

Serological evaluation of *Leptospira interrogans* in horses from an equestrian center in Linares province, Chile*

Evaluación serológica de Leptospira interrogans en equinos pertenecientes a un centro ecuestre de la provincia de Linares, Chile

Avaliação serológica da Leptospira interrogans em equinos pertencentes a um centro equestre da província de Linares, Chile

Ignacio Troncoso Toro^{1*}, MV; Jorge Toro Barros², MV; Alejandra Guzmán Cáceres³, MV; Jaime Fuentealba Ortega⁴, MV; Christof Fischer Wiethuchter¹, MV, Ph.D.

*Autor para correspondencia: Ignacio Troncoso Toro. Universidad Santo Tomás, Escuela de Medicina Veterinaria, Av. Arturo Prat N 855. Concepción, Chile. E-mail: ignaciotroncoso@santotomas.cl

¹ Universidad Santo Tomás, Escuela de Medicina Veterinaria. Concepción, Chile.

² Universidad Santo Tomás, Escuela Medicina Veterinaria. Talca, Chile.

³ Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Oficina Linares, Chile

⁴ Sección Veterinaria de la Escuela de Artillería, Linares, Chile

(Recibido: 1 de agosto, 2013; aceptado: 9 de noviembre, 2013)

Abstract

Leptospirosis is a bacterial disease characterized in horses by nonspecific clinical signs such as fever, anemia, depression; and specific signs such as abortion, neonatal death, and recurrent uveitis. The objective was to determine seroprevalence in 55 horses from the equestrian center of Linares Artillery School, located in the Maule region. Serum samples were obtained from animals of both sexes and several ages. Samples were analyzed by Microscopic agglutination (MAT) for nine serovars with dilution titles of 1:100 or higher. The overall seropositivity was 65.4%, distributed in the following serovars: *autumnalis* (54.5%), *bratislava* (52.7%), *canicola* (20%), *copenhageni* (12.7%), and *hardjo* (7.3%); whereas reacting sera were not obtained for *pomona*, *grippothyphosa*, *ballum*, or *bataviae*. Finally, no statistically significant difference was observed between sex or age ($P \geq 0.05$). Seropositivity was lower in older than in younger horses.

Key words

equine, leptospirosis, microscopic agglutination.

*Para citar este artículo: Troncoso Toro I, Toro Barros J, Guzmán Cáceres A, Fuentealba Ortega J, Fischer Wiethuchter C. Evaluación serológica de *Leptospira interrogans* en equinos pertenecientes a un centro ecuestre de la provincia de Linares, Chile. Rev CES Med Zootec. 2013; Vol 8 (2): 101-107.

Resumen

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana caracterizada por producir clínicamente en equinos signos clínicos inespecíficos como fiebre, anemia, depresión, y otros específicos, como aborto, muerte neonatal y uveítis recurrente. La finalidad del trabajo fue determinar la seroprevalencia en 55 equinos pertenecientes al Centro Ecuestre de la Escuela Artillería de Linares, Región del Maule. Las muestras (suero), fueron obtenidas de animales sin distinción de sexo o edad y analizadas mediante el método de Aglutinación Microscópica (MAT) para nueve serovares a títulos de dilución de 1/100 o superiores. Determinando una seropositividad general del 65,4%, distribuido en los serovares: *Autumnalis* (54,5%), *Bratislava* (52,7%), *Canicola* (20%), *Copenhageni* (12,7%) y *Hardjo* (7,3%), mientras que para *Pomona*, *Grippothyphosa*, *Bataviae* y *Ballum* no se obtuvieron sueros reaccionantes. Finalmente, no se observó diferencia estadística significativa ($P \geq 0,05$) en los individuos reaccionantes según sexo y edad, demostrándose que a mayor edad menor es la seropositividad.

Palabras clave

aglutinación microscópica, equino, leptospirosis.

