PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IgY CONTRA 8 SEROVARES DE *Leptospira interrogans* PREVALENTES EN EL VALLE DEL CAUCA

ISABEL CRISTINA NARANJO PRADO



UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2011

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IgY CONTRA 8 SEROVARES DE *Leptospira interrogans* PREVALENTES EN EL VALLE DEL CAUCA

ISABEL CRISTINA NARANJO PRADO

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2011

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IgY CONTRA 8 SEROVARES DE *Leptospira interrogans* PREVALENTES EN EL VALLE DEL CAUCA

ISABEL CRISTINA NARANJO PRADO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el titulo de Bióloga

Directora
MIRYAM ASTUDILLO HERNÁNDEZ
Bacterióloga, MSc.

Codirector
ENRIQUE BRAVO MONTAÑO
Lic. en educación de biología y química, MSc, PhD

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2011

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI

2011

AUTOR: ISABEL CRISTINA NARANJO PRADO, 1987.

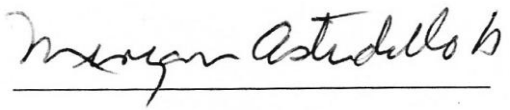
TÍTULO: PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IgY CONTRA 8 SEROVARES DE *Leptospira interrogans* PREVALENTES EN EL VALLE DEL CAUCA

PALABRAS CLAVE: IgY; *Leptospira interrogans*; Microaglutinación (MAT); Serovares

NOTA DE APROBACIÓN

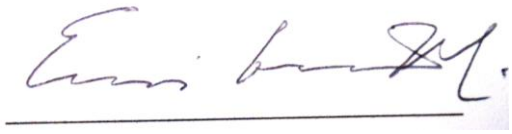
El trabajo de grado titulado “Producción de anticuerpos IgY contra 8 serovares de *Leptospira interrogans* prevalentes en el Valle del Cauca” presentado por la estudiante ISABEL CRISTINA NARANJO PRADO para optar por el título de bióloga, fue revisado por el jurado y calificado como:

Aprobado



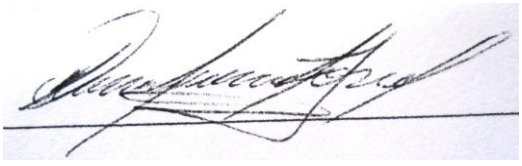
Miryam Astudillo Hernández

Directora



Enrique Bravo Montaño

Codirector



Delly Brigitte Tosse Buitrago

Jurado

A mis padres Mario y Aide; y a mi hermana Lina Marcela. Los amo mucho.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a mi directora por la paciencia y el apoyo permanente, a mi codirector, a Leonor Oviedo y a todos los miembros del Laboratorio De Diagnóstico De Leptospirosis De la Universidad del Valle.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA

2. INTRODUCCIÓN 1
3. MARCO TEÓRICO 3
3.1. Leptospirosis 3
3.1.1. Características generales de la leptospirosis 3
3.1.2. Taxonomía de Leptospira 4
3.1.3. Epidemiología 5
3.1.4. Situación actual de la leptospirosis 8
3.1.5. Diagnóstico 9
3.1.5.1. Diagnóstico serológico 10
3.1.5.2. Prueba de microaglutinación (MAT) 10
3.1.5.3. Observación directa 11
3.1.5.4. Diagnóstico diferencial 12
3.1.6. Inmunidad 12
3.1.7. Tratamiento, prevención y control 13
3.1.8. Patogénesis y patología 14
3.2. Tecnología IgY 16
3.2.1. Bioquímica de la IgY 18
3.2.2. El antígeno 18
3.2.3. El adyuvante 18
3.2.4. Inoculación 19
3.2.5. Extracción de IgY 19
4. OBJETIVOS 21
4.1. General 21
4.2. Específicos 21
5. HIPÓTESIS Y RESULTADOS ESPERADOS 21
6. METODOLOGÍA 22
6.1. Composición y preparación del antígeno de lipopolisacáridos (LPS) 22
6.2. Composición de la vacuna comercial. 23

6.3. Esquema de vacunación y recolección de huevos 23
6.4. Evaluación de títulos en sangre..... 24
6.5. Deslipidación y precipitación de IgY 24
6.5.1. Liberación de la yema 24
6.5.2. Deslipidación de la yema 24
6.5.3. Precipitación de proteínas 24
6.5.4. Diálisis de las solución proteica..... 25
6.6. Determinación de la cantidad proteica por espectrofotometría 25
6.7. Electroforesis de proteínas para IgY 25
6.8. Electroforesis de proteínas en acetato de celulosa..... 25
6.9. Evaluación de IgY anti-Leptospira..... 26
7.1. Determinación de la producción de anticuerpos anti-Leptospira en sangre 29
7.2. Determinación de la producción de anticuerpos IgY en yema de huevo..... 33
7.3. Diferencias en títulos entre sangre y yema de la vacuna LPS 37
7.4. Determinación de la concentración proteica por espectrofotometría 37
7.5. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida 38
7.6. Electroforesis de proteínas en acetato de celulosa..... 39
8. DISCUSIÓN 42
9. GLOSARIO..... 50
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51

INDICE DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1: Métodos de extracción de IgY. 20
Tabla 2: Plan de alimentación de las gallinas. 22
Tabla 3: Cronograma de inmunizaciones, recolección de huevos y sangrado. 23
Tabla 4: Antígenos utilizados para la prueba de microaglutinación (MAT). 26
Tabla 5: Organización de la microplaca para MAT 28
Tabla 6: Títulos obtenidos a partir de muestras de sangre en cuatro días del muestreo..... 29
Tabla 7: Titulación de los dializados obtenidos a partir de las yemas de huevos en cinco días del muestreo 33
Tabla 8: Absorbancia de las muestras del dializado a 280 nm. 38

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1: Fuentes y transmisión directa e indirecta de L. interrogans 6

Figura 2: Modelo epidemiológico de transmisión de L. interrogans..... 8

Figura 3: Mecanismo de lesiones tisulares causadas por leptospirosis. 16

Figura 4: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar autumnalis 30

Figura 5: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar bataviae 30

Figura 6: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar bratislava 31

Figura 7: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar canicola 31

Figura 8: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar copenhageni. 31

Figura 9: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar cynopteri..... 31

Figura 10: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar mini. 32

Figura 11: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar shermani. 32

Figura 12: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar autumnalis 34

Figura 13: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar bataviae 34

Figura 14: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar bratislava 35

Figura 15: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar canicola. 35

Figura 16: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar copenhageni 35

Figura 17: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar cynopteri..... 35

Figura 18: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar mini. 36

Figura 19: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar shermani. 36

Figura 20: Comparación entre la titulación máxima obtenida con la técnica MAT para suero sanguíneo y dializado de yema en los 8 serovares evaluados 37

Figura 21: Electroforesis de proteínas del dializado en gel de poliacrilamida. 38

Figura 22: Electroforesis de proteínas en acetato de celulosa para la muestra de vacuna comercial. 40

Figura 23: Electroforesis de proteínas en acetato de celulosa para la muestra de antígeno LPS. 41

1. RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad provocada por la espiroqueta *Leptospira interrogans,* y su importancia radica en el deterioro que causa en la calidad de vida de las personas infectadas y en las pérdidas económicas que produce en el sector pecuario. Además en Colombia la enfermedad es reemergente y en el Valle del Cauca están ya descritos los serovares circulantes. Por esto, se planteó como objetivo del estudio producir anticuerpos contra estos serovares por medio de la tecnología IgY, en la cual se aprovechan las ventajas que tienen los anticuerpos IgY sobre los IgM que son usualmente utilizados en pruebas de diagnóstico y tratamientos de profilaxis, incentivando el reemplazo del sangrado de mamíferos por la recolección de huevos de ave. Para producir los anticuerpos IgY se inocularon gallinas con un antígeno de lipopolisacárido (LPS) compuesto por un "pool" de los 8 serovares circulantes en el Valle del Cauca y con una vacuna comercial como control de antígeno, para luego extraer del huevo la inmunoglobulina Y por medio de deslipidación con cloroformo y precipitación con sulfato de amonio. La presencia de la proteína de interés fue verificada por medio de electroforesis en poliacrilamida y en acetato de celulosa. Finalmente, se comprobó que los anticuerpos obtenidos de gallina reaccionaron contra los serovares inoculados en la prueba de microaglutinación (MAT). Al comparar los títulos en sangre con los de dializado de huevo se encontró que en sangre fueron más altos y constantes para todos los serovares evaluados, y tanto en sangre como en huevo, la vacuna de LPS produjo mayores títulos que la vacuna comercial llegando a títulos máximos de 1:1280 para los serovares autumnalis y bratislava de *L. interrogans*.

2. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis reemergente en zonas tropicales, de gran importancia tanto por el deterioro que causa en la calidad de vida de las personas infectadas, como por las pérdidas económicas que produce en el sector pecuario. En las zonas tropicales los factores ambientales y climáticos favorecen la transmisión (Agudelo-Florez et al. 2007), pero sin lugar a dudas el factor que más influye en el contagio es el factor ocupacional.

La enfermedad es causada por la espiroqueta *Leptospira interrogans*. Esta especie infecta a multitud de animales, especialmente a mamíferos entre los cuales los roedores y los bovinos por tener una orina más alcalina son considerados los reservorios más importantes (Agudelo-Florez op. cit.), aunque los murciélagos han llamado también la atención de los investigadores por la abundancia de individuos y el contacto indirecto que tienen con los asentamientos humanos (Vinetz 2001). El contagio se da cuando los animales entran en contacto directo o indirecto con orina contaminada con leptospiras. En los seres humanos la infección se presenta en forma esporádica o en brotes epidémicos y produce síntomas prodromales como fiebre, mialgias, cefalea y anorexia; estos síntomas indeterminados hacen que el diagnóstico médico sea difícil, confundiéndose con dengue, malaria o fiebre hemorrágica (Vinetz op. cit.) y como consecuencia la enfermedad sigue su curso llegando a ser fatal en algunos casos (Agudelo-Florez et al. 2007). De ahí la importancia que tiene la corroboración del diagnóstico médico en el laboratorio.

Para la confirmación de *Leptospira* en el laboratorio existen diferentes pruebas, pero éstas tienen limitaciones que impiden un diagnóstico práctico, económico y certero. En la detección de *Leptospira* el estándar de oro para el diagnóstico es el cultivo en medio EMJH pero el crecimiento puede tardar hasta 4 meses lo que hace ineficaz este método (Faine et al. 1999). Se utiliza también la microscopia de campo oscuro y de contraste de fase, la tinción con plata de cortes histológicos, la PCR y pruebas biológicas inoculando hámsteres (Faine op. cit.), pero todas estas técnicas necesitan de personal con amplia experiencia, un laboratorio con suficientes recursos o implican sufrimiento animal.

Otras formas de diagnóstico se basan en la detección de la respuesta inmune producida por el infectado. Se utilizan técnicas como la determinación de IgM o IgG por ELISA, la

inmunofluorescencia indirecta, la prueba de microaglutinación en placa, la aglutinación por látex (Faine et al. 1999) y el test de micro aglutinación (MAT) que es recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como prueba de referencia para leptospirosis. Aunque esta técnica es de baja sensibilidad en fase aguda, su sensibilidad aumenta si se realizan muestras pareadas. Esta técnica resulta dispendiosa pues la OMS recomienda que cuando no se conozcan los serovares circulantes de *L. interrogans* se deben utilizar 22 serovares de los más comunes entre los 218 existentes (Organización Mundial de la Salud 1957), además para realizar la prueba se debe contar con una infraestructura adecuada de los laboratorios, con microbiólogos con experiencia y con la capacidad de mantener cultivos vivos de *Leptospira*.

Al ser el diagnóstico basado en la detección de la respuesta inmune el más usado actualmente, se hace necesario desarrollar nuevas técnicas como pruebas serológicas basadas en proteínas recombinantes y ensayos de captura de antígenos para ser aplicados en campo (Myers 1987, Flannery et al. 2001). En este contexto la IgY aviar tiene ventajas bioquímicas sobre la IgG mamífera, pues debido a las diferencias filogenéticas entre aves y mamíferos, la IgY logra identificar como extrañas proteínas que para la IgG no lo serían, mejorando así la sensibilidad y disminuyendo el ruido en las técnicas inmunológicas. Además, la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales requiere normalmente el uso de animales de laboratorio (conejos, ratones, ratas y cobayos) o grandes animales como ovejas, caballos y cabras y el procedimiento involucra dos pasos que causan distrés en los animales como son la inmunización y el sangrado.

La rentabilidad también es una ventaja de la tecnología IgY pues una gallina ponedora es capaz de producir entre 75 a 90 mL de yema semanalmente con 375 mg de IgY, mientras que un conejo produce aproximadamente 20 mL de sangre completa con 50 mg de IgG.

Se planteó entonces como objetivo de trabajo producir anticuerpos IgY contra *L. interrogans*, que pueden llegar a reemplazar a los IgG en pruebas de diagnóstico rápido con una sensibilidad más alta, que servirían para desarrollar pruebas que detecten el microorganismo en el tracto urinario de los portadores, o también para ser utilizados en la producción de vacunas contra una variedad más amplia de serovares, o con especificidad para los serovares de *L. interrogans* circulantes en el Valle del Cauca.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Leptospirosis

3.1.1. Características generales de la leptospirosis

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial (exceptuando los polos), causada por leptospiras patógenas que viven en los túbulos renales proximales de los riñones de los portadores, desde donde son excretadas en la orina y contaminan los suelos, barro, charcos, riachuelos y ríos. Las infecciones suceden por contacto directo con orina o indirecto con aguas contaminadas. Los portadores son animales crónicamente infectados, que pueden ser silvestres o domésticos, especialmente roedores y marsupiales. Los humanos no son considerados portadores crónicos, pero sufren infecciones agudas, y algunas veces, con secuelas a largo plazo (Faine et al. 1999).

La enfermedad en humanos varía en severidad de acuerdo con el serovar infectante de *Leptospira*, la edad, salud y nutrición del paciente. Varía desde una enfermedad similar a influenza ligera, hasta una falla hepatorrenal, miocarditis, hemorragias y muerte. La infección congénita ocurre en humanos y también en animales, en los que causa pérdida de la productividad del ganado a través de abortos, pérdida en la producción láctea y fallas en el desarrollo (Faine et al. 1999).

Hay una importante asociación ocupacional en el campo de la producción animal (granjas lecheras, porcicultura, hospitales, clínicas veterinarias) y un riesgo universal de infección mediada por roedores portadores, prevalente en países tropicales, donde muchos serovares pueden estar presentes en una localidad (Ferro et al. 2006). Cada serovar puede estar asociado con una severidad característica de la enfermedad, y un rango estrecho de hospedero natural, o ambos; algunas veces la distribución geográfica es restringida. Las principales asociaciones reconocidas en el mundo son: serovar hardjo con el ganado, pomona con cerdos y roedores, y los serovares icterohaemorrhagiae, copenhageni, bataviae, autumnalis, australis y javanica con ratas y otros pequeños roedores. En un estudio

realizado en Corea, se determinó que el principal serovar portado por la rata trepadora (*Rattus rattus*) era canicola (Rim et al. 1993).

3.1.2. Taxonomía de *Leptospira*

Las leptospiras están entre las bacterias filogenéticamente menos derivadas. Pertenecen al Orden Spirochaetales, Familia Leptospiraceae; esta familia solo posee 2 especies*:* *Leptospira biflexa* que incluye organismos saprofitos o de vida libre, y *Leptospira interrogans* que incluye los organismos patógenos que a su vez son clasificados por criterios serológicos de microaglutinación y hasta el 2011 se conocen 23 serogrupos con más de 200 serovares (Pacciarini et al. 1992, OIE 2008, Rodríguez 2010).

En la clasificación serológica el serovar es el taxón básico, y desde que Wolff y Broom acuñaron el término serovar en 1954 éste ha sido utilizado en la clasificación sistémica, en la aplicación práctica y en la descripción de la relación parásito-hospedero. La clasificación por criterios serológicos tiene gran importancia epidemiológica (Kmety & Dikken 1978) y se basa en el hecho de que la determinación de los serovares se da por la aglutinación producida después de una absorción cruzada con antígenos homólogos (Faine 1999). Dentro de ambas especies de *Leptospira* cada serovar se diferencia entre si, por la composición antigénica de la membrana, por eso los serovares relacionados antigénicamente se clasifican bajo el mismo serogrupo, existiendo reacciones cruzadas entre algunos serogrupos y especialmente entre serovares del mismo serogrupo (Kmety & Dikken 1978).

Las Leptospiras miden de 6 a 20 µm de largo y 0,1 a 0,2 µm de ancho, son helicoidales, con las extremidades en forma de gancho, muy móviles, aerobias estrictas y de crecimiento eficaz en medio líquido, utilizan amonio como fuente de nitrógeno, ácidos grasos no saturados como fuente de carbono para sus lípidos celulares y en sus ácidos nucleicos incorporan bases externas de purina, pero no de pirimidina. El pH ideal para su crecimiento es 7,2 a 7,6, y la temperatura de 28 a 30°C. El crecimiento óptimo es alcanzado de los 6 a 14 días. Tienen propulsión propia por un mecanismo flagelar contenido dentro de una envoltura (Faine et al. 1999).

