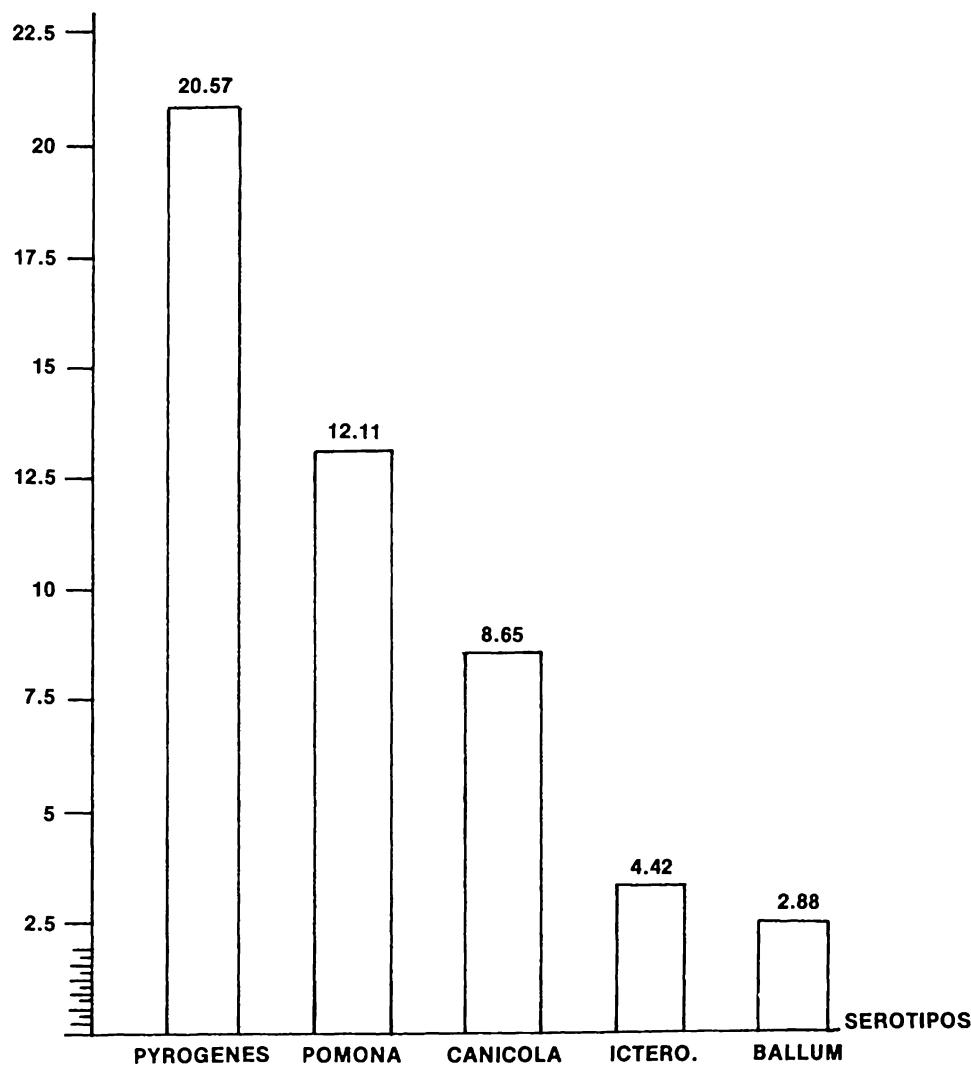


Figura 5: Porcentajes encontrados para los diferentes serotípos.