Resumo

A leptospirose é uma doença bacteriana caracterizada por produzir em equinos alguns signos clínicos inespecíficos, como febre, anemia, depressão; e outros específicos, como aborto, morte neonatal e uveíte recorrente. A finalidade deste trabalho foi determinar a soroprevalência em 55 equinos pertencentes ao Centro Equestre da Escola de Artilharia de Linares, região de Maule no Chile. As amostras (soro) foram obtidas de animais sem distinção de sexo ou idade e analisadas pelo método de aglutinação microscópica (MAT) para nove serovares a títulos de diluição de 1/100 ou superiores. Determinando uma seropositividade geral de 65,4%, distribuído nos serovares: *Autumnalis* (54,5%), *Bratislava* (52,7%), *Canicola* (20%), *Copenhageni* (12,7%) e *Hardjo* (7,3%), enquanto que para *Pomona*, *Grippothyphosa*, *Bataviae* e *Ballum* não se obtiveram soros reacionantes. Finalmente, não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) nos indivíduos reacionantes segundo sexo e idade, conferindo que a maior idade menor é a seropositividade.

Palavras chave

aglutinação microscópica, equino, leptospirose.

Introducción

La Leptospirosis es una antropozoonosis que afecta tanto a los animales como al ser humano, siendo este último un hospedador accidental del patógeno ⁽¹⁷⁾. Es una enfermedad común para especies domésticas como son los caninos, equinos, bovinos y los animales silvestres, quienes la adquieren mediante la vía de transmisión horizontal por contacto directo o indirecto, la primera ocurre principalmente producto de la entrada del microorganismo por vía inhalatoria o conjuntival, procedente de gotas formadas por dispersión de la orina de animales infectados ⁽¹⁾, mientras que la segunda (más común), ocurre por exposición de animales susceptibles a fuentes de agua, suelo y alimento contaminado. Además, caninos, bovinos y porcinos infectados pueden actuar también como reservorios ⁽¹⁴⁾. Es una de las enfermedades de mayor impacto producto de las grandes pérdidas económicas que ocasiona en la ganadería, en el caso de la especie equina, el curso de la enfermedad es de carácter leve o subclínico, siendo los signos de una infección natural fiebre, ictericia leve, aborto y uveítis recurrente (oftalmia periódica) ⁽¹⁰⁾.

La leptospirosis se describe en Chile desde la década de los 50, siendo motivo de estudio, especialmente en algunas regiones del sur; las publicaciones al respecto comunican altas cifras de infección. A pesar de lo anterior, su incidencia en Chile es recién conocida a partir del 2000, cuando esta fue incorporada como enfermedad de notificación obligatoria a través de vigilancia de laboratorio ⁽¹⁶⁾. En equinos se ha comprobado su presencia en diferentes zonas del país, dada esta importancia, es que se propone realizar un estudio sobre seropositividad de leptospirosis en equinos de un centro ecuestre, mediante el uso de la técnica serológica MAT, la cual generalmente detecta anticuerpos tras la primera semana de infección, alcanzándose los títulos máximos a la tercera o cuarta semana post infección⁷. Y a su vez relacionar los resultados de los diferentes serovares con las variables de sexo y edad.

Materiales y métodos

El estudio se efectuó en la comuna de Linares, ubicada a 46,58 km. al sur de la ciudad de Talca, realizando un muestro poblacional de 55 equinos pertenecientes al Centro Ecuestre de la Escuela Artillería de Linares, que no presentaban vacunación contra el agente.

A cada animal se le tomó una muestra de 5 ml de sangre sin anticoagulante, obtenida mediante la venopunción de la vena yugular. La obtención del suero se logró mediante centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos, el cual se mantuvo congelado a -20°C hasta ser enviado al laboratorio de diagnóstico del Servicio Agrícola Ganadero (Complejo Lo Aguirre), ubicado en la Ruta 68, Km 12, (Pudahuel, Región Metropolitana, Chile), para ser analizadas mediante el método serológico MAT. En éste, se enfrentó el suero de los animales en estudio a una batería de cepas de referencia (5), de los siguientes serovares: *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Copenhagenii*, *Hardjo*, *Canicola*, *Autumnalis*, *Ballum*, *Bataviae* y *Bratislava*.