Son muy susceptibles a influencias ambientales, sobre todo al desecamiento, y ninguna crece fácilmente en colonias de superficie o medios sólidos. Debido a estas propiedades, los métodos usuales para cultivo, identificación y clasificación de bacterias convencionales tienen aplicación poca o nula a las espiroquetas (Chidambaram et al. 2007).

Las leptospiras no pueden visualizarse con el microscopio de luz transmitida y se tiñen mal con los colorantes de anilina, por lo tanto, se debe utilizar la microscopía de campo oscuro, en donde se observa con su forma típica de gancho y sus movimientos característicos aparecen como traslación y una rotación alternada alrededor del eje, sin diferenciación de polos (Faine, 1999).

Las leptospiras crecen en medios especiales, siendo el más utilizado el de Ellinghausen-Mc Cullough modificado por Johnson y Harris (EMJH), que puede enriquecerse con 1 a 2% de suero normal y estéril de conejo. También son usados los medios de Fletcher y Stuart entre otros, que básicamente comprenden soluciones salinas tamponadas y suero normal estéril de conejo al 8 – 10% (Stanchi et al. 1991).

3.1.3. Epidemiología

El desconocimiento de la enfermedad, la proporción de infecciones subdiagnosticadas y la no disponibilidad de los métodos de diagnóstico en aéreas endémicas, hacen que la incidencia real de la leptospirosis sea incierta. Faine et al. en 1999, describió las fuentes y los tipos de transmisión de leptospirosis en aéreas endémicas (ver figura 1).

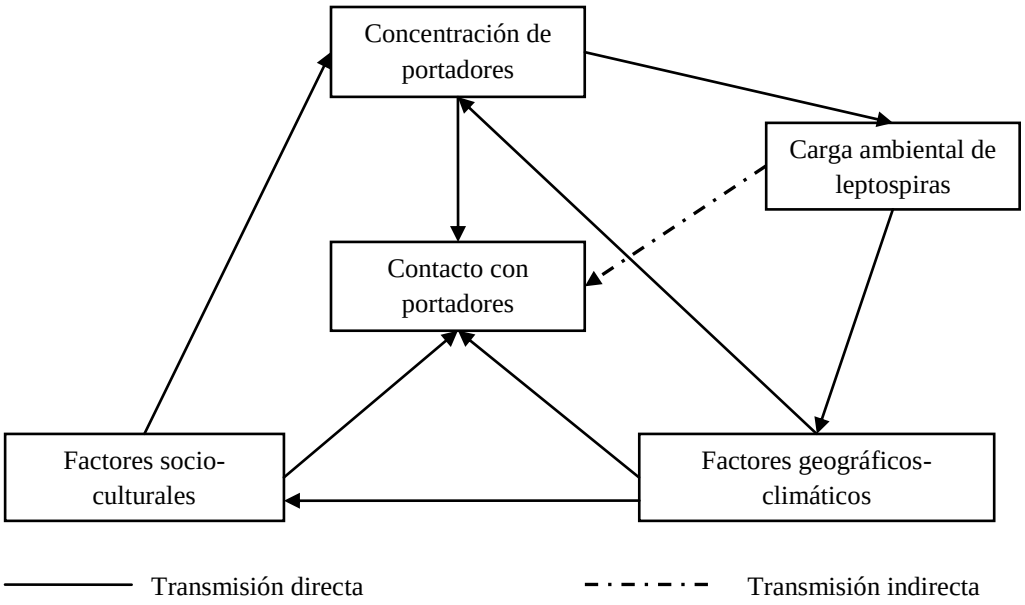


Figura 1: Fuentes y transmisión directa e indirecta de *L. interrogans*
Tomado y modificado de Faine et al. 1999.

Faine et al., en 1999, también describen tres modelos epidemiológicos (ver figura 2), el primer modelo es el de los casos que ocurren en climas templados donde son pocos los serovares que están involucrados en la infección humana, la infección se da en general por contacto directo con animales domésticos y el control se realiza por medio de la inmunización de animales o de humanos. El segundo ocurre en áreas tropicales donde hay muchos serovares que infectan a humanos y animales y además hay un gran número de reservorios; la exposición humana no está limitada a la ocupación sino a la contaminación medioambiental, en especial durante la época de lluvias y el control se realiza directamente en roedores, mejorando el saneamiento en estas áreas y la higiene profesional para prevenir los casos de leptospirosis humana. Posiblemente son áreas donde ocurren los brotes tras la ocurrencia de diluvios, huracanes u otros desastres. El tercer modelo ocurre cuando la infección en los roedores es llevada al ambiente urbano, en los casos en los que se altera la infraestructura urbana debido a factores como guerras o catástrofes naturales (Céspedes et al. 2002).

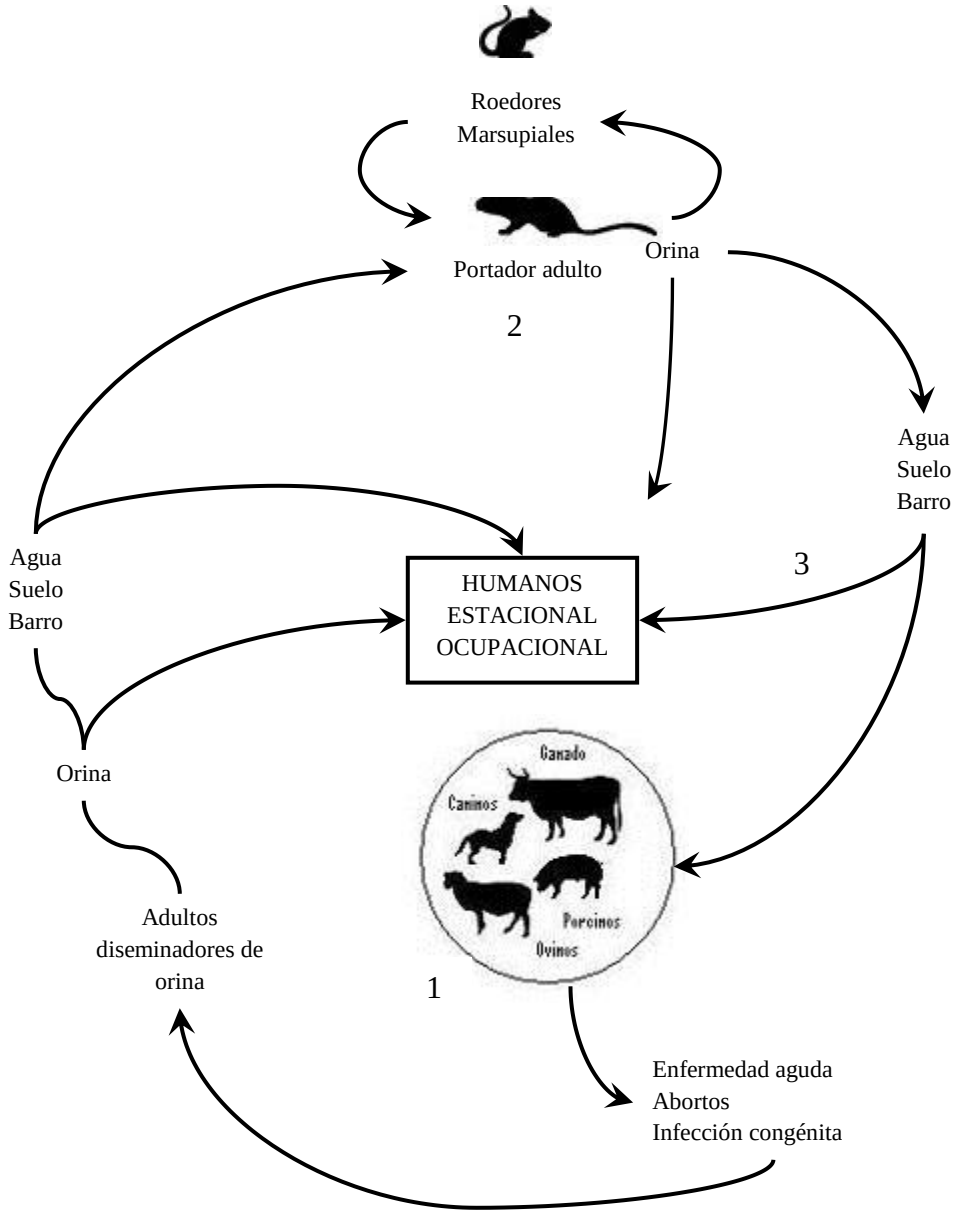


Figura 2: Modelo epidemiológico de transmisión de *L. interrogans*
Tomado y modificado de Faine et al. 1999.

3.1.4. Situación actual de la leptospirosis

En las últimas dos décadas se han reportado en el mundo varios brotes en poblaciones humanas. El primero fue en Brasil, en el Hospital Veterinario de la Universidad Federal de Santa María, entre octubre de 1998 y enero de 1999 (Carneiro et al. 2004); el segundo fue en Hawái, en noviembre de 2004, luego de una inundación (Gaynor et al. 2007); el tercer

brote fue en Shizuoka, Japón en marzo de 2005, por importación de ardillas de Miami, EE.UU (Masuzawa et al. 2006) y el cuarto brote fue en Alemania en julio de 2007, entre recolectores de fresas (Desai et al. 2009). Cabe anotar que los casos anteriormente descritos no son los únicos, se han registrado casos de pequeños brotes alrededor del mundo, como es el caso descrito por Arias y colegas (2003), en el que se vieron infectados varios niños que se bañaron en una piscina contaminada.

En Colombia existen algunos trabajos en epidemiología y enfermedad de animales, (De León et al. 2002a, De León et al. 2002b, Uribe et al. 2003, Agudelo-Florez et al. 2007, Agudelo-Florez et al. 2008, Díaz et al. 2008, Agudelo-Florez et al. 2009) en donde se describe especialmente el papel de la rata y del agua en la transmisión de leptospirosis en granjas porcícolas, sin embargo, existen pocos registros sobre prevalencia de la enfermedad en humanos. El primer registro fue a finales de la década de los 60, donde se reconoce la enfermedad humana causada por el serovar icterohaemorrhagiae con 4,28% de humanos positivos (Bravo & Restrepo 1970), y el único brote epidémico documentado en el país se inicia en agosto de 1995 en el Atlántico donde se aisló icterohaemorrhagiae, pomona y canicola de un total de 47 casos confirmados y una letalidad del 17% (Marotto et al. 1999). En los estudios realizados por Orrego y colegas (2003) encontraron que el 22,4% de los trabajadores de una granja lechera en Antioquia tenían títulos para *Leptospira.* Por su parte, Najera y colegas (2005), encontraron que el 11% de los trabajadores de carnicerías y arroceras en Córdoba y Sucre tenían títulos para *Leptospira*.

Ferro y colegas (2006) encontraron prevalencias de anticuerpos de 23,3% en la ciudad de Cali. Otros estudios realizados por Astudillo y colegas (2009), indican que la seroprevalencia de leptospirosis en el Valle del Cauca es del 20,7% demostrando que la leptospirosis constituye un problema de salud pública en el Valle del Cauca y que la enfermedad no solo se manifiesta como un problema ocupacional de zonas rurales, porque cerca de 70 % de los casos identificados radicaban en ambientes urbanos. Al evaluar los casos presuntivos, se pudieron determinar los serogrupos de importancia epidemiológica en el Valle del Cauca, entre los cuales icterohaemorrhagiae fue el de mayor reactividad serológica, seguido por los serogrupos bataviae, cynopteri, canicola, mini y Shermani en ese orden (Astudillo et al. 2009). Por su parte, Romero y colaboradores (2009) al investigar

la seroprevalencia de leptospirosis en perros con dueño en el municipio de Buenaventura, encontraron que la prevalencia de anticuerpos fue del 31% y los serovares más frecuentes fueron icterohaemorrhagiae, autumnalis y australis en ese orden.

3.1.5. Diagnóstico

La bacteria se detecta por medio de aislamiento o demostración de leptospiras en órganos internos y fluidos corporales de animales clínicamente infectados, ofreciendo un diagnóstico definitivo de enfermedad clínica aguda (Faine et al. 1999). También se puede aislar de riñón, orina, o tracto genital de animales sin signos clínicos, lo que sirve sólo para diagnosticar el estado de portador crónico. El aislamiento seguido por la tipificación de portadores renales es muy útil en estudios epidemiológicos para determinar cuáles serovares están presentes en un grupo de animales en particular, especies o región geográfica (Faine et al. 1999).

La demostración de leptospiras a través de pruebas inmunoquímicas (inmunofluorescencia e inmunohistoquímica) son las más adecuadas para los laboratorios. Sin embargo, la eficacia de éstas depende del número de organismos presentes en el tejido; éstas carecen de la sensibilidad del cultivo, no detectan el serovar infectante, y los resultados deben ser interpretados junto con los resultados serológicos. Los reactivos para inmunofluorescencia son los sueros que tengan títulos altos de IgG anti-*Leptospira*, no disponibles comercialmente (Libraty et al. 2007).

3.1.5.1. Diagnóstico serológico

La falta de sospecha de la enfermedad es un problema donde hay endemismo de otras enfermedades febriles hemorrágicas. El diagnóstico oportuno se basa en una prueba efectiva ya que la enfermedad es inespecífica en la fase temprana (Levett, 2001, Barthi et al. 2003), por lo que se necesita desarrollar nuevas técnicas como pruebas serológicas basadas en proteínas recombinantes y ensayos de captura de antígenos para ser aplicados en campo (Myers 1987, Flannery et al. 2001). Se han diseñado varias pruebas de ELISA, pero ofrecen amplios rangos de sensibilidad (28-72%) y especificidad (10-90%) (LaRocque et al. 2005, Ismail et al. 2006).

En la práctica, el pilar principal de leptospirosis es la serología. El diagnóstico por laboratorio es de dos tipos, el primer tipo detecta anticuerpos anti-*Leptospira* (MAT o ELISA) ya que los anticuerpos aparecen un par de días después de la infección y perduran por semanas, meses e incluso años; y el segundo tipo detecta leptospiras, antígenos de leptospiras, ácidos nucleídos en tejidos ó líquidos corporales (inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o PCR) pero estos resultan costosos y poco específicos (Chidambaram et al. 2007). La selección del método depende del propósito (por ejemplo, análisis grupales o individuales), los recursos disponibles y el nivel de experiencia del microbiólogo.

3.1.5.2. Prueba de microaglutinación (MAT)

La MAT es la técnica de referencia, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Internacional de Epizootia (OIE) (Organización Mundial de la Salud 1957). Es usada principalmente como técnica grupal, pero si se usa como una prueba individual es muy útil para diagnosticar infección aguda. La MAT se utiliza como prueba de presunción de la infección y es posible encontrar animales sanos seropositivos durante mucho tiempo debido a infecciones antiguas y animales seronegativos con infecciones activas y leptospirúricos.

La MAT tiene algunas limitantes en cuanto al diagnóstico de infección crónica de individuos o de infecciones endémicas en grupos. Los animales infectados pueden abortar o ser portadores renales/genitales con títulos de MAT por debajo del mínimo aceptado de 1:100 (dilución final) (Ochoa et al. 2000). La sensibilidad de la prueba puede ser mejorada utilizando cultivos de serovares locales en vez de cepas de referencia, aunque éstas últimas ayudan en la interpretación de los resultados entre laboratorios.

La especificidad de la MAT es buena pues en general, los anticuerpos contra otras bacterias no hacen reacción cruzada con *Leptospira* (Myers 1987); sin embargo, sí pueden existir reacciones cruzadas entre serovares de *Leptospira* o pueden detectarse títulos contra serovares que no son los causantes de la enfermedad actual si el animal ha sido vacunado antes, por lo cual se debe considerar la historia de vacunación de los animales a estudiar (Myers op cit.).

Debido a la reactividad cruzada de ciertos anticuerpos entre los serovares antigénicamente relacionados, la MAT se considera una prueba específica de serogrupo (Myers op. cit.). En general, al menos un serovar, entre un amplio rango de serogrupos, se incluye en un panel de MAT, así como todos los serovares importantes localmente. Si se cuenta con un panel diverso y grande, se aumentan las probabilidades de detectar infecciones con serovares nuevos o no comunes, pero aumenta la complejidad en interpretar el análisis debido a que aumenta la probabilidad de detectar reacciones cruzadas de anticuerpos (Myers op. cit.).

Los antígenos seleccionados para la MAT deben incluir cepas representativas de los serogrupos conocidos en la región particular, y aquellos que se sepa son mantenidos por las especies hospederas a estudiar (Myers op. cit.). Desafortunadamente, los títulos de anticuerpos pueden caer a niveles indetectables, mientras los animales permanecen crónicamente infectados. Para sobrepasar este problema, se necesitan métodos sensibles que detecten el organismo en la orina o el tracto genital de los portadores crónicos.

3.1.5.3. Observación directa

Al encontrarse leptospiras en la sangre durante la primera semana, se puede utilizar el método de observación directa en campo oscuro, aunque no es recomendable ya que *Leptospira* puede confundirse fácilmente con artefactos como filamentos de fibrina (Faine 1999). En las semanas siguientes, pueden visualizarse en orina, previa concentración por centrifugación y también pueden observarse y aislarse del LCR hacia el final de la primera semana de la enfermedad (Faine op. cit.). Estos métodos tienen limitaciones como son la necesidad de un gran número de microorganismos y la de equipos que muchas veces no están al alcance de laboratorios pequeños.