DILUCIONES

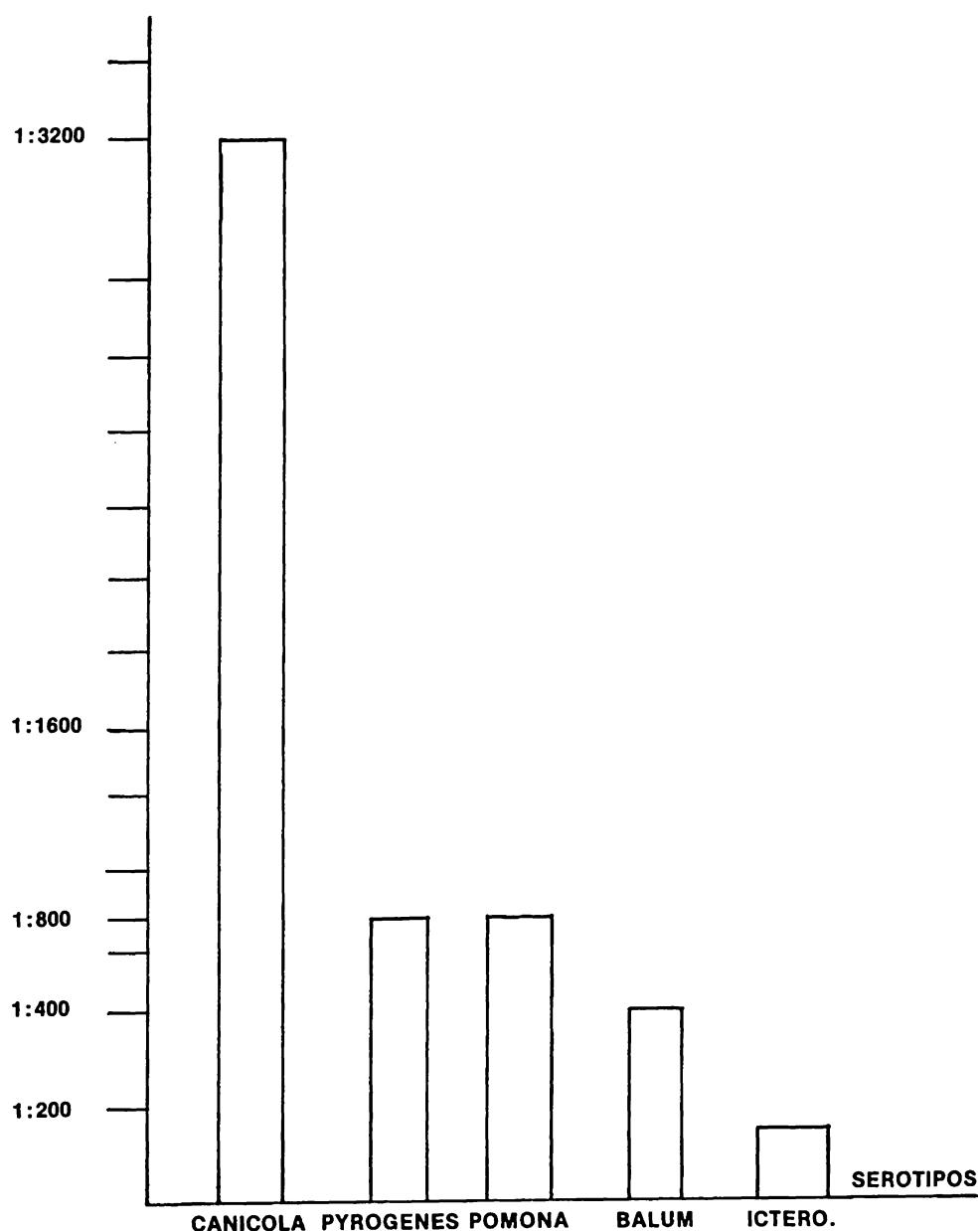
1:3200

1:1600

1:800

1:400

1:200

SEROTIPOS**Figura 6: Máximos títulos aglutinantes para cada serotipo.**

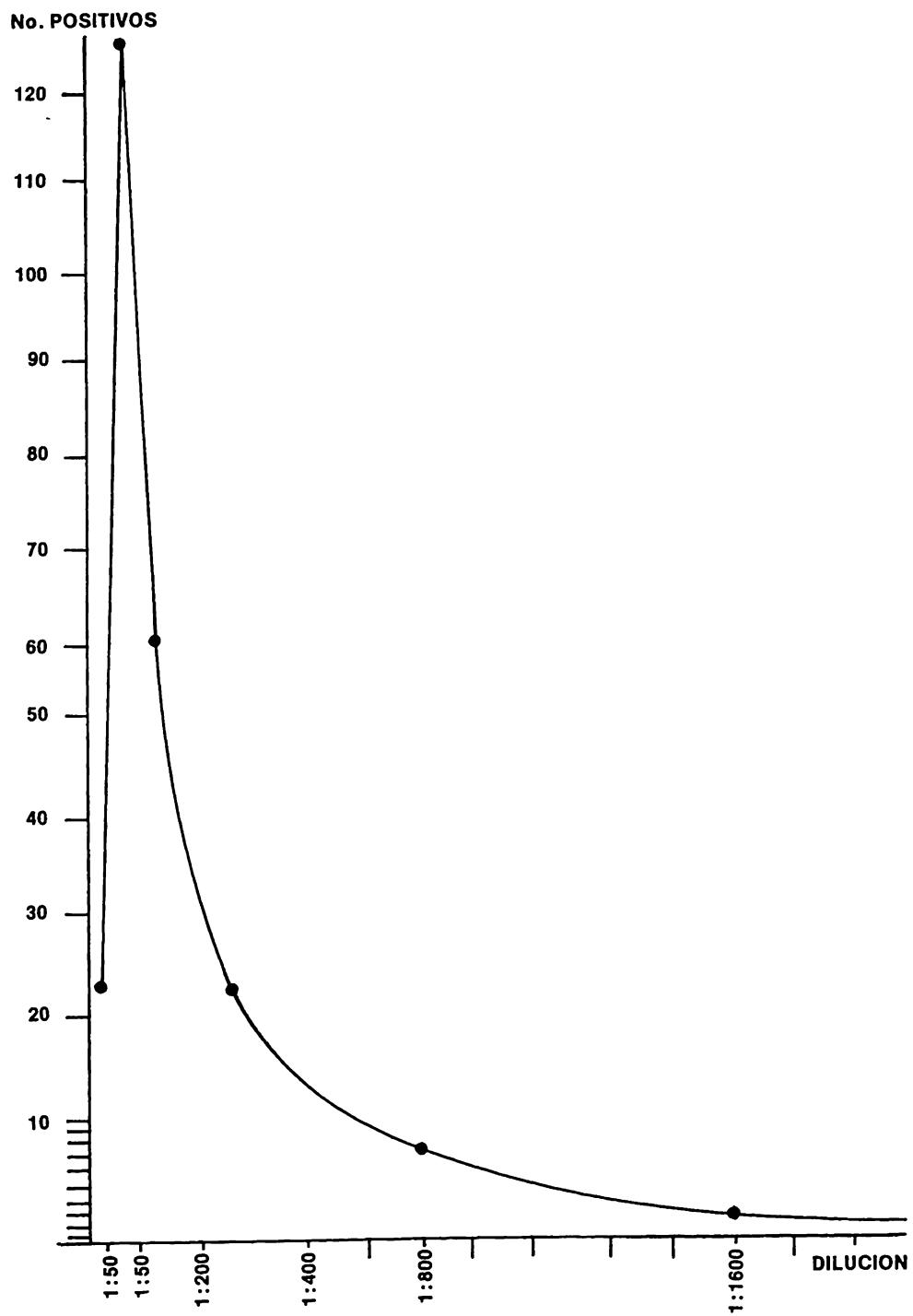


Figura 7: Número de reactores positivos en cada dilución.

Calculando χ^2 -cuadrado, tenemos:

$$\chi^2 = 0.835$$

Hay un grado de libertad y el valor crítico en la tabla es 3,845, lo que comprueba que la positividad o negatividad de los sueros a leptospirosis es independiente del sexo.

Los títulos positivos encontrados, oscilaron entre 1:50 y 1:3.200 (Tabla 2), con el mayor número de títulos aglutinantes para la dilución 1:100 (Figura 7).

Se encontró que varios sueros resultaron positivos a 2, 3 y hasta 4 de los serotipos utilizados, como se ilustra en la Tabla 1. El mayor número de sueros reaccionantes a varios serotipos se encontró para *L. canicola* y *L. pyogenes*. Un suero reaccionó positivamente a 4 de los 5 serotipos utilizados. La Tabla 1 muestra también el número de sueros que fueron positivos individualmente a cada uno de los serotipos y en igual forma ilustra el número total de reactores positivos como también la correspondiente prevalencia.

El modelo estadístico de función binomial, usado en el presente estudio es sencillo y de alta precisión para estudios de prevalencia (17) y los datos así obtenidos, indican que la prevalencia de leptospirosis en cerdos para el departamento de Boyacá es del 37.11% con un error estandar de 2.12. De acuerdo con la prevalencia hallada y según el valor fijado de una prevalencia crítica del 20% (ICA), se debe considerar que la enfermedad está ampliamente difundida en este departamento. La elevada tasa de reactores positivos (37.11%), permite sugerir diversos estudios con el fin

de aclarar la epidemiología, determinar bases para el control de la enfermedad y evaluar pérdidas económicas.