Esta técnica según literatura presenta una sensibilidad y especificidad del 95% y 90%, respectivamente, con un valor predictivo positivo de 95% y negativo de 100% ⁽¹⁵⁾. La prueba consiste en mezclar diluciones seriadas del suero problema con cultivos de *Leptospira spp* de los distintos serovares en placas de microtitulación o en tubos, las cuales se dejan reaccionar por 2 horas a 28 a 30°C. El grado de aglutinación y el título final se determina examinando cada mezcla por microscopía de campo oscuro, considerándose como positivo para la especie equina, todo aquel suero que reaccionase al antígeno de uno o más serovares de *Leptospira interrogans* a una titulación de $\geq 1:100$ ⁽¹⁶⁾.

Para el análisis de las variables sexo y edad, se procedió a dividir a los animales en 2 grupos según sexo: macho y hembra; y edad donde se constituyeron sucesivos grupos etarios a intervalos de 4 años: 1 a 5 años, 6 a 10 años, 11 a 15 años y > 15 años.

Considerando que fue un estudio descriptivo, se consideró la frecuencia de presentación como porcentajes. Para determinar si existían diferencias significativas entre individuos de diferente edad y sexo se aplicó el test de Fisher, con un nivel de significancia del 95% y un margen de error del 5%. Además, se utilizó la correlación de Spearman, para establecer la relación entre edad y seropositividad. Todos los test se efectuaron con el software Infostat (versión 2010e).

Resultados

De un total de 55 ejemplares escogidos al azar, 36 de ellos resultaron positivos a la prueba de aglutinación microscópica (MAT), obteniendo un nivel de seropositividad del 65,4%. El punto final de la lectura del test fue la dilución más alta del suero en la cual ocurrió el 50% de aglutinación ⁽¹¹⁾.

Para la realización de la técnica se utilizaron un total de 9 serovares de *Leptospira interrogans*, obteniéndose el mayor nivel de seropositividad para *Autumnalis* con un 54,5%, seguido de *Bratislava* con un 52,7%, *Canicola* con un 20% y finalmente *Copenhageni* y *Hardjo* con un 12,7% y 7,3%, respectivamente, mientras que, para los 4 serovares restantes (*Pomona*, *Grippotyphosa*, *Bataviae* y *Ballum*) no se obtuvo animales reaccionantes a la

prueba. Señalando que de los 36 animales seropositivos a *Leptospira*, 28 de ellos (77,7%) reaccionaron a más de un serovar. En lo que respecta a las máximas diluciones obtenidas, la de mayor frecuencia fue 1:100 con un 40%, seguido de la dilución 1:400 con un 26% y 1:200 con un 23%, mientras que, las de menor frecuencia fueron \geq 1:800 y 1:800 con un 10% y 1%, respectivamente.

En los animales muestreados había un total de 35 hembras y 20 machos, obteniéndose un 65,7% de serorreacción en hembras, lo cual equivale a 23 individuos, mientras que en los machos se alcanzó un 65% lo que equivale a 13 animales, resultado que demuestra una mayor positividad en el caso de las hembras, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P \geq 0,05$) entre ambos grupos.

Con respecto a la edad, el grupo etario que tuvo mayor cantidad de serorreaccionantes fue el de los animales que se encuentran entre los 6 a 10 años con un 63,6%, seguido del intervalo mayor de 15 años con un 40%, luego el grupo entre los 1 a 5 años con un 38,1% y finalmente el intervalo de edad entre 11 a 15 años con un 5,4%, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos ($P \geq 0,05$). La distribución etaria para los diferentes serovares estudiados se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución de serovares de *Leptospira interrogans* en equinos del centro ecuestre según categoría etaria

| Edad en años | Serovar n (%) | | | | |
|--------------|---------------|------------|-------------|----------|----------|
| | Bratislava | Autumnalis | Copenhageni | Hardjo | Canicola |
| 1 a 5 | 9 (31,0) | 9 (30,0) | 00 | | 3(27,3) |
| 6 a 10 | 12 (41,4) | 13 (43,4) | 4 (57,1) | 3 (75,0) | 3(27,3) |
| 11 a 15 | 1 (3,5) | 1 (3,3) | 00 | | 1(9,0) |
| Mayor a 15 | 7 (24,1) | 7 (23,3) | 3 (42,9) | 1(25,0) | 4 (36,4) |
| TOTAL | 93 | 07 | | 41 | 1 |

Para analizar la relación entre las variables edad y seropositividad, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman, el cual evidenció una correlación negativa ($r=-0,6$), lo cual indica que a mayor edad de los individuos existe una menor seropositividad.