Leptospira no tiñe adecuadamente con anilinas, se ha intentado tinción prolongada con Giemsa obteniendo resultados pobres. La observación con fluoresceína indirecta se realiza con Ig de conejos inmunizados con distintas cepas de leptospiras y revelados con anti-Ig de conejo conjugado con fluoresceína (Faine op. cit.).

3.1.5.4. Diagnóstico diferencial

La leptospirosis se presenta en muchas formas inespecíficas, por lo que un diagnóstico clínico preciso se puede realizar únicamente cuando hay una combinación de endemismo,

diagnósticos específicos de pacientes similares y experiencia de los clínicos. Los diagnósticos erróneos más frecuentes son influenza “enfermedad viral”, meningitis aséptica, hepatitis o pirexia de origen desconocido (Carneiro et al. 2004).

Debido a que se considera una enfermedad ocupacional, en grupos ocupacionales selectos, el diagnóstico debe ser considerado de forma temprana en cualquier paciente en cuyo diagnóstico clínico inicial se sospeche influenza, enfermedad viral, rickettsiosis (fiebre Q, tifus), borreliosis, brucelosis, toxoplasmosis, malaria, pielonefritis (Laguna 2000) o una variedad de enfermedades similares prevalentes localmente.

3.1.6. Inmunidad

La inmunidad en apariencia es exclusivamente humoral, y puede ser transferida pasivamente vía placenta, calostro o suero (Faine 1999). El secuestro intracelular de leptospiras y la inmunidad celular no son importantes en la resistencia a la reinfección. Sin embargo, las leptospiras pueden persistir en los riñones, cerebro y tracto genital en animales y en sitios de secuestro (cámara anterior del ojo) en humanos (Faine op. cit.).

Ante la agresión producida por las leptospiras, el organismo reacciona primariamente con una respuesta sérica caracterizada por la producción de inmunoglobulinas (Ig) del isotipo IgM, que pueden detectarse con el método de microaglutinación (MAT) del quinto al séptimo día del comienzo de la infección (Levett, 2001). Las IgM están dirigidas contra distintos epítopes del microorganismo, pero las de mayor importancia y a las cuales se les asigna actividad protectora son inducidas por el lipopolisacárido (LPS). La producción de IgG es inconstante en el hombre, siendo en muchos casos imposible de establecer su expresión; en otros, por el contrario, aparece tan tempranamente como la IgM, al parecer, dependiendo de la cepa actuante (Faine et al. 1999).

Los animales domésticos parecen seguir el patrón general de producción de Ig: en la etapa aguda se ve involucrada la IgM, para luego producir IgG (Faine 1999). Los animales silvestres se comportan sin patrón fijo, ya que no todos producen reacción evidente al analizarlos con MAT y si lo hacen, suelen establecerse muy bajos niveles de anticuerpos.

La especificidad de las Ig es generalmente de serovar, aunque se observan títulos mayores cuando la cepa infectante es homóloga a la utilizada en MAT. Sin embargo, es común en las primeras etapas de la infección, la producción de anticuerpos que aglutinen varias serovares del mismo o distinto serogrupo, éste fenómeno es denominado co-aglutinación (Moore et al. 2006), por eso no puede confirmarse por esta técnica la responsabilidad de un determinado serovar en la infección, se cree que el serovar que se detecte aglutinado en la dilución más alta, indica el serogrupo infectante, debido a que las reacciones cruzadas entre los serovares son comunes.

Algunos factores pueden interferir con la respuesta inmune, entre los que se encuentran el antígeno: dosis y peso molecular y tipo de adyuvante empleado; la ruta de aplicación, la frecuencia de inmunización y el intervalo entre inmunizaciones.

3.1.7. Tratamiento, prevención y control

El tratamiento antibiótico es efectivo dentro de los primeros 7 a 10 días de la infección. Debe ser administrado inmediatamente si se sospecha de la enfermedad o está diagnosticada. El tratamiento antibiótico rápido y efectivo puede reducir el avance de los síntomas y la probabilidad de secuelas. Puede de esta forma prevenir el progreso hacia las manifestaciones más severas de la enfermedad (Stork et al. 2010).

Las leptospiras son sensibles a la mayoría de antibióticos y la terapia con penicilina es valiosa y esencial. Los antibióticos eliminan las leptospiras de los tejidos accesibles pero no hacen reversión de los cambios patológicos ya establecidos, que continúan su curso y deben ser tratados sintomáticamente o con terapia no antibiótica apropiada (Faine et al. 1999).

La prevención es difícil pero la vigilancia puede establecer hasta qué punto hay riesgo, y las fuentes más probables de infección. Las medidas de higiene ocupacional como ropas protectoras y evitar salpicar agua u orina son útiles pero difíciles de implementar debido a que dificultan el trabajo o son inaceptables tanto para trabajadores como empleadores en lo que se refiere a costo y baja efectividad (Faine 1999).

Las vacunas para las personas han sido utilizadas exitosamente en China, Japón, Italia y España (Edwards et al. 1988). La vacunación del ganado puede reducir la diseminación por

orina y el riesgo a los trabajadores, especialmente, y quizás, solamente, cuando se asocia a un alto nivel educativo, advertencias, cooperación e higiene en la comunidad, y apoyo del empleador.

3.1.8. Patogénesis y patología

Las leptospiras entran por pequeñas cortadas o abrasiones e inclusive a través de la piel mojada, o por inhalación de aerosoles de orina (Agudelo-Florez et al. 2009). Se distribuyen inmediatamente circulando por el torrente sanguíneo y son fagocitadas por los macrófagos tisulares en hígado y pulmón. Esta fase bacteriémica es significativa en diagnóstico y dura de 1 a 7 días. Cuando el número de leptospiras alcanza niveles críticos en tejidos y sangre, aparecen los signos y las lesiones debidas a la acción de la toxina de *Leptospira* (Faine 1999).

Entre las 24 a 48 horas post infección, los microorganismos pueden aislarse de todos los tejidos, inclusive del líquido cefalorraquídeo (LCR), aun sin lesión manifiesta del sistema nervioso central (SNC) (Céspedes et al. 2002, Agudelo-Florez et al. 2008).

Su rápida difusión en el hospedero se debe a la producción de hialuronidasas (factor de difusión) por parte de la bacteria. No se conoce bien cuáles son los factores responsables de la virulencia de las leptospiras, pero es probable que factores inherentes a propiedades virulentas específicas (debido a plásmidos), sumados a factores del hospedador, desempeñen un papel importante en la producción de la infección (Stanchi et al. 1991).

La lesión principal es el daño al endotelio de los vasos sanguíneos pequeños, lo que lleva a una isquemia localizada en los órganos, produciéndose una necrosis tubular renal, daño hepatocelular, meningitis y placentitis (Faine et al. 1999). Experimentalmente se ha demostrado que la lesión histopatológica principal (un mes después de la inoculación, no antes) es la nefritis intersticial (Tucunduva de Faria et al. 2007). Terron et al. en 2007 describieron el mecanismo de lesiones tisulares causadas por la leptospirosis (ver figura 3).

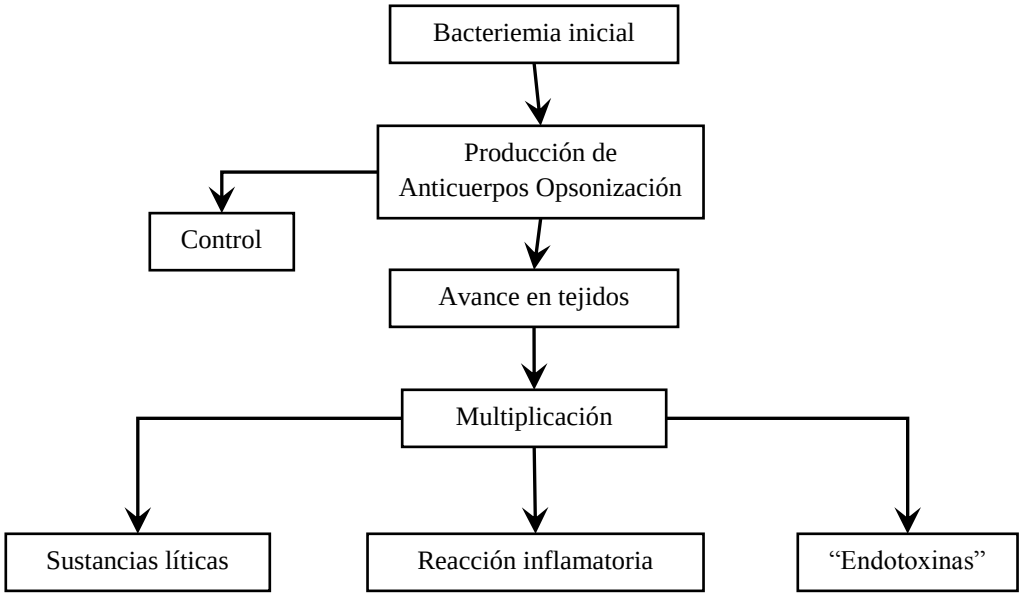


Figura 3: Mecanismo de lesiones tisulares causadas por leptospirosis.
Tomado y modificado de Terron et al. 2007.

Los hallazgos histológicos y clínicos, en humanos y animales, sugieren que la patogenicidad de las leptospiras se debe parcialmente a toxinas, enzimas u otros metabolitos elaborados o eliminados por las leptospiras lisadas. Estos hallazgos presentan similitud con aquellos derivados de bacterias Gram negativas (Stanchi et al. 1991) lo que sustenta con firmeza que las endotoxinas sean responsables de la acción patógena de las leptospiras. Se ha demostrado que la severidad de las lesiones se correlaciona positivamente con el número de microorganismos presentes, al igual que las muertes que ocasiona (Stanchi op. cit.).
La falla de la función renal es causa de muerte en muchos pacientes; la nefritis intersticial es la lesión renal fundamental, aunque se la ha encontrado solo tardíamente en el curso de la enfermedad (Edwards et al. 1990).

El daño tisular, aunque sea severo, puede ser reversible y ser seguido de una reparación completa (por ejemplo riñones, hígado) aunque el daño a largo plazo (miocarditis) puede ser una complicación que puede llevar a cicatrización, resultado bien reconocido en los riñones de perros y cerdos (Dupont et al. 1997).

En síntesis, la infección está caracterizada por una rápida proliferación y diseminación de los microorganismos en la mayoría de los tejidos, determinando una intensa y aguda disfunción generalizada. De las mismas características son la rápida formación de anticuerpos específicos con una virtual desaparición de las leptospiras de todos los tejidos exceptuando el riñón. Muchos aspectos de la patogénesis de la leptospirosis permanecen aun sin explicar (Stanchi et al. 1991).

3.2. Tecnología IgY

En 1893 Klemper publicó sus observaciones acerca de la existencia de proteínas neutralizantes en la yema del huevo de gallinas inmunizadas, sin embargo, solo en los últimos 20 años ha cobrado un gran interés en el ámbito científico debido a las ventajas que tiene sobre la producción de anticuerpos en mamíferos (Chacana et al. 2004).

Tradicionalmente los anticuerpos monoclonales y policlonales han sido fuente de reactivos muy utilizados para diagnóstico y en este contexto los anticuerpos de gallina, presentan ventajas sobre los de mamíferos. Mientras el huevo está en el ovario, las gallinas transfieren inmunoglobulinas a la yema; IgM, IgA y otras proteínas son transferidas en el oviducto a la albúmina del huevo, IgY en el folículo, pasa por receptores (por lo tanto selectivamente) en grandes cantidades a la yema (Chacana et al. 2004, Romero & Sánchez 2009).

La concentración de IgY en la yema, es comparable con la concentración de IgY en el suero, 6-13 mg/ml (Gottstein & Hemmeler 1985). Reciente investigación genética sugiere que IgY es una molécula filogenéticamente progenitora de las IgG e IgE mamíferas. El suero de aves contiene las tres principales clases de Igs, IgA, IgM, IgY, sin embargo, estructuralmente hay una gran diferencia entre IgY de aves y la IgG de mamíferos (Björkman 2004).

La distancia filogenética es la razón por la cual se pueden obtener anticuerpos con distinta especificidad, aún cuando pollos y mamíferos sean inoculados con los mismos protocolos de inmunización. En el caso de proteínas ó péptidos altamente conservados, las aves producen anticuerpos más eficaces que los conejos. Esto se debe a que existe una mayor similitud entre las secuencias proteicas humanas con las de conejos, que las de conejo con

las de pollos (Larson et al. 1993). El sistema inmune del conejo es incapaz de reconocer una proteína humana como una sustancia extraña. Por el contrario, esta misma proteína tiene mayor probabilidad de ser detectada como extraña por el sistema inmune de un ave (Schade et al. 2005, Chalghoumi et al. 2009).

En contraste con las Igs de mamíferos, las IgY no activan el sistema del complemento no reaccionan con el factor reumatoideo, anticuerpos IgG de ratón antihumanos, receptores Fc o bacterianos (Mahdavi et al. 2010).

Comparando la producción de anticuerpos entre gallinas y conejos, una gallina produce generalmente de 5 a 6 huevos por semana, con un volumen de yema de aproximadamente 15 mL por huevo (Hamal et al. 2006), con concentración de anticuerpos comparable con la del suero, por lo tanto en una semana, una gallina produce la cantidad equivalente a 75-90 mL de suero o 150-180 mL de sangre completa (Gottstein & Hemmeler 1985), un conejo inmunizado, produce aproximadamente 20 ml de sangre completa por semana. Los grandes mamíferos, pueden producir más anticuerpos que una gallina, pero a mayores costos, además la extracción de la sangre consume mucho tiempo y estresa al animal.

3.2.1. Bioquímica de la IgY

Las IgY son estables en el tiempo, perduran hasta por diez años a 4°C, seis meses a temperatura ambiente y durante un mes a 37°C sin pérdida de actividad (Akita & Nakai 1993). La IgY tiene un punto isoeléctrico que varía entre 5,7 y 7,6 (Chacana 2004) y así como otras inmunoglobulinas tiene dos cadenas livianas de ~25 kDa cada una y dos cadenas pesadas que pesan ~60 kDa cada una, dando un peso total aproximado de 180 kDa (Narat 2003, García et al. 2005). Cada cadena pesada posee un dominio variable y cuatro dominios constantes, a diferencia de la IgG que posee un dominio constante menos. Esta región constante adicional se une a dos cadenas de carbohidratos y es la razón por la que la IgY tiene un peso molecular superior a la IgG (Narat 2003, Raj et al. 2004).

3.2.2. El antígeno

Mucho o muy poco antígeno induce supresión, tolerancia u otra inmunomodulación indeseable (Bek et al. 1996). Camenisch y colegas (1999), encontraron que la inyección de

antígeno entre 10 ug y 1 mg genera buena respuesta de anticuerpos, por lo que recomiendan utilizar entre 10-100 µg de antígeno proteico.

3.2.3. El adyuvante

La inducción de un título de anticuerpo de manera alta y sostenible necesita el uso de adyuvante. Hay más de 100 adyuvantes conocidos con diferencias en sus características químicas, eficacia para estimular el sistema inmune y evitar efectos secundarios (Bek et al. 1996). El adyuvante completo de Freund (FCA) es el más efectivo para la producción de anticuerpos en animales de laboratorio y está compuesto por una solución acuosa del antígeno junto con aceite mineral, un agente dispersarte como el manoleato (Morris et al. 1999) y bacterias muertas por calor entre las cuales están *Mycobacterium* spp., *Corynebacterium parvum*, y *Bordetella pertussis* (Allison & Byars 1991). Respecto a la resistencia del tejido por el uso de FCA, hay resultados diferentes, unos sugieren que las gallinas muestran alta resistencia a daño del tejido por FCA (Hanly et al. 1995), y otros no han encontrado igual resultado (Kapoor et al. 2000). Para evitar inflamación local, se utiliza adyuvante incompleto de Freund (FIA), que es igual al FCA pero sin bacterias, aunque es menos eficiente y por eso algunos autores utilizan una mezcla de los dos: FCA en la primera inmunización y FIA para las otras dosis (Chalghoumi et al. 2009).

3.2.4. Inoculación

Para la inoculación de aves, la ruta intramuscular en la pechuga es la más usada. Generalmente no se recomienda inyectar en la pierna para evitar que se picoteen; también se pueden inyectar subcutáneamente en el cuello pero puede causar estrés en jóvenes (Hanly et al. 1995). Se deben realizar mínimo dos inmunizaciones. Los títulos deben ser chequeados 15 días luego de la última inmunización. Si el título de anticuerpos no aumenta o comienza a disminuir, deben aplicarse refuerzos, para mantener la producción por más de un año (Hanly op. cit.) y el intervalo de inmunizaciones más común es de dos a cuatro semanas.

3.2.5. Extracción de IgY

Los lípidos y las proteínas son el principal componente de la yema. La fracción de lípidos es 1/3 del contenido de la yema e incluye triglicéridos, fosfolípidos y colesterol. Las proteínas son 15-17% de la yema, las cuales deben ser separadas por centrifugación en dos principales fracciones, el gránulo (precipitado en centrifugación) y el plasma (sobrenadante claro) (Bajan et al. 2003).