De los cinco serotipos utilizados, el más frecuente fue *L. pyogenes*: 20.57%. Según este resultado, dicho serotipo debe ser tenido en cuenta cuando se trate de diagnóstico serológico de leptospirosis en porcinos del departamento de Boyacá.

Es importante estudiar la relación existente entre los animales que al examen serológico reaccionan positivamente a leptospirosis y la presentación de problemas reproductivos.

RESUMEN.

Se tomaron 520 muestras de sangre de cerdos provenientes del departamento de Boyacá, sacrificados en el matadero de San Martín de Bogotá, con el objeto de determinar la prevalencia de leptospirosis por la técnica de microaglutinación-lisis, utilizando cinco serotipos diferentes de leptospira: *L. pyogenes*, *L. pomona*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. ballum*. Las muestras de suero fueron diluidas desde 1:50 hasta 1:3.200 y cada una enfrentada a los serotipos mencionados. De las 520 muestras, 193 (37.11%) resultaron positivas para uno o varios de los serotipos estudiados, correspondiendo el índice más alto (20.57%) a *L. pyogenes*.

De acuerdo con los resultados, debemos considerar que la enfermedad está ampliamente difundida en el departamento de Boyacá y que el serotipo *pyogenes* se debe tener en cuenta en pruebas diagnósticas de leptospirosis en ese departamento.

BIBLIOGRAFIA

1. ACHA, P. N. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Publicación Científica No. 354, Organización Panamericana de la Salud. p. 57-63. 1977.
2. AYCARDI, E. La Leptospirosis una enfermedad poco conocida en los bovinos de carne. Veterinario Práctico No. 3. 1978.
3. BLISS, CH. Statistics in Biology. Statistical methods for research in the natural science. McGraw-Hill. New York. p. 427. 1967.
4. BODDIE, G. F. Métodos de diagnóstico en Medicina Veterinaria. Cuarta edición. Editorial Labor S. A. (Méjico). p. 282. 1965.

5. BRANDRETH, S. R.; GIRACA, N. Investigación de leptospirosis en el Paraguay. Revista Veterinaria No. 44. : 31-36. 1981.
6. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. Procedimientos para Estudios de Prevalencia. Nota Técnica No. 18, p. 35. 1973.
7. DANIEL, W. W. Bioestadística con Aplicación especial a las ciencias biológicas. Editorial Limusa. México. p. 485. 1980.
8. HANSON, L. E. Inmunologic problems in bovine leptospirosis. Journal of the American Veterinary Medical Association. 163: 919-920. 1973.
9. MICHINA, S.W. Leptospirosis. The Veterinary Record. 86: 484-496. 1970.
10. MINISTERIO DE AGRICULTURA, COLOMBIA. Ganadería. 1976-1978. p. 123-125
11. MORALES, G. A.; BELTRAN, L. E. Enfermedades Porcinas de Importancia en el Trópico Colombiano. CIAT. p. 23-27. 1979.
12. NAVARRETE, S. M. Incidencia de Leptospirosis en Cerdos en el corregimiento de Cacaotá, Departamento de Córdoba. Encuesta serológica. Revista ICA. 10: 207-214. 1975.
13. ORREGO, A.; SANZ, O.; MEJIA, W. Prevalencia de Bovinos Reactores a la Prueba de bang en Aguadas. Revista ICA (Colombia). 12: 253-281. 1977.
14. RIVERA, B.; AYCARDI, E.; TORRES, B. Estudio serológico de Leptospirosis bovina en los Llanos Orientales de Colombia. Revista ACOVEZ. 5: 11-13. 1981.
15. RODRIGUEZ, M. G.; GONZALEZ, G. G.; MARIRO, O. C. Manual de técnicas de Microbiología. Documento de Trabajo No. 18, ICA Bogotá, p. 81-89. 1978.
16. SNEDECOR, W. G.; COCHARAM, W. G. Métodos estadísticos. Primera edición. Editorial C.E.C.S.A. México. p. 39-53; 251-285. 1974.
17. VILLAMIL, L. C.; LOBO, C. A. Estudio de prevalencia de reactores positivos a Brucellosis en el Norte del Chocó. Revista ACOVEZ. 1: 17-19. 1976.

UNIDAD DE CLINICA Y CIRUGIA DE GRANDES ANIMALES

Asistencia técnica pecuaria al campo. Atención médica - veterinaria, médica quirúrgica, hospitalización, cirugía, Rayos X.

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Universidad Nacional de Colombia
Ciudad Universitaria - BOGOTA D.E.