Discusión

El nivel de seropositividad logrado en este estudio, fue levemente mayor al obtenido por Moya ⁽¹³⁾ en la comuna de Linares, el cual arrojó un 61,29%, mencionando que este fue realizado en un número menor de animales (31 animales) que se encontraban estabulados en sectores precordilleranos, lo cual disminuiría el riesgo de contagio entre los individuos ⁽¹¹⁾. El serovar que presentó una mayor cantidad de animales serorreaccionantes fue *Autumnalis* con un (54,5%), lo que coincide con los trabajos realizados por Cano ⁽⁶⁾, el cual fue realizado en mulares pertenecientes al regimiento de infantería en Los Ángeles, región del Biobío y por Gómez ⁽⁸⁾ en tres centros ecuestres pertenecientes al ejército mexicano, quienes obtuvieron un 35,3% y 66,7% respectivamente.

El segundo en orden de presentación fue *Bratislava* con un 52,7% de ejemplares serorreaccionantes, valor mayor al obtenido por Båverud *et al* ⁽³⁾ en Suecia, el cual mostró una positividad del 16,6%, no existiendo estudios que avalen su presencia en nuestro país. Vale la pena destacar, que a nivel sudamericano, no se ha descrito la presencia de serología positiva para el serovar *Autumnalis*, así lo demuestran los trabajos realizados por ^(9,10,12) en Perú y estados de Brasil respectivamente, mientras que, en el caso del serovar *Bratislava*, solamente ha sido documentado la presencia en Brasil ⁽¹²⁾, en un ejemplar del un total de 37 equinos analizados, equivalente a una seropositividad del 2,7%, bastante inferior a la obtenida en nuestro trabajo.

La mayor dilución obtenida fue de 1:100, lo cual

probablemente indicaría la presencia de anticuerpos residuales procedentes quizás de una infección temprana¹⁹, mientras que diluciones de 1:200 a 1:400 se consideran como inicio de infección, mientras que diluciones mayores a 1:800 se infiere que son producto de una infección activa, debiéndose en estos casos instaurar un tratamiento oportuno ⁽¹⁹⁾. Vale la pena mencionar que al igual que otras pruebas serológicas, para diagnosticar una infección individual mediante MAT, se requiere estudiar dos muestras pareadas con siete a catorce días de intervalo de la primera y de existir seroconversión, se considera de valor diagnóstico un cambio en el título de al menos cuatro veces el título inicial ⁽¹⁷⁾, lo cual no fue realizado en nuestro estudio.

Se obtuvo una mayor seropositividad en el caso de las hembras, no existiendo diferencia estadísticamente significativa ($P \geq 0,05$), lo que coincide con lo obtenido por Arias ⁽¹⁾, en donde el mayor porcentaje de equinos seropositivos pertenecen a las hembras (53,4%), situación similar ocurre con Moya ⁽¹³⁾, en donde el porcentaje de hembras afectadas alcanzó el 65%, no existiendo en ambos trabajos diferencia estadísticamente significativa, no así en el caso de Bay-Schmith ⁽⁴⁾ que obtuvo una mayor serorreacción por parte de los machos (67,56%), encontrando una diferencia significativa entre ambos sexos.

La correlación de Spearman, indicó que a mayor edad de los individuos existe una menor positividad, resultado distinto al de Arias ⁽¹⁾, en el cual se presentó correlación positiva clara entre edad de los ejemplares y su estado en relación a la leptospirosis, en donde a mayor edad de los equinos, existe una mayor seropositividad, dicha información es corroborado por Barwick *et al.* ⁽²⁾, el que al catalogar los factores de riesgo de contraer la enfermedad implica, el factor edad como uno de los más importantes.

Conclusiones

Mediante el presente estudio se demostró por primera vez respuesta serológica a los serovares *Autumnalis* y *Bratislava* en la especie equina a nivel sudamericano y nacional, además, de demostrar la importancia de esta enfermedad, lo cual queda en evidencia por el 65% de seropositividad obtenido.