La IgY es la fracción predominante en las γ-livetinas (proteínas de alta densidad HDL) (Chalghoumi et al. 2009). La separación de IgY requiere la remoción de la lipoproteína y la recuperación de la fracción soluble en agua (WSF) seguida de purificación de la IgY para separarla de las otras livetinas (Jensenius et al. 1981).

Para la remoción de lipoproteínas y la recuperación de WSF existen varios métodos (ver tabla 1) entre los cuales el más efectivo es el de dilución en agua probado por Akita en 1992, pues produjo el más alto nivel de IgY (91%) con 31% de pureza, y actividad similar a la obtenida con otros métodos (Hassl & Aspock 1988).

Tabla 1: Métodos de extracción de IgY.
Tomado de: Chalghoumi et al. 2009.

Table 1. Summary of the IgY crude extraction methods — *Sommaire des méthodes d'extraction brute de l'IgY.*

Method	References
Water dilution method	
Centrifugation	Akita et al., 1992
Filtration	Kim et al., 1996
Lipoprotein precipitation	
Polyethylene glycol precipitation	Polson et al., 1980; 1985
Anionic polysaccharide precipitation	Jensenius et al., 1981; Hatta et al., 1990
Lipoprotein removal by organic solvents	Bade et al., 1984; Polson et al., 1990; Horikoshi et al., 1993
Lipoprotein removal by specific chemicals	Vieira et al., 1984; Yokoyama et al., 1993; McLaren et al., 1994

La recuperación de la WSF, puede ser seguida por la separación de la IgY de otras proteínas solubles en agua, (α- y β-livetinas) y el resto de LDL. Tres clases de separación pueden ser utilizadas para eliminar estos contaminantes, como la precipitación, la cromatografía y la filtración (Chalghoumi et al. 2009).

4. OBJETIVOS

4.1. General

1. Producir anticuerpos IgY específicos contra algunos serovares de *Leptospira interrogans*.

4.2. Específicos

1.1. Producir anticuerpos IgY en gallinas contra los 8 serovares de *Leptospira interrogans* que circulan en el Valle del Cauca.

1.2. Establecer la concentración de IgY producida por vacunación contra los 8 serovares, verificando el reconocimiento de los IgY producidos ante los lipopolisacáridos de *Leptospira* mediante una prueba de microaglutinación.

5. HIPÓTESIS Y RESULTADOS ESPERADOS

Con una mezcla de antígenos de los serovares circulantes en el Valle del Cauca, se pueden producir anticuerpos IgY en gallinas específicos para *Leptospira interrogans*.

6. METODOLOGÍA

El proyecto se basó en un estudio de tipo experimental que se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico de Leptospirosis del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle en Cali.

Se utilizaron 6 gallinas de raza Catalana Negra, de 150 días de edad, dos fueron inoculadas con un antígeno que contenía bacterias enteras, denominado lipopolisacárido (LPS), dos fueron inoculadas con la vacuna comercial para tomarlas como controles de antígeno positivos y dos no fueron inoculadas para ser el control negativo. Las gallinas se mantuvieron emparejadas en jaulas de 128 x 65 x 80 cm y se alimentaron con pienso para ponedoras y una ración verde diaria (ver tabla 2).

Tabla 2: Plan de alimentación de las gallinas.

Hora	**6:00 am**	**11:00 am**	**3:00 pm**
Alimento por gallina	58 gramos de pienso para ponedoras	58 gramos de alimento verde	58 gramos de pienso para ponedoras

6.1. Composición y preparación del antígeno de lipopolisacáridos (LPS)

Se utilizó una mezcla de los serovares circulantes en el Valle del Cauca, provenientes del Royal Tropical Institute de Holanda. Se usaron cultivos de *L. interrogans* de los serovares icterohaemorrhagiae autumnalis, bataviae, bratislava, canicola, cynopteri, mini y shermani, crecidas en medio Ellinghausen modificado por Jhonson y Harris (EMJH) en cultivo agitado durante 7 días a 28°C.

Para las cuatro primeras dosis los cultivos fueron inactivados por separado con formol glacial y se dejaron durante 24 horas en refrigeración para asegurar que no estuvieran vivos al momento de la inoculación. Los cultivos se mezclaron en un tubo de 5ml, se realizaron 3 lavados con PBS al 10% en centrifugadora refrigerada a 13°C durante 10 minutos y se guardaron en refrigeración para su uso posterior. Para las tres dosis finales, se mezclaron en iguales proporciones los serovares y se inoculó el antígeno vivo para aumentar los títulos en sangre.

6.2. Composición de la vacuna comercial.

La vacuna comercial de uso humano, es una vacuna trivalente que contiene una suspensión de células enteras de *L. interrogans* pertenecientes a los serogrupos Canicola, serovar canicola, Icterohaemorrhagiae, serovar copenhageni y Pomona, serovar mozdok, inactivadas con formaldehido y como adyuvante utiliza gel de hidróxido de aluminio.

6.3. Esquema de vacunación y recolección de huevos

Al inicio de la experimentación se sangraron las gallinas para evaluar que no existieran títulos previos contra *Leptospira*, entonces se procedió a realizar la primera inmunización con un volumen de 0,5 ml de antígeno inactivo y 0,5 ml de adyuvante completo de Freund (FCA), la segunda inmunización se realizó con 0,5 ml de antígeno inactivo y 0,5 ml de adyuvante incompleto de Freund (FAI) para evitar reacciones del tejido del ave hacia los lípidos del adyuvante. Los refuerzos posteriores fueron: 1 ml de antígeno inactivo sin adyuvante y 2,5 ml, 5 ml y 7 ml de antígeno vivo sin adyuvante. Las inmunizaciones se realizaron el séptimo día, durante 7 semanas; se inyectó vía intramuscular una cantidad total de 16,5 ml de antígeno dividida en 4 puntos diferentes del músculo de la pechuga. Los huevos se recolectaron durante 33 días (ver tabla 3).

Estudios previos (Polson et al. 1980, Pinto et al. 2005, Mahdavi et al. 2010) recomiendan que la recolección se comience al día 56 de la primera inmunización pues es cuando los títulos en yema son más altos, sin embargo, como se incrementó la dosis y se inyectó antígeno vivo, la recolección de huevos comenzó al día 63 de la primera inmunización.

Tabla 3: Cronograma de inmunizaciones, recolección de huevos y sangrado.

Día	**1**	**8**	**12**	**15**	**22**	**28**	**35**	**42**	**63**	**67**	**68**	**82**	**88**	**96**
Evaluación de títulos en sangre	X		X			X						X		
Inoculación de Ag en ml	0,5	0,5		1	1	2,5	5	7						
Recolección de huevos y evaluación de títulos en yema									X	X	X	X	X	X

6.4. Evaluación de títulos en sangre

Se extrajo sangre de las gallinas los días 1, 12, 28 y 82 para identificar el título de anticuerpos producidos en el suero extraído por medio de la técnica de MAT.

6.5. Deslipidación y precipitación de IgY

Se utilizó el método de deslipidación con cloroformo y precipitación con sulfato de amonio al 50% modificado.

6.5.1. Liberación de la yema

Se utilizaron dos huevos por cada extracción, se separaron las yemas y se limpiaron de residuos de clara; con una micropipeta se puncionaron las yemas y se extrajeron 5 ml de cada una.

6.5.2. Deslipidación de la yema

Se mezclaron 2 partes de yema con 3 partes de una solución 3:1 v/v de PBS-Cloroformo y se incubó a 18°C durante 15 minutos con agitación constante, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 35 min a 4°C y se retuvo el sobrenadante.

6.5.3. Precipitación de proteínas

Se midió el sobrenadante obtenido y se le adicionó el mismo volumen de sulfato de amonio al 50% y se incubó a 4°C durante 18 horas con agitación constante, seguidamente se centrifugó la emulsión a 3000 rpm durante 35 minutos a 4°C, se retuvo el sedimento que se disolvió luego en 1ml de PBS.

6.5.4. Diálisis de las solución proteica

La solución proteica se dializó contra una solución reguladora de fosfatos (PBS 0,5X) con 6 cambios de solución en 24 horas.

6.6. Determinación de la cantidad proteica por espectrofotometría

Para determinar la cantidad proteica en cada muestra dializada, se diluyeron las muestras en agua desmineralizada en una proporción de 1 en 10 y se leyó la absorbancia con un espectrofotómetro Pharma Spec Shimadzu UV-1700 a una longitud de onda de 280nm, con una sensibilidad de 0,01.

6.7. Electroforesis de proteínas para IgY

Se realizó electroforesis de proteínas en medio reductor para comprobar la presencia de IgY en el dializado final. La electroforesis se realizó con gel de corrida al 12%, con un nivel de tramaje 29:1 de acrilamida-bisacrilamida, que es preciso para la selección de proteínas entre 10 y 200 kDa; y con un gel de apilamiento o "stak", teniendo en cuenta que la IgY pesa aproximadamente 170 kDa. Como control se utilizó el marcador Novex® Sharp Estándar pre-teñido que marca moléculas desde 3.5 kDa hasta 260 kDa.

En una cámara Bio Rad mini protean II Cell se realizó un pre-corrido de 20 minutos a 15mA, se agregaron 0,5 ml de muestra en cada pozo y se puso a correr a 30 mA durante 2 horasa 25ºC. Finalmente se reveló el gel por tinción con nitrato de plata.

6.8. Electroforesis de proteínas en acetato de celulosa

Se realizó electroforesis de proteínas para identificar la proporción de anticuerpos en relación con otras proteínas precipitadas en el dializado final de yema de huevo. En esta electroforesis se miden la albúmina, proteínas alfa 1 y 2, beta 1 y 2 y las proteínas Gamma, en donde se encuentran las inmunoglobulinas.

6.9. Evaluación de IgY anti-*Leptospira*

Para determinar el título de IgY en las muestras obtenidas, se realizó el test de microaglutinación (MAT) utilizando una batería de 8 antígenos (ver tabla 4) representando 8 serogrupos de *L. interrogans*, provenientes del Royal Tropical Institute de Holanda.

Tabla 4: Antígenos utilizados para la prueba de microaglutinación (MAT**).**
Tomado y modificado de Cardona y colegas (2008).

SEROGRUPO	**SEROVAR**
Autumnalis	autumnalis
Bataviae	bataviae
Australis	bratislava
Canicola	canicola
Icterohaemorrhagiae	copenhageni
Cynoptery	cynopteri
Mini	mini
Shermani	shermani

Cada cepa fue cultivada en medio EMJH. Se utilizaron cultivos de 6 a 10 días a 30°C. Se verificó la pureza de los cultivos con el campo oscuro. Se diluyeron los serovares 1:2 con tampón hasta obtener una densidad de 1-2 x 10^8 leptospiras/ml de cultivo.

La prueba de microaglutinación en placa se utilizó una microplaca de 96 pozos de fondo en U. Para la organización de la microplaca se colocaron 50 µL de agua tamponada (PBS: agua destilada 1:10) en la primera columna de pozos de la microplaca, en la segunda columna se pusieron 90uL de agua tamponada y posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 50 µL de PBS con los 8 serovares desde 1:20 hasta 1:2560 y se agregaron alícuotas de 50 µL de IgY en cada pozo incluyendo el pozo de control (ver tabla 5).

Tabla 5: Organización de la microplaca para MAT

		1	2	3	…	12
Serov		**Control**	**1:20**	**1:40**		**1:2560**
S1	A	PBS + S1	PBS+S1+ IgY	PBS+S1 + IgY	PBS+S1 + IgY	PBS+S1 + IgY
S2	B	PBS + S2	PBS+S2 + IgY	PBS+S2 + IgY	PBS+S2 + IgY	PBS+S2 + IgY
S3	C	PBS + S3	PBS+S3 + IgY	PBS+S3 + IgY	PBS+S3 + IgY	PBS+S3 + IgY
S4	D	PBS + S4	PBS+S4 + IgY	PBS+S4 + IgY	PBS+S4 + IgY	PBS+S4 + IgY
S5	E	PBS + S5	PBS+S5 + IgY	PBS+S5 + IgY	PBS+S5 + IgY	PBS+S5 + IgY
S6	F	PBS + S6	PBS+S6 + IgY	PBS+S6 + IgY	PBS+S6 + IgY	PBS+S6 + IgY
S7	G	PBS + S7	PBS+S7 + IgY	PBS+S7 + IgY	PBS+S7 + IgY	PBS+S7 + IgY
S8	H	PBS + S8	PBS+S8 + IgY	PBS+S8 + IgY	PBS+S8 + IgY	PBS+S8 + IgY

La microplaca se selló y se incubó a 37°C por dos horas, al finalizar la incubación se transfirió una alícuota de cada pozo a un portaobjetos nuevo, fila por fila y se observó en campo oscuro para confirmar si hubo aglutinación y su título respectivo.

La lectura de cada portaobjetos se determinó con relación a la aglutinación del antígeno control correspondiente. Cada suero que diera una aglutinación al menos del 50% de las leptospiras comparadas con el control se consideró positiva. Las leptospiras aglutinadas forman cúmulos más o menos densos y en los cuales el movimiento de los extremos libres de la bacteria son visibles. Cuando la aglutinación es completa, el campo microscópico aparece libre de bacterias.

7. RESULTADOS

7.1. Determinación de la producción de anticuerpos anti-*Leptospira* en sangre

Con el fin de determinar si se produjeron anticuerpos contra *Leptospira* y evaluar su aumento o disminución en el tiempo se tomaron muestras de sangre los días 1, 12, 28 y 82 después de la primera inoculación, que fueron valoradas mediante la técnica de microaglutinación obteniendo los datos consignados en la tabla 6, en donde se registran los títulos obtenidos con la vacuna comercial y la de LPS. Se debe tener en cuenta que el valor numérico en cada caso, tiene una proporción de 1 volumen de antígeno por la dilución correspondiente de suero, es decir que en el caso de las serovares autumnalis y bratislava en donde se encontraron títulos mayores la proporción es de 1:1280 antígeno-suero.

Tabla 6: Títulos obtenidos a partir de muestras de sangre en cuatro días del muestreo

	Día 1							
	Au	Ba	Br	Ca	Co	Cy	Mi	Sh
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
Vac comercial	0	0	0	0	0	0	0	0
LPS	0	0	0	0	0	0	0	0
	Día 12							
	Au	Ba	Br	Ca	Co	Cy	Mi	Sh
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
Vac comercial	40	0	160	160	640	160	80	80
LPS	0	40	0	0	0	0	0	0
	Día 28							
	Au	Ba	Br	Ca	Co	Cy	Mi	Sh
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
Vac comercial	0	20	80	320	640	80	80	40
LPS	20	40	20	0	40	0	20	20
	Día 82							
	Au	Ba	Br	Ca	Co	Cy	Mi	Sh
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
Vac comercial	0	0	0	160	320	320	0	0
LPS	**1280**	320	**1280**	320	320	320	320	160

Al comparar los títulos en sangre obtenidos los días 1, 12, 28 y 82 de la vacunación con antígeno de LPS y con la vacuna comercial se obtuvieron 8 gráficas. Autumnalis (ver figura 4), bataviae (ver figura 5), bratislava (ver figura 6), canicola (ver figura 7), copenhageni (ver figura 8), cynopteri (ver figura 9), mini (ver figura 10), y shermani (ver figura 11).

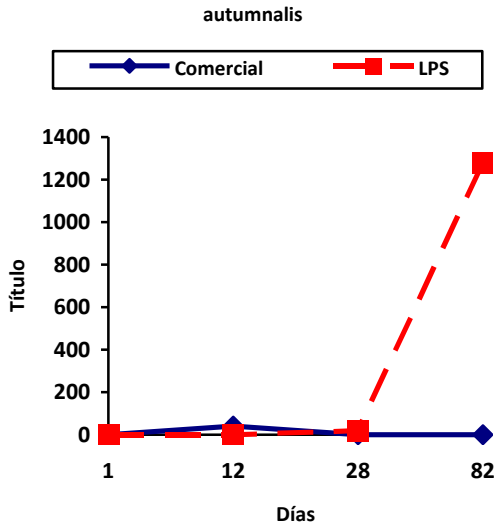


Figura 4: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar autumnalis

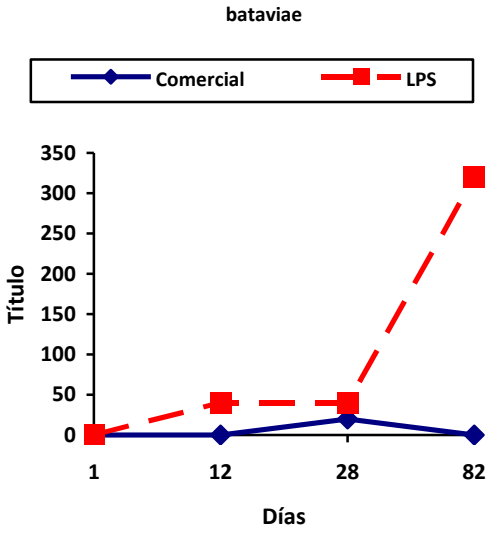


Figura 5: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar bataviae

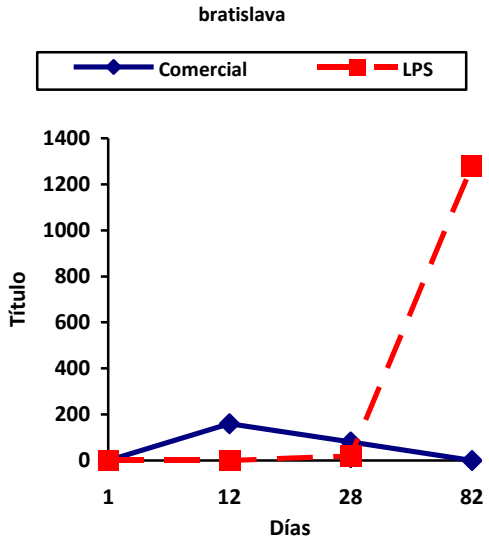


Figura 6: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar bratislava

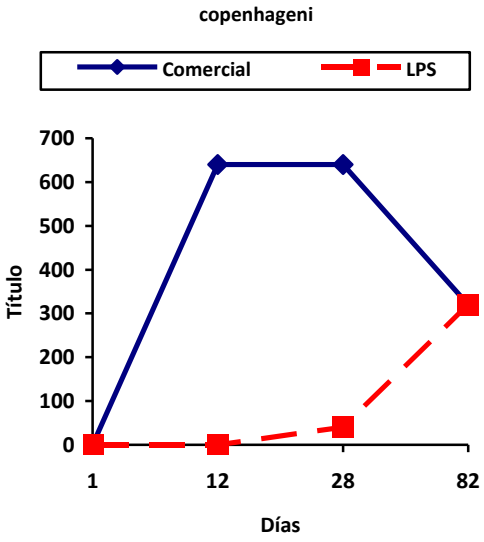


Figura 8: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar copenhageni.

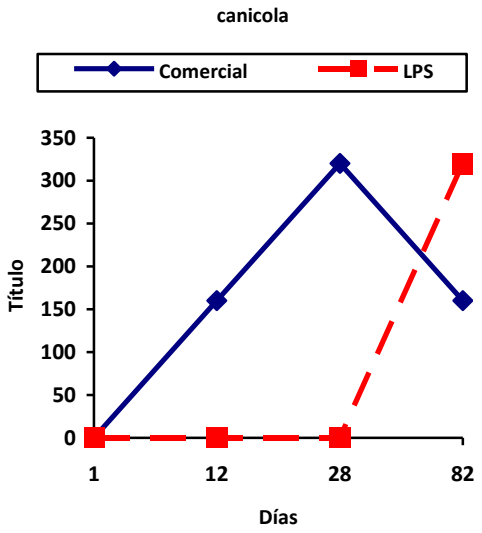


Figura 7: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar canicola

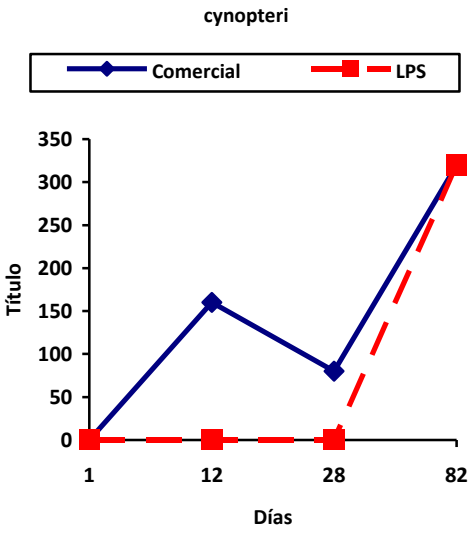


Figura 9: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar cynopteri.

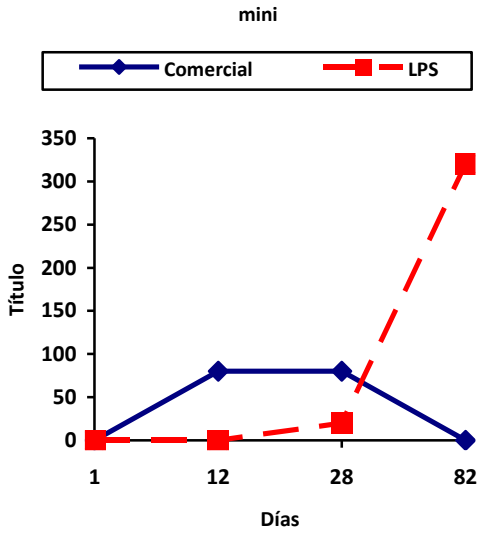


Figura 10: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar mini.

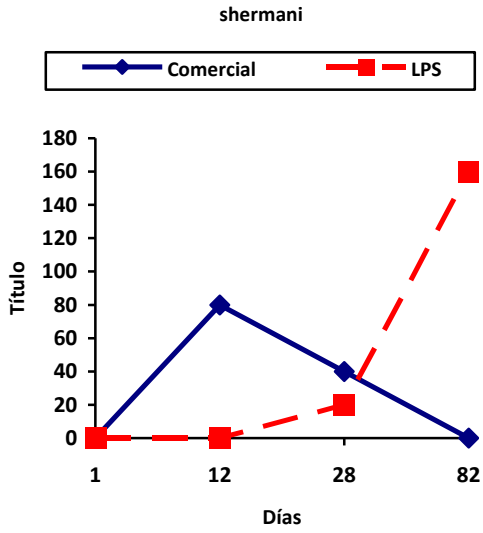


Figura 11: Comparación en el aumento de títulos en sangre entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar shermani.

La vacuna LPS está compuesta por los 8 serovares que circulan en el Valle del Cauca (autumnalis, bataviae, bratislava, canicola, copenhageni, cynopteri, mini y shermani) y en las muestras tomadas de sangre se observa una tendencia en todas las vacunadas con LPS a incrementar los títulos llegando en el caso de autumnalis y bratislava a títulos de 1:1280 mientras que el título más bajo fue el encontrado en shermani con títulos de 1:160. En el serovar cynopteri el título de 1:320 se igualó con el obtenido por la vacuna comercial y hasta la última revisión no había disminuido.

La vacuna comercial está compuesta por *Leptospiras* inactivadas de los serovares canicola, copenhageni y mozdok, los dos primeros están entre los serovares evaluadas en la MAT, lo cual explica que los títulos en sangre en estos dos serovares fueras más altos que en las otras seis restantes, sin embargo el serovar cynopteri tuvo títulos de 1:320 que no disminuyeron en la última evaluación, y los serovares mini y cynopteri tuvieron títulos de 1:80 que en la última revisión habían desaparecido.

7.2. Determinación de la producción de anticuerpos IgY en yema de huevo

Con el fin de determinar si el método de producción y extracción de anticuerpos utilizado fue exitoso, se procesaron huevos de los días 63, 68, 82, 90 y 95 posteriores a la primera inoculación y se evaluó su reactividad ante la prueba de microaglutinación obteniendo los datos consignados en la tabla 7, en donde se registran los títulos obtenidos con la vacuna comercial y la de LPS. Se debe tener en cuenta que el valor numérico en cada caso, tiene una proporción de 1 volumen de antígeno por la dilución correspondiente de dializado, es decir que en el caso de las serovares cynopteri y mini en donde se encontraron títulos mayores la proporción es de 1:160 antígeno-dializado.

Tabla 7: Titulación de los dializados obtenidos a partir de las yemas de huevos en cinco días del muestreo

	Día 63							
	Au	Ba	Br	Ca	Co	Cy	Mi	Sh
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
Vac comercial	0	0	0	40	40	40	40	0
LPS	40	40	40	20	20	**160**	40	40
	Día 68							
	Au	Ba	Br	Ca	Co	Cy	Mi	Sh
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
Vac comercial	40	40	40	80	**160**	80	**160**	80
LPS	80	80	80	80	80	80	80	80
	Día 82							
	Au	Ba	Br	Ca	Co	Cy	Mi	Sh
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
Vac comercial	40	40	40	20	80	40	0	80
LPS	40	20	40	20	20	40	20	20
	Día 90							
	Au	Ba	Br	Ca	Co	Cy	Mi	Sh
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
Vac comercial	20	20	20	40	40	40	0	40
LPS	40	20	40	40	20	40	**160**	80
	Día 95							
	Au	Ba	Br	Ca	Co	Cy	Mi	Sh
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
Vac comercial	0	0	0	40	40	40	0	0
LPS	0	0	0	20	20	20	0	40

Al comparar los títulos en dializado de yema de huevo obtenidos los días 63, 68, 82, 90 y 95 de la vacunación con antígeno de LPS y con la vacuna comercial se obtuvieron 8 gráficas. Autumnalis (ver figura 12), bataviae (ver figura 13), bratislava (ver figura 14), canicola (ver figura 15), copenhageni (ver figura 16), cynopteri (ver figura 17), mini (ver figura 18) y shermani (ver figura 19).

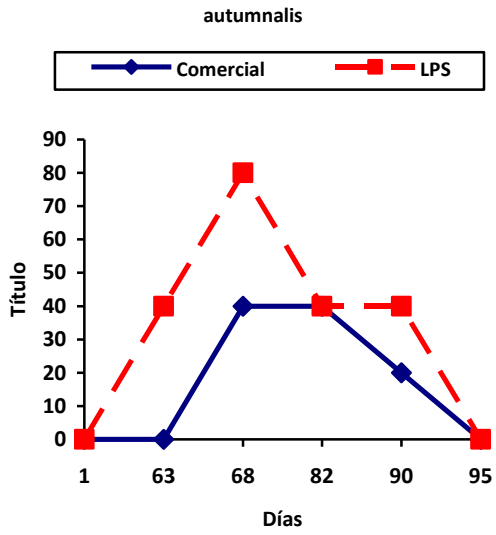


Figura 12: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar autumnalis

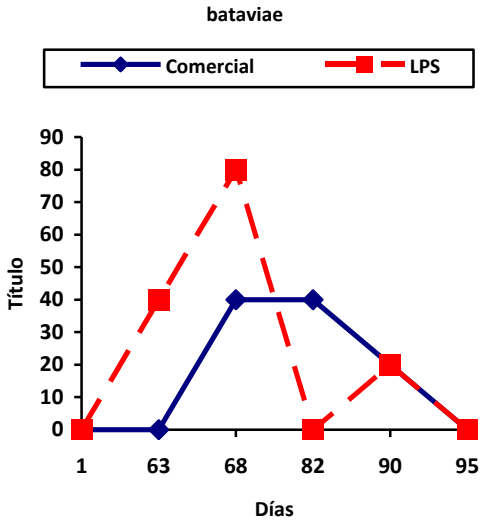


Figura 13: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar bataviae

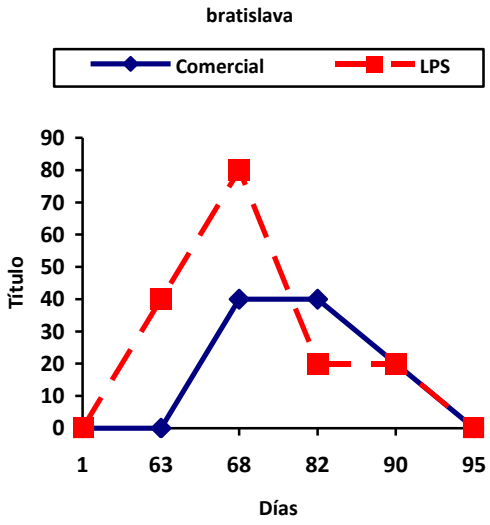


Figura 14: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar bratislava

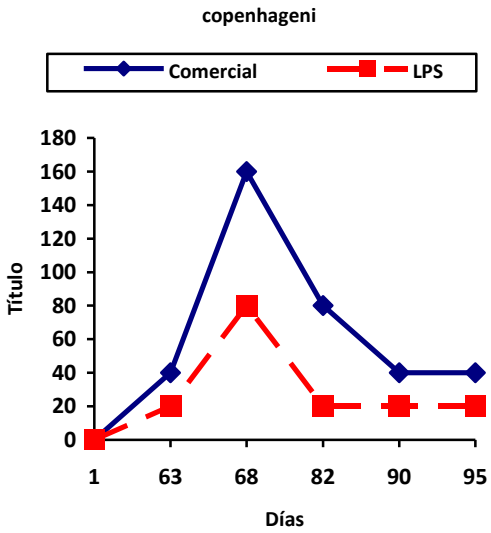


Figura 16: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar copenhageni

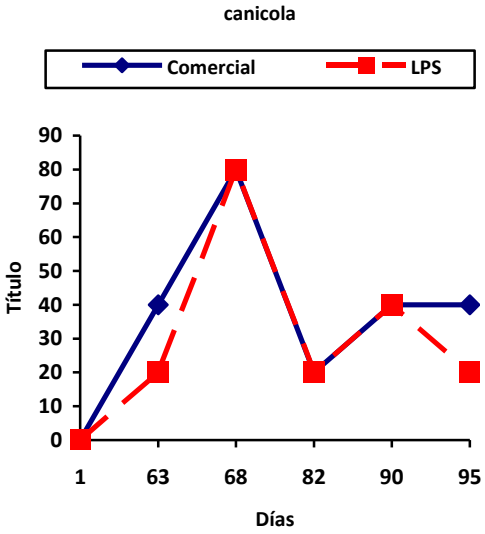


Figura 15: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar canicola.

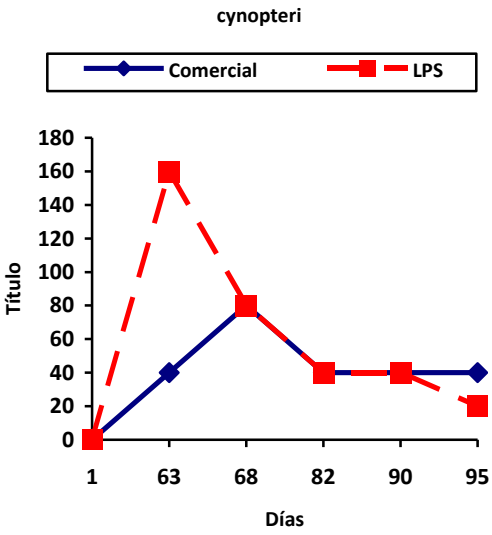


Figura 17: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar cynopteri

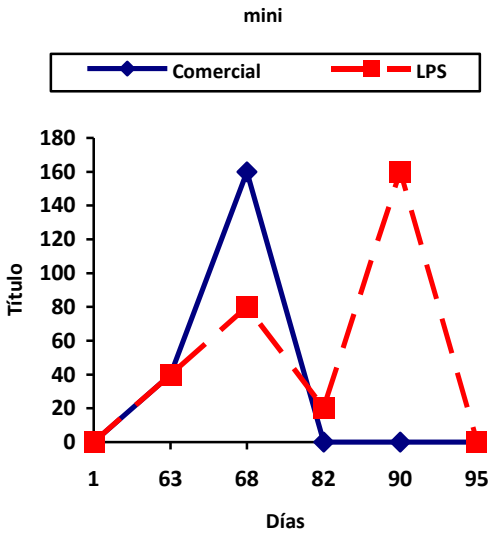


Figura 18: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar mini.

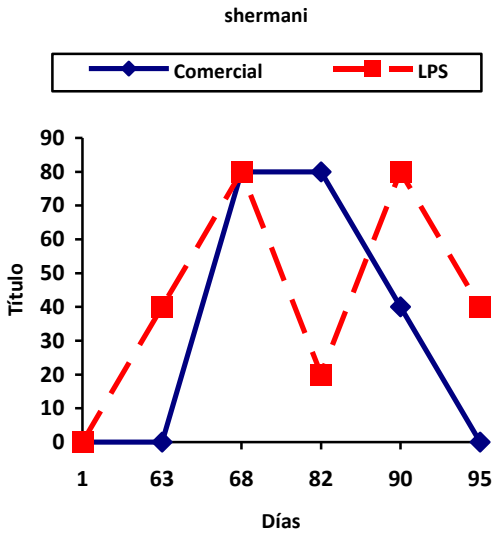


Figura 19: Comparación en el aumento de títulos en yema entre la vacuna comercial y la vacuna con LPS para el serovar shermani.

En las muestras de dializado los títulos tienden a bajar en el día 82 para la vacuna LPS, mientras con la vacuna comercial los títulos mantienen su tendencia y en ambas vacunas se observa una disminución de títulos en el día 95 hasta llegar a 0 en los casos de las serovares autumnalis, bataviae, bratislava y mini.

Las serovares autumnalis, bataviae y bratislava tuvieron títulos máximos para la vacuna LPS de 1:80 y para la vacuna comercial 1:40 y los serovares canicola y shermani tuvieron títulos máximos de 1:80 para los dos tratamientos.

Como la vacuna comercial está compuesta por los serovares canicola y copenhageni se esperaba que en estos serovares la titulación fuese más alta y se encontraron títulos de 1:80 y 1:160 respectivamente, sin embargo, en mini se encontraron títulos de 1:160, lo que puede explicarse por reacciones cruzadas entre serogrupos de *Leptospira*.