Agradecimientos

Escuela de Artillería de la ciudad de Linares. El estudio fue financiado por la Universidad Santo Tomás, sede Talca.

Referencias

1. Arias E. Prevalencia de leptospirosis equina en la comuna de Doñihue, VI región de Chile. Tesis Med Vet 1999. Universidad de Concepción.
2. Barwick R, Mohammed H, McDonough P, White M. Risk factor associate with the likelihood of leptospiral seropositivity in horse in the state of New York. *Am J Vet Res* 1997; 58:1097-103.
3. Baverud V, Gunnarsson A, Olsson E, Franzén P, Egenvall A. *Leptospira* seroprevalence and associations between seropositivity clinical disease and host factors in horse. *Acta Vet Scand* 2009; 51:15.
4. Bay-Schmith N. Prevalencia de leptospirosis equina en caballos jugadores de polo de la octava región de Chile. Tesis Med Vet 2004. Universidad de Concepción.
5. Caino H, Scaglia J, Curcio F, Siquiuff G. Leptospirosis. *Rev Fac Ciencias Médicas* 2006; 1(3):30-36.
6. Cano S. Prevalencia de *Leptospira spp* en mulares (*Equus mulus*), pertenecientes al regimiento de infantería reforzada N° 17 Los Ángeles. Tesis Med Vet 2010. Universidad Santo Tomás.
7. Feraud T, Abeledo G. Primer reporte en Cuba de *interrogans serovar Tarassovi* y caracterización clínica epizootiológica en focos de leptospirosis porcina. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* 2005; 5:1-34.
8. Gómez-Molina TG. Serovariedades de *Leptospira* presente en ganado de tres centros ecuestres pertenecientes al ejército mexicano. *Rev Sanid Milit Mex* 2005; 59(4): 260-264.
9. Lasta C, Oliveira S, Merini L, Dasso M, Pedralli V, Díaz F. Pesquisa de aglutininas anti-*Leptospira* em soros de equinos de tração em Porto Alegre, Brasil. *R. Bras. Ci. Vet* 2013; 20 (1):23-25.
10. Lefebvre RB. *Leptospirae*. In: Hirsh DC, Zee YC, editors. *Veterinary microbiology*, 2da ed. Oxford UK, Blackwell Science. 1999, p. 185-198.
11. Levett P. 2001. Leptospirosis (en línea). *Clinical Microbiology Reviews* 14(2): 296-326. Consultado 28 de may. 2010. Disponible en: <http://www.cmr.asm.org/cgi/reprint/14/2/296.pdf>
12. Moraes C, Kuroda R, Pinho A, Ywasaki F, Meneses A, Martin A, Júnior J, Tavares H, Vasconcellos S. Pesquisa de anticorpos para sorovares de *Leptospira interrogans* patogénicas em equídeos criados na ilha de Algodoal, Estado do Pará. *Rev. Ci. Agra* 2010; 53 (2):188-194.
13. Moya G. Prevalencia de leptospirosis equina en cuatro comunas de la Provincia de Linares, VII región. Tesis Med Vet 2002. Universidad de Concepción.
14. Nachón H, Bosisio C. Enfermedades infecciosas de los equinos. Área de salud y producción de equinos. 2da edición. Buenos Aires: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Argentina. 2005.
15. OIE. Office International des Epizooties. Manual of standards diagnostic test and vaccines, second edition 1992; Office International des Epizooties. Paris, France.

16. Perret C, Abarca K, Dabanch J, Solari V *et al.*, 2005. Risk factors and frequency of positive antibodies for leptospirosis in a sub urban population near Santiago. Rev Méd Chile 2005; 133:426-431.
17. Sandow K, Ramírez W. La Leptopirosis humana y bovina y su relación con los factores edafoclimaticos en una provincia de la región oriental de Cuba. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET 2005; 6(9):1-10.
18. Sotomayor C, Manchego A, Chiok K, Sandoval N, Ramírez M, Rojas M. Rivera H. Seroprevalencia de anticuerpos contra serovares de *Leptospira spp* en yeguas de un haras de la Ciudad de Lima. Rev Inv Vet Perú 2012; 23(4):499-503.
19. Wegmann E. Leptospiriosis en caballos. Arch Med Vet. 1983; 15(2):59-64.