7.3. Diferencias en títulos entre sangre y yema de la vacuna LPS

La titulación en sangre fue comparada con la obtenida en huevo (ver figura 20) para todos los serovares evaluados en MAT, obteniendo títulos más altos en sangre que en huevo.

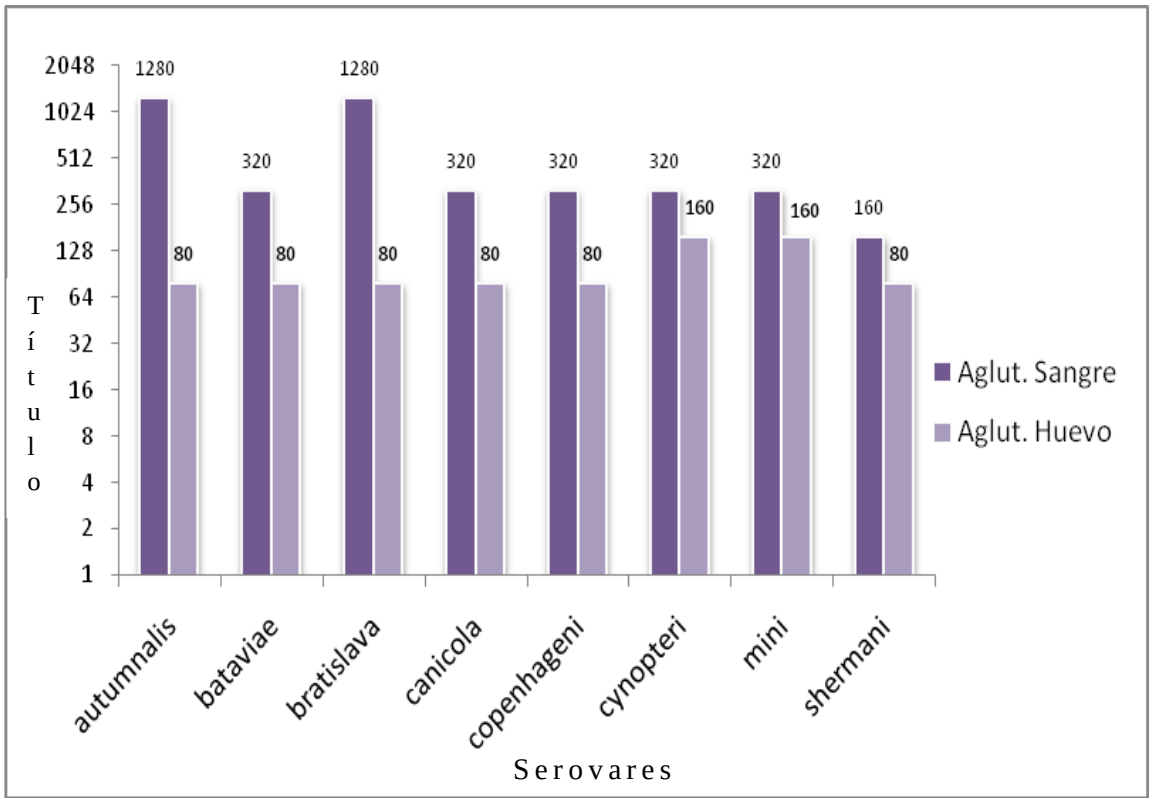


Figura 20: Comparación entre la titulación máxima obtenida con la técnica MAT para suero sanguíneo y dializado de yema en los 8 serovares evaluados

En sangre los serovares autumnalis y bratislava tuvieron títulos de 1:1280 siendo los títulos más altos encontrados hasta la última evaluación, mientras que los títulos que menos aumentaron, llegaron a 1:160 para shermani.

En huevo los títulos más altos encontrados fueron de 1:160 para cynopteri y mini, mientras que los demás serovares evaluados obtuvieron títulos máximos de 1:80.

7.4. Determinación de la concentración proteica por espectrofotometría

En muestras de cada unidad experimental, se midió la concentración de proteína precipitada en el dializado por medio de espectrofotometría a 280 nm, obteniendo los resultados consignados en la tabla 8.

Tabla 8: Absorbancia de las muestras del dializado a 280 nm.

Muestra	Absorbancia A 280 nm
Control 1	2,65
Control 3	2,43
Comercial 1	1,65
Comercial 4	1,47
LPS 1	2,49
LPS 2	1,70
LPS 3	2,63

7.5. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida

Al realizar la electroforesis en el de poliacrilamida se obtuvieron bandas de de ~180 kDa (ver figura 21), que corresponden con el peso molecular aproximado de la IgY.

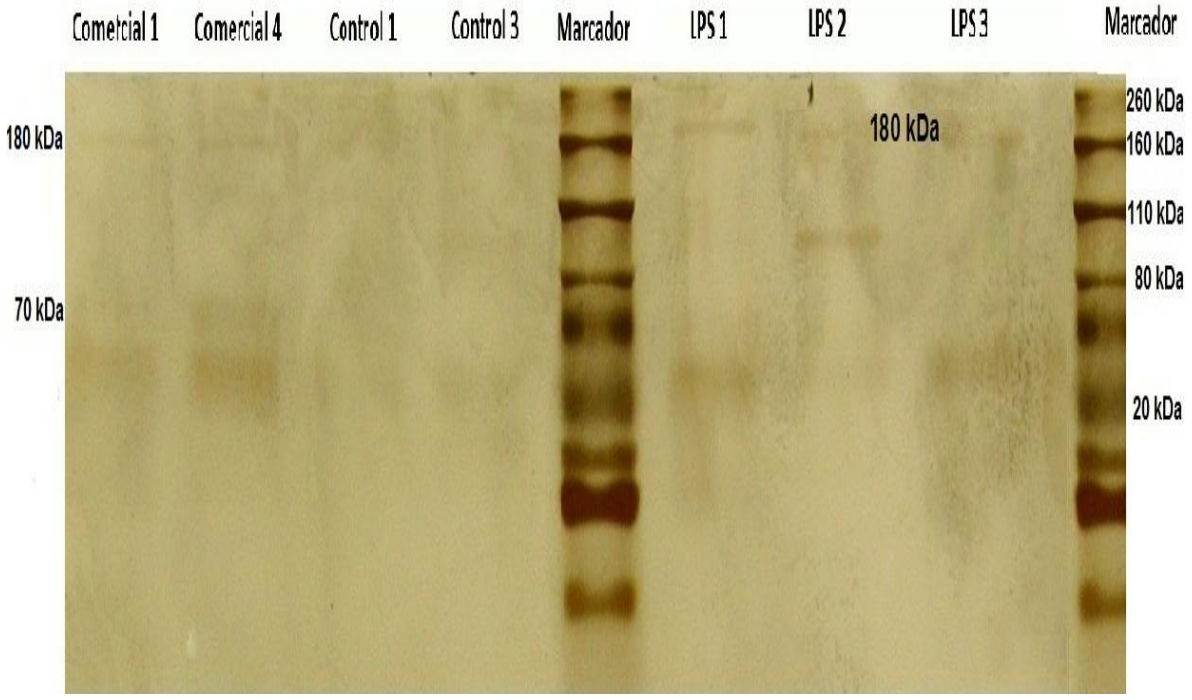
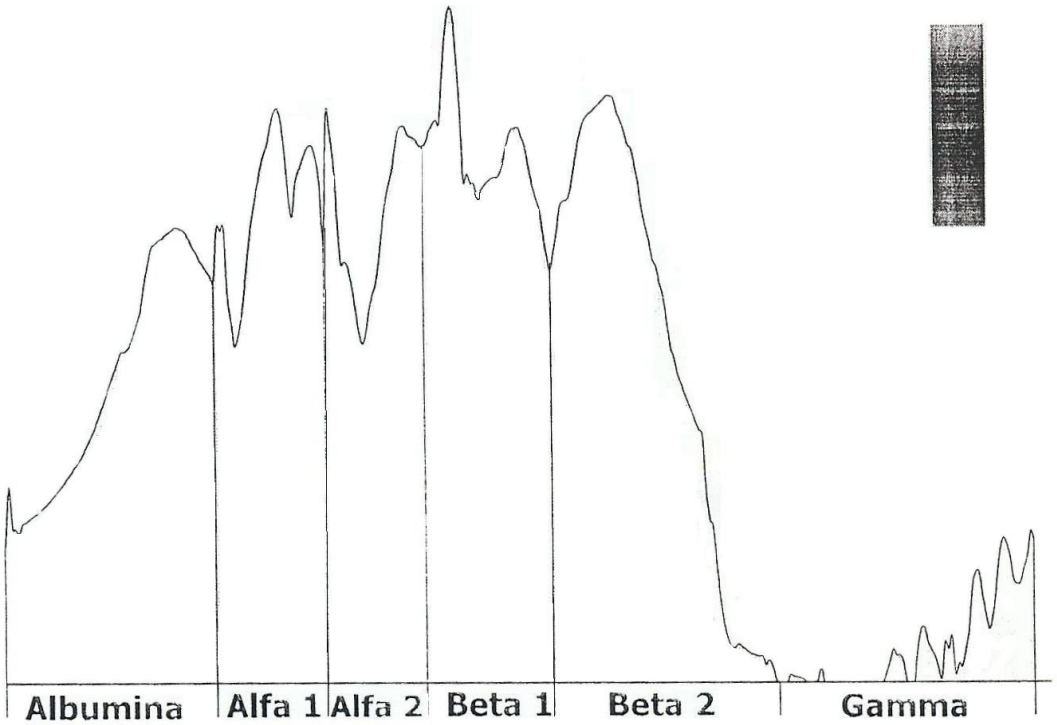


Figura 21: Electroforesis de proteínas del dializado en gel de poliacrilamida.

En la banda de 180 kDa se refleja la IgY, pero también se encontraron bandas de distintos pesos que pueden corresponder a otras proteínas precipitadas de la yema. La banda de 70 kDa probablemente corresponde a la α-livetina y las bandas de 20 kDa probablemente corresponden a la apovitelenina II.

7.6. Electroforesis de proteínas en acetato de celulosa

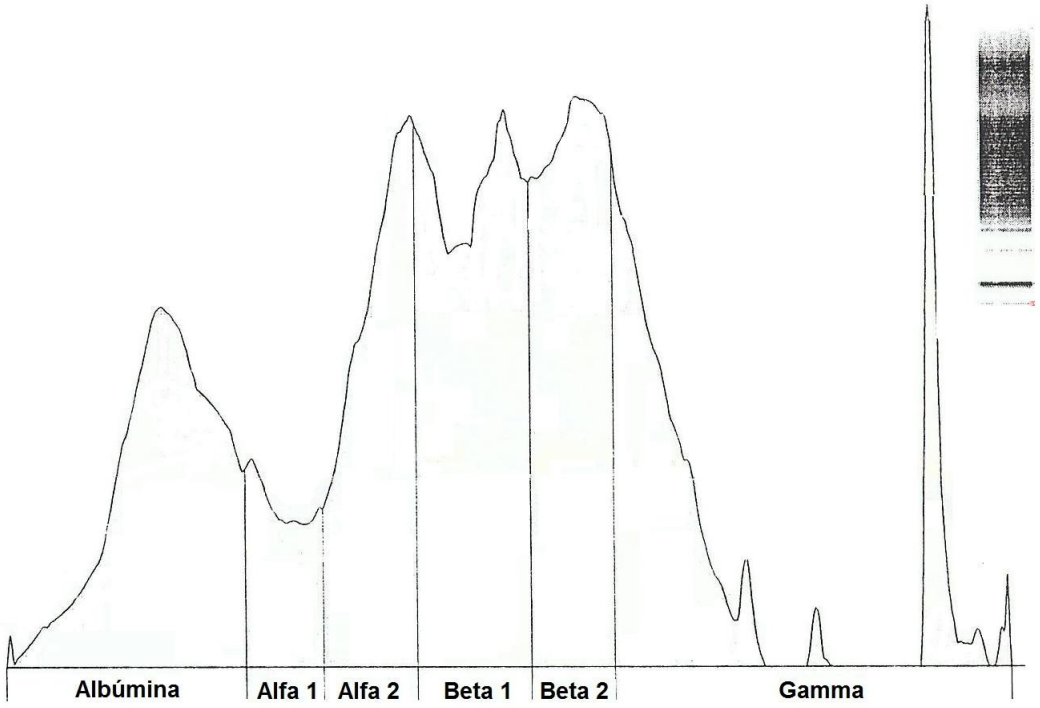
Se realizó electroforesis de proteínas en acetato de celulosa para medir las proteínas disueltas en el dializado final obtenido de los huevos de las gallinas vacunadas con la vacuna comercial (ver figura 22) y con las vacunadas con LPS (ver figura 23), con esta electroforesis se identificó la cantidad de proteínas Gamma con un peso que va desde 180 a 300kDa, diferenciándose de las proteínas Albúmina, Alfa 1 y 2 y Beta 1 y 2.



Fracciones	% De proteína encontrada	Peso molecular
Albúmina	19.1	0 - 60 kDa
Alfa 1	17.1	60 - 90 kDa
Alfa 2	15.1	90 - 120 kDa
Beta 1	21.8	120 - 150 kDa
Beta 2	23.9	150 - 180 kDa
Gamma	3.0	180 - 300 kDa

Figura 22: Electroforesis de proteínas en acetato de celulosa para la muestra de vacuna comercial.

Al realizar la electroforesis de proteínas en acetato de celulosa se obtuvo un porcentaje de 3.0 % de proteínas gamma, indicando que el dializado de yema obtenido de las gallinas vacunadas con la vacuna comercial tiene una baja concentración de inmunoglobulinas.



Fracciones	% De proteína encontrada	Peso molecular
Albúmina	17.4	0 - 60 kDa
Alfa 1	5.4	60 - 90 kDa
Alfa 2	15.4	90 - 120 kDa
Beta 1	23.8	120 - 150 kDa
Beta 2	19.4	150 - 180 kDa
Gamma	18.6	180 - 300 kDa

Figura 23: Electroforesis de proteínas en acetato de celulosa para la muestra de antígeno LPS.

Al realizar la electroforesis de proteínas en acetato de celulosa se obtuvo un porcentaje de 18.6% de proteínas gamma, lo cual indica una alta concentración de inmunoglobulina en la muestra del dializado obtenido del huevo de gallina vacunado con la vacuna LPS.

8. DISCUSIÓN

La producción de anticuerpos IgY ha tomado fuerza en el campo de la salud humana y animal por las ventajas sobre la IgG, entre las cuales está su alta especificidad, y producción amigable, lo que la convierte en una herramienta muy útil en la investigación de enfermedades como la leptospirosis, pudiéndose producir anticuerpos para ser utilizados en tratamientos profilácticos y en pruebas de diagnóstico como se ha venido haciendo con otras enfermedades.

Para la producción de anticuerpos aviares se han descrito muchos esquemas de vacunación y recolección de huevos (Akita & Nakai 1993; Camenisch et al. 1999; Kapoor *et a*l 2000, Chalghoumi et al. 2009) y la mayoría coinciden en que la inmunización se haga semanalmente en el músculo de la pechuga con antígeno inactivado principalmente con formaldehido y la recolección de huevos comience al día 56. Sin embargo al hacer las mediciones de anticuerpos en sangre, fue evidente que los títulos no aumentaban significativamente después de cuatro inmunizaciones, por lo que se optó por inyectar antígeno vivo al día 28 de iniciada la experimentación, y como se esperaba, los títulos aumentaron y para la medición del día 63 casi se habían duplicado. Esto indica que para producir una respuesta inmune fuerte, el antígeno vivo resulta más efectivo que el inactivado ya que la alta tasa de reproducción bacteriana incentiva la producción de anticuerpos.

También se debe tener en cuenta que así la bacteria haya perdido su virulencia por tenerse tanto tiempo en cultivo, la patogenicidad no se pierde, puesto que esta última está dada por dos genes (563 y 285), mientras que la virulencia se estimula con la respuesta del hospedero. Por eso, el antígeno vivo no causó leptospirosis en este caso, además, las aves tienen un nivel de tolerancia alto frente a las inmunizaciones, por lo que pueden ser inoculadas con altas dosis de inmunógeno ya que la inducción de tolerancia inmunológica es tardía, tolerando hasta 5g de inmunógeno por kilogramo de peso corporal (Myeller & Wolfe 1961).

A pesar de las múltiples ventajas que tiene la producción de anticuerpos IgY, existen desventajas a la hora de la deslipidación y la precipitación de las proteínas. No es posible

tener la proteína pura con el método de deslipidación con cloroformo y precipitación con "salting out", para esto se necesitaría realizar procesos más complejos y costosos que toman mucho tiempo y requieren del manejo de volúmenes grandes (Akita & Nakai 1993). El método utilizado deslipidó en gran parte la muestra y precipitó todas las proteínas presentes en la yema, pero los residuos especialmente lipídicos interfieren en la lectura de la MAT haciendo que la aglutinación no sea claramente visible.

Actualmente existen kits de extracción de IgY que en pocas horas extraen y purifican la proteína deseada hasta obtener un 90% de pureza en el dializado final (Haak-Frendscho 1994), por lo que sería ideal hacer la extracción con este tipo de kits pues después de obtenidas las IgY, pueden tratarse como cualquier inmunoglobulina y utilizarse para pruebas primarias de anticuerpos como ELISA, "Western blot" o inmunoensayos.

Para determinar que las muestras del dializado contuvieran proteínas, se hicieron mediciones espectrofotométricas en las cuales se encontraron valores altos en todos las muestras de dializado de yema. La gran cantidad de proteína interfiere con la electroforesis en gel de poliacrilamida, por lo que la muestra fue diluida 1:100 en agua desmineralizada, esto pudo causar que las bandas de la electroforesis fueran tenues, no obstante, es perceptible la banda de 180 kDa, que reflejaría el peso de la IgY. Las bandas de distintos pesos pueden corresponder a otras proteínas precipitadas, ya que el método utilizado no era de purificación sino de precipitación y extracción. Las bandas de 20 kDa probablemente corresponden a la apovitelenina II y la banda de 70 kDa correspondería a la α-livetina, que son ambas proteínas contenidas en yema.

Se realizó una electroforesis de proteínas en acetato de celulosa en donde se miden las proteínas Gamma (con peso desde 180 a 300 kDa) en donde está contenida la proteína de interés. Las globulinas gamma abarcan todos los tipos de anticuerpos presentes (IgY, IgG e IgM e IgA) en suero sanguíneo, pero como las muestras utilizadas fueron los dializados de yema se presume que solo se midió IgY, ya que aunque la gallina pasa inmunoglobulinas al huevo mientras está en el ovario (Chacana et al. 2004, Romero & Sánchez 2009), las otras inmunoglobulinas se transfieren a la albúmina y solo IgY a la yema (Abbas & Lichtman 2003).

Todas las proteínas se clasifican en el grupo de proteínas Gamma, por lo que en las gráficas es ahí donde se cuantifica la IgY. Las otras proteínas medidas son: la albúmina que es la proteína más abundante en huevo, compuesta por aproximadamente 610 aminoácidos, las proteínas Alfa o anti-tripsinas, las proteínas Alfa 3 encargadas de transportar y fijar hemoglobina plasmática y las proteínas Beta 1 y 2, que comprenden las transferinas y hemopexina (Romero & Sánchez 2009).

Es evidente con la electroforesis en acetato de celulosa, que la vacuna LPS produjo mayor cantidad de anticuerpos que la vacuna comercial, pues mientras que en la vacuna comercial se calculó un 3% de proteínas gamma, en la vacuna con LPS se calculó un porcentaje de 18.6% de las mismas proteínas. En la vacuna LPS también se observa un pico agudo que demuestra una especificidad de anticuerpos clonales, que deben corresponder al IgY. La diferencia observada entre ambas muestras puede deberse al hecho de que la electroforesis se realizó después de que se aplicara antígeno vivo, mientras que los refuerzos que se hicieron con la vacuna comercial siempre fueron con antígeno inactivado en formaldehido, además concuerda con lo encontrado al realizar la titulación con la prueba MAT.

La alta concentración de otras proteínas en las muestras no necesariamente se debe a la presencia de albúmina de huevo o alfa y beta globulinas, sino más bien a proteínas presentes en la yema que tienen pesos moleculares similares, y como el examen está calibrado para suero humano, se midieron como proteínas presentes en sangre. No debe descartarse tampoco la posibilidad de que la presencia especialmente de albúmina, se deba a contaminación en el momento de la extracción.

Al inyectar el antígeno LPS compuesto por varios serovares, se esperaba obtener un suero policlonal que respondiera a todos los serovares y los resultados de este estudio concuerdan con lo encontrado por García et al. (2008) & Grosso et al. (2008), demostrando que es posible obtener una respuesta policlonal ya que en todos los serovares evaluados se produjeron títulos. Se esperaba que la respuesta inmune se produjera en proporciones similares, sin embargo, fue leve en la serovar shermani en donde el titulo fue de 1:160 y alta en los serovares autumnalis y bratislava que alcanzaron títulos de 1:1280 en sangre.

La vacuna comercial está compuesta por *Leptospiras* inactivadas del serovar canicola, copenhageni y mozdok, los dos primeros están entre los serovares evaluados en la MAT, pero también presentó reacción para los serovares bratislava, canicola, copenhageni, mini, cynopteri y shermani. En el caso de autumnalis y bataviae, aunque se encontraron títulos de 1:20, se consideran como negativas, ya que son títulos bajos y que solo se observaron una vez.

Estudios recientes indican la existencia de dos tipos de anticuerpos específicos contra las leptospiras: unos dirigidos contra antígenos específicos de género comunes entre todas las especies de leptospiras, y otros contra antígenos específicos de serovariedad y serogrupo (Vanasco et al. 2007). Las reacciones de protección encontradas en este estudio frente a antígenos que no estaban en la vacuna inoculada pueden deberse a protección cruzada por similitud antigénica de las proteínas de membrana, coincidiendo con lo encontrado por otros autores al analizar la vacuna comercial (Gonzales et al. 2004; Naranjo et al. 2007). Es importante destacar, que aunque históricamente se creía que la inmunidad cruzada ocurría solo entre serovares del mismo grupo, los resultados de este estudio concuerdan con lo encontrado por Gonzales et al. (2004) en los que se encontró inmunidad cruzada entre serogrupos diferentes.

En la vacuna comercial se observó una respuesta rápida al antígeno, registrándose títulos desde la revisión hecha el día 12, mientras que los títulos con LPS fueron significantes solo después del día 28 que fue cuando se aplicó el antígeno vivo. La respuesta pronta de la vacuna comercial es probablemente debida al adyuvante que utiliza, el gel de hidróxido de aluminio es conocido por su eficacia y bioseguridad, y es especialmente utilizado en seres humanos, mientras que para animales de laboratorio se utilizan comúnmente los adyuvantes de Freund (Allison & Byars 1991).

El adyuvante completo de Freund es una mezcla de aceite mineral, un agente dispersante con mycobacterias inactivadas por calor; mientras que el incompleto no tiene bacterias y casi desde que fueron empleados por primera vez, se reconoció su toxicidad, pero los esfuerzos por encontrar un reemplazo menos tóxico no han sido exitosos (Morris et al. 1999) pues las emulsiones de aceite con agua inducen una fuerte respuesta inmune, pero pueden provocar efectos no deseados debido a que su biodegradabilidad es limitada. (Straw

et al. 1985). Este adyuvante produjo como ha sido reportado en casos anteriores, la caída de las plumas de la pechuga (Straw et al. 1985, Schade et al. 1996, Ochoa et al. 2000) y una queratinización en la piel desnuda.

Los adyuvantes basados en compuestos de aluminio como el de la vacuna comercial, son los únicos licenciados para uso humano (Grupta et al. 1993) y su efectividad se basa en que la adsorción del antígeno y los adyuvantes se ve favorecida por la atracción electrostática, las interacciones hidrofóbicas y las fuerzas de Van Der Waals producidas entre las moléculas de aluminio (Al-Shakshir et al. 1995). Lo que probablemente desencadenó la pronta respuesta inmune encontrada en el suero sanguíneo.

La mayoría de serovares produjeron títulos altos al vacunar con LPS, por lo que sería ideal esta fórmula para producir IgY a nivel masivo. Los serovares que dieron títulos más bajos podrían inocularse individualmente, ya que así se incrementaría la respuesta pues se asegura una cantidad mayor de bacterias inoculadas.

En la medición de títulos en huevo el día 82, los títulos fueron bajos o inexistentes en todos los serovares evaluados, lo que no concuerda con lo obtenido en sangre para el mismo día. Esto hace pensar que la precipitación proteica ese día no fue eficiente ya sea por errores en el proceso de los huevos utilizados o porque estos estuvieron varias horas sin refrigerar lo que pudo hacer que el anticuerpo se degradara, impidiendo así que se obtuviera una cantidad suficiente de IgY o que la lectura en la microplaca no fuera muy clara, por lo que se asume que los títulos siguieron el patrón que llevaban hasta el día 82. La baja eficiencia de la extracción concuerda con que en todos los serovares en este día los títulos fueron bajos y posteriormente subieron

En los casos de las serovares mini y shermani los títulos bajaron de 1:80 a 1:20 para luego subir hasta 1:160 y 1:80 respectivamente, por lo que no hay correspondencia con la actividad que la curva venía teniendo. Esto concuerda con lo encontrado por Pinto et al. (2005) y Narat (2003) donde describen la fluctuación de los títulos en mamíferos durante periodos más largos de tiempo, mas no existen registros del comportamiento de los títulos en aves, por lo que no puede descartarse que sea un suceso normal y tendrían que realizarse

más pruebas con diferentes líneas de gallinas y con extracciones más frecuentes que describan minuciosamente el comportamiento de la curva.

Al comparar las titulaciones en suero sanguíneo con las obtenidas en los dializados de yema, se obtuvieron títulos más altos para todos los serovares en sangre, esto pudo deberse a que la MAT está estandarizada para realizarse con suero sanguíneo, y cuando la muestra es muy lipémica impide la visualización de la microaglutinación, por otra parte, mientras que en el suero están disueltas todas las inmunoglobulinas (IgM, IgG, IgA e IgY), en yema solo se encuentra IgY, por lo que la reacción es menor.

A pesar de que los títulos sean más bajos en huevo, la ventaja de producción compensa el sangrado de las gallinas, además los refuerzos con antígeno vivo tuvieron buenos resultados por lo que podrían realizarse otras inoculaciones que incrementaran los títulos en huevo, teniendo en cuenta que una sobreexposición al antígeno también puede inmunomodular al animal, causando un estancamiento en la producción de anticuerpos (Bek et al. 1996). Además, es probable que afinando la deslipidación se consigan títulos más altos en huevo.

En cuanto a la producción, el huevo también tiene ventajas sobre el suero sanguíneo, pues el suero en sangre de gallina represente entre el 5 al 10% de la sangre total, mientras que el suero en mamíferos en algunas ocasiones llega a ser el 50% de la sangre total; por otra parte, la yema tiene un volumen de 25 ml aproximadamente y el volumen obtenido de cada yema suple la necesidad del sangrado, pues de cada yema se pueden obtener hasta 13 mg/ml de IgY (Gottstein & Hemmeler 1985).

Los factores que controlan el nivel de las inmunoglobulinas en las aves pueden ser de cuatro tipos: genéticos, pues algunas líneas tienen mayor capacidad de formación de anticuerpos; ambientales, en donde el contacto con antígenos es el más importante; la edad, pues en adultos el sistema inmune ya está desarrollado y los resultados en pruebas serológicas no varían tanto como en jóvenes y finalmente, los mecanismos internos de regulación, que indican que la IgY se cataboliza más rápidamente cuando su nivel sérico es alto, lo que no ocurre con IgA e IgM que se catabolizan independientemente del nivel en sangre (Closas sin año). La falta de un bioterio para mantener las gallinas, puede ser el factor que explique de cierta manera las fluctuaciones encontradas en las revisiones, ya que

al no estar en un ambiente libre de antígenos externos, las gallinas pudieron contagiarse de otras enfermedades que las inmunomodularan. Por otra parte, el estrés es también una causa de inmunosupresión en la mayoría de estudios realizados con animales e incluso humanos, es por esto, que situaciones estresantes como la vacunación y el encierro pudieron causar que las gallinas mermaran la producción de anticuerpos.

Se puede concluir que la vacuna comercial produce anticuerpos más rápidamente en el tiempo que la vacuna de LPS, pero la vacuna de LPS produce una respuesta inmunológica más fuerte y que perdura por más tiempo, especialmente si se aplica antígeno vivo. Por otra parte, aunque la vacuna comercial contiene solo dos serovares que fueron evaluados con MAT, dio resultados positivos para cinco de los ocho serovares evaluadas, lo que confirma la protección cruzada que ocurre entre serogrupos de *Leptospira*, pero no puede compararse con los títulos obtenidos por la vacuna de LPS que aunque se demoraron más en aparecer, fueron mucho más altos y reactivos ante todos los serovares evaluados.

Es indispensable afinar la metodología de deslipidación pues los lípidos interfirieron con la lectura de la prueba de MAT, es ideal utilizar un kit de extracción para eliminar residuos y tener la proteína pura.

Finalmente se puede decir que se cumplió con el objetivo de producir anticuerpos IgY contra los ocho serovares de *Leptospira* circulantes en el Valle del Cauca y que si el método de extracción se afina, preferiblemente utilizando un kit de extracción, se pueden obtener anticuerpos puros que serían de gran utilidad en el desarrollo de pruebas de detección indirecta midiendo la respuesta inmune del organismo infectado más eficazmente, e incluso podrían llegar a reemplazar el uso de antibióticos, ya que es conocido el aumento de la resistencia bacteriana a antibióticos en los últimos años y puesto que la IgY es específica y no acaba con la flora normal del organismo en tratamiento, hace que esta sea una alternativa en el tratamiento de leptospirosis así como en otras enfermedades infecciosas.

9. GLOSARIO

ELISA: (acrónimo del inglés Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Es una técnica de inmuno-ensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color o algún otro tipo.

Inmunoglobulina: Las inmunoglobulinas o anticuerpos son glucoproteínas del tipo gamma globulina. Están disueltos en sangre y fluidos de vertebrados y son empleados para identificar y neutralizar cualquier tipo de antígeno que entre al cuerpo.

Microaglutinación (prueba): procedimiento de diagnóstico que emplea suero u otros fluidos corporales para identificar si existen títulos contra un antígeno específico. Se basa en la observación microscópica de aglutinación bacteriana

Serología: Es un examen de sangre utilizado para detectar la presencia de anticuerpos y/o antígenos

Serovar/ Serotipo: Es un tipo de microorganismo infeccioso clasificado según los antígenos que presentan en su superficie celular. Los serotipos permiten diferenciar organismos a nivel de subespecie, algo de gran importancia en epidemiología.

Títulos en sangre /Anticuerpos sérico: Es un examen de laboratorio que mide la presencia y cantidad de anticuerpos en sangre. El nivel de anticuerpos en la sangre es un reflejo de una exposición pasada a un antígeno o si una vacuna reciente causó o no una respuesta del sistema inmunitario lo suficientemente fuerte como para que el organismo esté protegido contra la enfermedad específica.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. & A. H. LICHTMAN 2003. Cellular and Molecular Immunology. 5ª Ed. Philadelphia, Saunders. 562p.

AGUDELO-FLOREZ, P., A. F. LONDONO, V. H. QUIROZ, J. C. ANGEL, N. MORENO, E. T. LOAIZA, L. F. MUNOZ & J. D. RODAS. 2009. Prevalence of *Leptospira* spp. in urban rodents from a groceries trade center of Medellin, Colombia. Am J Trop Med Hyg 81(5): 906-910.

AGUDELO-FLOREZ, P., B. N. RESTREPO-JARAMILLO& M. ARBOLEDA-NARANJO. 2007. Leptospirosis in Urabá, Antioquia, Colombia: a seroepidemiological and risk factor survey in the urban population. Cad Saúde Pública 23(9):2094-2102.

AGUDELO-FLOREZ, P., M. RESTREPO & N. MORENO. 2008. Diagnosis of leptospirosis by dark-field microscopy of blood samples and culture. Biomédica 28(1): 7-9.

AKITA, M. & S. NAKAI. 1993. Production and purification of Fab′ fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). J Immunol Methods 162(2):155-164.

ALLISON, A.C. & N.E. BYARS. 1991. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. Mol Immunol 28:279–284.

AL-SHAKSHIR, R.H., F.E. REGNIER, J.L. WHITE & S.L. HEM. 1995. Contribution of electrostatic and hydrofobic interactions to the adsorption of proteins by aluminum-containing adjuvants. Vaccine 13:41-44.

ARIAS, H., M. NUÑEZ, I. VALENZUELA & A. OLIVARES. 2003. Brote epidémico de leptospirosis en niños de Linares. Rev Chil Pediatr 74(4):405-410.

ASTUDILLO, M., A. GONZÁLEZ, N. BATISTA, M. MIRABAL, J. MENÉNDEZ. 2009. Estudio seroepidemiológico de la leptospirosis humana en el departamento del Valle del Cauca, Colombia. Rev Cubana Med Trop. [online] 61(2):0-0. ISSN 0375-0760.

BAJAN, M.D., D.A. BRASHFOR, S.L. BRAGGA, C.W. WOODS, T. AYE, L.A. SPIEGEL, B.D. PLICAYTIS, B.A. PERKINS, M. PHELAN, P.N. LEVETT, & R.S. WEYAND. 2003. Evaluation of four commercially available serologic tests for diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol 41:803-809.

BEK, M., H. KOPPL, G. SCHWARZKOPF & N. FREUDENBERG. 1996. Weil's disease and necrotizing herpes pneumonia as the cause of death of a 39-year-old sewage drain worker. Am J Pathol NCBI 17(6):471-476.

BHARTI, A.R., J. E. NALLY, J. N. RICALDI, M. A. MATHIAS, M.M. DIAZ, M.A. LOVETT, P.N. LEVETT, R.H. GILMAN, M.R. WILLIG, E. GOTUZZO & J.M. VINETZ. 2003. Leptospirosis a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis 3(12):757-771.

BJÖRKMAN, P. 2004. Investigadores identifican en aves la contraparte de un receptor mamífero de anticuerpo (http://www.hhmi.org/news/pdf/bjorkman2-esp.pdf. Consulta: 24 enero 2011)

BRAVO, C., M. RESTREPO.1970. Leptospirosis en Antioquia: II. Leptospirosis en perros y cerdos. Antioquia Med 20: 19-23.

CAMENISCH, G., M. TINI, D. CHILOV, I. KVIETIKOVA, V. SRINIVAS, J. CARO, P. SPIELMANN, R. WENGER, & M. GASSMANN. 1999. General applicability of chicken egg yolk antibodies: The performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1alpha. FASEB J 13(1):81-88.

CARDONA, M.N., R.M. MOROS, E.A. LÓPEZ, J.L PÉREZ & R.C. HERNÁNDEZ. 2008. Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. Rev Soc Ven Microbiol 28:24-30.

CARNEIRO, M., M. L. GIACOMINI & J. M. COSTA. 2004. Leptospirosis asociada a la exposición ocupacional: Estudio clínico y epidemiológico. Rev Chil Infect, 21(4):339-344.

CÉSPEDES, M., M. GLENNY, A. VIDAL, L. BALDA & V. SUÁREZ. 2002. Prueba de Elisa indirecta para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de Leptospirosis humana. Rev Peru Med Exp Salud Pública 19(1): 24-27.

CHACANA, P. A., H. R. TERZOLO, E. GUTIÉRREZ-CALZADO & R. SCHADE. 2004. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. Rev Med Vet 85(5):179-189.

CHALGHOUMI, R., Y. BECKERS, D. PORTETELLE & A. THEWIS. 2009. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. Biotechnol Agron Soc Environ 13(2): 295-308.

CHIDAMBARAM, N., M. RAMANATHAN, V. ANANDI, S. SASIKALA, D. J. INNOCENT & L. SARAYU. 2007. Leptospirosis: clinical presentation and correlation with serovars. J Commun Dis 39(1):105–108.

CLOSAS, A. Sin año. Respuesta inmune de las aves y sus alteraciones. ARXltiS de I'Escola superior d'Agricultura. Barcelona

(http://www.raco.cat/index.php/ArxiusESAB/article/viewFile/105061/151094 Consulta: 12 junio 2010)

DE LEON, G. G., A. O. URIBE & A. M. BETANCURTH. 2002a. Rodents as Leptospira reservoirs at swine farms of the central coffee growers area of Colombia. Arch Med Vet 34(1):69-78.

DE LEON, G. G., A. O. URIBE, M. SANTACRUZ & E. YEPES. 2002b. Leptospirosis. The waters from the swine farm as vehicles of Leptospira, at the central coffee growers area of Colombia. Arch Med Vet 34(1):79-87.

DEL MONTE, A. Sin año. Leptospirosis. Montevideo. (http://www.higiene.edu.uy/leptos.htm. Consulta: 12 junio 2011)

DESAI, S., U. VAN TREEK, M. LIERZ, W. ESPELAGE, L. ZOTA, A. SARBU, M. CZERWINSKI, M. SADKOWSKA, M. AVDICOVA, J. REETZ, E. LUGE, B. GUERRA, K. NOCKLER & A. JANSEN. 2009. Resurgence of Field Fever in a Temperate Country: An Epidemic of Leptospirosis among Seasonal Strawbery Harvesters in Germany in 2007. Clin Infect Dis 48: 691-697.

DIAZ, L., I. ZAPATA, A. GONGORA, J. PARRA, L. APONTE & L. GOMEZ. 2008. Detection of IgM antibodies to *leptospira* in human population with occupational risk factors in Villavicencio, Meta. Rev MVZ Córdoba 13(6):1120-1127.

DIKKEN H. & E. KMETY. 1978. Serological typing methods of leptospires. J. Met. Microbiol. 11, 259–307.

DUPONT, H., D. DUPONT-PERRIZET, H. PERIE, D. ZEHNER-HANSEN, B. JERIGR & J.B. DESJARDIN. 1997. Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. Clin Infect Dis 25:720-724.

EDWARDS, C.N., G.D. NICHOLSON, T.A. HASSELL, C.O EVERARD & J. CALLENDER. 1990. Leptospirosis in Barbados. A clinical study. W Indian Med J 39(1): 27-34.

EDWARDS, C.N., G.D. NICHOLSON, T.A. HASSELL, C.O. EVERARD & J. CALLENDER. 1988. Penicilin therapy in icteric leptospirosis. Am J Trop Med Hyg 39(4):388-390.

FAINE, S. 1999. Bacterial infections of humans: epidemiology and control. J Antimicrob Chemother 44(3):422-423.

FAINE, S., B. AFLRT, C. BOLIN & P. PEROLAT.1999. *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd Ed. Melbourne, Australia. MediSci. 272p.

FERRO, B., A. RODRÍGUEZ, M. PÉREZ, & B. TRAVI. 2006. Seroprevalencia de infección con *Leptospira* en habitantes de barrios periféricos de Cali, Colombia. Biomédica 26:250-257.

FLANNERY, B., M. M. PEREIRA, L. F. VELLOSO DE, C.C. CARVALHO DE, L.G DE CODES, G. S. ORRICO DE, C. M. DOURADO, L. W. RILEY, M. G. REIS & A.I KO. 2001. Referral pattern of leptospirosis cases during a large epidemia urban of dengue. Am J Trop Med Hyg 65(5):657-663.

GARCIA, D., R. NICHOLLS, A. ARÉVALO, O. TORRES & S. DUQUE. 2005. Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados en gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*. Biomédica 25(4):451-463.

GAYNOR, K., A. R. KATZ, S. PARK, M. NAKATA, T. A. CLARK & P. EFFLER. 2007. Leptospirosis on Oahu: an outbreak associated with flooding of an University Campus. Am J Trop Med Hyg 76:882–885.

GONZÁLEZ, M., N. BATISTA, M. MACHADO, O. SAVOURNIN, A. SALTARÉN, A. SANAMÉ, I. OCHOA, Y. RODRÍGUEZ, M. NARANJO, Y. VALDÉS, I. GONZÁLEZ & G. SIERRA. 2004. Caracterización de cepas de *Leptospira ballum* aisladas de casos clínicos. Inmunidad cruzada en hámsteres vacunados con vax-SPIRAL®. Rev Biotecnol Aplic 21(2): 77-81.

GOTTSTEIN, B. & E. HEMMELER, 1985. Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of ecchinococcosis. J Parasitol Res 71(2):273-276.

GROSSO, M.C., M.F. CUELLO, R.A. MARTINEZ, C.R. GRECO, P. HENKLEIN, R. SHCADE & A.VIVAS. 2008. Evaluación de la especificidad de anticuerpos policlonales aviarios y mamíferos anti-Factor Precoz de Preñez porcino. Inmunología 27(1):1-10.

GRUPTA, R.K., E.H. RELYVELD, B.E. LINDBLAD, B. BIZZINE, S. BEN-EFRAIM & C.K. GRUPTA. 1993. Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvancicity. Vaccine 11:293-306.

HAAK-FRENDSCHO, M. 1994. Why IgY? Chicken Polyclonal Antibody, An Appealing Alternative. Promega Notes Magazine 46:11

HAMAL, K. R., S. C.BURGESS, I. Y. PEVZNER & G. F. ERF. 2006. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. Poult Sci 85:1364-1372.

HANLY, W. C., J. E. ARTWOHL & B. T. BENNETT. 1995. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. ILAR J 37:93- 132.

HASSL, A. & H. ASPOCK. 1988. Purification of egg yolk immunoglobulin. A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. J Immunol Methods 110 (2):225-228.

ISMAIL, T.F., M.O. WASLY, B. ABDUL RAMHAN, C.K. MURRAY, D.R. HOSPENTHAL, M. ABDEL-FADIK, M. ANDEL-MAKSOUD, A.SAMIR, M.F. HALEM, J. KLENA, G. PIMENTEL, N.E SAYED & M. HAIJEDH. 2006. Retrospective serosurvey leptospirosis among patients with acute febril illness and hepatitis in Egypt. Am J Trop Med Hyg 75(6):1085-1089.

JENSENIUS, J.C., I. ANDERSEN, J. HAU, M. CRONE & C. KOCH. 1981. Eggs: Conveniently packaged antibodies Methods for purification of yolk IgG. J Immunol Methods 46(1): 63-68.

KAPOOR, P., M. M. COMPTON & B. HOWARTH. 2000. Immunization of chickens with quail and turkey perivitelline membrane proteins: production of antibodies and their effects on fertility. Poult Sci 79:245-256.

KMETY, E. & H. DIKKEN. 1993. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. 1 Ed. Groningen, Netherlands. University Press Groningen. 104p

KO, A. I., M. GALVAO-REIS, C. M. RIBEIRO-DOURADO, W. D. J. JONSON & L. W. RILEY. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brasil. Lancet Infect Dis, 354, 820-825.

LAGUNA, V. 2000. Leptospirosis. In: (INS), I. N. D. S. & (OGE), O. G. D. E. (eds.) Serie de documentos monográficos. 2 ed. Lima: Ministerio de Salud del Perú.

LAROCQUE, R.C., R.F. BREIMAN, M.D. ARI, R.E. MOREY, F.A. JANAN, J.M. HAYES, M.A. HOSSAIN, W.A .BROOKS & P.N. LEVETT. 2005. Leptospirosis during dengue outbreak Bangladesh. Emerg Infect Dis. 11 (5): 766-769.

LARSON, A., R.N. BALOW, T. LANDHALL & P.O. FORSBERG. 1993. Chicken antibodies: taking advantage of evolution a review. Poult Sci 72:1807- 1812.

LEVETT, P.N. 2001. Leptospirosis. J Clin Microbiol Review 14(2):296-326

LIBRATY, D. H., K. S. A. MYINT, C. K. MURRAY, R. V. GIBBONS, P. AMMEN, T. P. ENDY, W. LI, D. W. VAUGHN, A. NISALAK, S. KALAYANAROOJ, D. R. HOSPENTHAL, S. GREEN, A. L. ROTHMAN & F. A. ENNIS. 2007. A Comparative

Study of Leptospirosis and Dengue in Thai Children. PLoS Neglected Tropical Diseases 1(3): e111. doi:10.1371/journal.pntd.0000111.

MAHDAVI, A. H., H. R. RAHMANI, N. NILI, A. H. SAMIE & S. SOLEIMANIAN-ZAD. 2010. Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Powder Against Escherichia coli O78:K80. J Anim Vet Adv 9:366-373.

MAROTTO, P. C., C. M. NASCIEMENTO, J. ELUF-NETO, M. S. MAROTTO, I. ANDRADE, J. SZTANJBOK & A. C. SEGURO. 1999. Acute lung injury in leptospirosis. Clin Infect Dis 29:1561-1563.

MASUZAWA, T., Y. OKAMOTO, Y. UNE, T. TAKEUCHI, K. TSUKAGOSHI, N. KOIZUMI, N. KAWABATA, S. OHTA & Y. YOSHIKAZA, 2006. Leptospirosis in Squirrels Imported from United States to Japan. Emerg Infect Dis 12:1153-1155.

MOORE, G., L.F. GUPTILL, N.W. GLICKMAN, R.J. CALDANARO, D. AUCOIN & L.T. GLICKMAN, 2006. Canine leptospirosis, United States, 2002–2004. Emerg Infect Dis 12(3):501-503.

MORRIS, H., C. MARTINEZ, T. ROBERTO, R. ABDALA & D. CAMPOS. 1999. Adyuvantes inmunológicos. Rev Cubana Invest Bioméd 18(2):130-137.

MYELLER, A.P. & H.R. WOLFE. 1961. Precipitin production following massive injection of BSA in adult chicken. Int Arch Allergy Immunol. 19:321-325.

MYERS, D. 1987. Serodiagnosis of human leptospirosis by counterimmunoelectrophoresis. J Clin Microbiol 25:897-899.

NAJERA, S., N. ALVIS, D. BABILONIA, L. ALVAREZ& S. MATTAR. 2005. Occupational leptospirosis in a Colombian Caribbean area. Sal Pub Mex, 47:240-244.

NARANJO, M., M. SUÁREZ, C. FERNÁNDEZ, N. AMADOR, M. GONZÁLEZ, N. BATISTA, I. GONZÁLEZ, Y. VALDÉS, J. INFANTE & G. SIERRA. 2007. Estudio de un brote de leptospirosis en Honduras tras el paso del huracán Mitch y potencialidad profiláctica de vax-SPIRAL®. Vaccimonitor 16(3): 13-18.

NARAT, M. 2003. Production of antibodies in chickens. Food Tech Biotechnol 41: 259-267

OCHOA, R., J. MARTINEZ, X. FERRIOL, E. ESTRADA, A. GARCÍA & R. BLANCO. 2000. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. VacciMonitor 9:13-18.

OIE. 2008. Leptospirosis: HEALTH, W. O. F. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2.1.9. Francia.

(http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.01.09.%20Leptospirosis.pdf. Consulta: 24 diciembre 20101)

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 1957. Diagnóstico de la leptospirosis y tipificación de las leptospiras. Comunicado público 14.

ORREGO, A., G. GIRALDO-DE-LEON, B. RIOS & P. VALENCIA. 2003. Leptospirosis en personas de riesgo de quince explotaciones porcinas y de la central de sacrificio de Manizales, Colombia. Arch Med Vet 3:1-10.

PACCIARINI, M., M. SAVIO, S. TAGLIABUE & C. ROSSI. 1992. Repetitive sequences cloned from *Leptospira interrogans* Serovar hardjo genotype hardjoprajitno and their application to serovar identification. J Clin Microbiol 30:1243-1249.

PINTO, J., M. BARCO, M. C. AFANADOR, A. M. MERCHÁN, M. F. MONTAÑEZ, F. ANDRADE & O. TORRES. 2005. Obtención de anticuerpos policlonales IgY antiparvovirus canino a partir de yema de huevo de gallina. Univ Sci 10(1): 37-44.

POLSON, A., V. WECHMARMB & M. RAGENMORTEL. 1980. Isolation of viral IgY antibodies of yolk of immunized hens. Immunol Commun 9(5):475-493.

RAJ, G. D., B. LATHA, M. S CHANDRASEKHAR & V. THIAGARAJAN. 2004. Production, characterization and application of monoclonal antibodies against chicken IgY. Vet Arhiv 74(3): 189-199.

RIM, B., C. RIM, W. CHANG & I. KAKOMA. 1993. Leptospirosis serology in Korean wild animals. J Wildl Dis 29 (4):602-603.

RODRIGUEZ, S. 2010. Seroprevalencia de leptospirosis bovina en cuatro municipios ubicados en el sur del estado de Veracruz. México. Maestro, Universidad Veracruzana, 107p.

ROMERO, M. & J. SANCHEZ. 2009. Seroprevalence of the canine leptospirosis in three municipalities of the Tolima department-Colombia. Revista Mvz Cordoba 14(2):1684-1689.

ROMERO, M., M. ASTUDILLO & M. QUINTERO. 2009. Seroprevalencia y serotipificación de leptospirosis canina en el municipio de Buenaventura (Valle del Cauca). Biosalud 8(1):71-76.

SCHADE, R., C. STAAK, C. HENDRICKSEN, M. ERHARD, H. HUGL, G. KOCH, A. LARSSON, W. POLLMANN, M. REGENMORTEL, E. RIJKE, H. SPIELMANN, H. STEINBUSCH & D. STRAUGHAN. 1996. The production of avian (Egg Yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of EVCAM workshop. ECVAM 24: 925-934.

STANCHI, N., E. PENNIMPEDE & C. GOMEZ. 1991. Serología de la leptospirosis experimental en cobayos, (*Cava porcellus*) fenómeno de zona. Act Bioquim Cli Latinoam 25:29-31.

STORCK, C., M. SAINT LOUIS, T. FOUCAND, I. LAMAURY, J. DELOUMEAUX, G. BARANTON, M. SIMONETTI, N. SERTOUR, M. NICOLAS, J. SALIN & M. CORNET. 2010. Leptospirosis in Hospitalized Patients, Guadeloupe. Emerg Infect Dis 16(2): 331-334

STRAW, B.E., N.J. MACLACHLAN, W.T. COBERTT, P.B. CARTER, & H.M. SCHEY. 1985. Comparison of tissue reactions produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvants in swine. Can J Comp Med 49:149

TERRON, A.H., J.E. ROHAN & I. MATOS-MATOS. 2007. Leptospirosis. Revisión de literatura. Facultad de Ciencias Médicas de Guantánamo. (http://www.16deabril.sld.cu/rev/228/articulo1.html. Consulta: 5 abril 2011)

TUCUNDUVA DE FARIA, M., D. A. ATHANAZIO, D. A. GONCALVES-RAMOS, E. F. SILVA, M. G. REIS & I. A. KO. 2007. Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. J Comp Pathol 137:231-238.

URIBE, A. O., DE LEON, G. G., ARANGO, B. R. & P. A. PRADA. 2003. Leptospirosis in high risk groups of workers from fifteen piggeries and the central abbatoir in Manizales, Colombia. Arch Med Vet 35:205-213.

VANASCO, N.B., J. LOTTERSBERGER, M.F. SCHMELING, I.A. GARDNER & H.D. TARABLA. 2007. Diagnóstico de leptospirosis: evaluación de un enzimoinmunoensayo en fase sólida en diferentes etapas de la enfermedad. Pan Am J Public Health 21(6):388–395.

VINETZ, J. 2001. Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis, 14 (5):527-538.