

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS MATERNOS TRANSFERIDOS A
BECERROS NACIDOS DE VACAS VACUNADAS CONTRA LEPTOSPIROSIS EN
UN RANCHO LECHERO DE ATITALAQUIA HIDALGO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:**

MARIA DE LA PAZ GOMEZ REYNOSO

**ASESOR: M. EN C. VICTOR MANUEL BANDA RUIZ
COAESORA: M. EN C. AURORA ROMERO TEJEDA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A DIOS por llenar de esperanza cada uno de mis días y darme las fuerzas necesarias para mantenerme siempre de pie.

A mi padre Federico Gómez quien me ha enseñado que a base de paciencia, constancia y humildad los sueños se pueden hacer realidad. Te amo papi.

A mi madre Cecilia Reynoso quien me ha transmitido su fortaleza y la lucha por la vida, por enseñarme a que nunca hay que rendirse por dura que sea la tempestad y sobre todo por ser mi mejor amiga. Gracias por creer en mi mami, Te amo.

A mis hermanos Elena, Beatriz, Sandra y Federico por el apoyo incondicional que siempre me han brindado y los momentos felices que hemos pasado juntos. Los quiero mucho.

A mi esposo Carlos Angeles por ser una persona maravillosa, quien ha estado conmigo en las buenas y en las malas, por compartir conmigo lo mejor de su vida y transmitirme lo mejor de sí. Este triunfo es tuyo también. Te amo.

A mi hijo Carlos Alberto, quien ha tenido la paciencia necesaria para ayudarme a cumplir este sueño y por hacerme feliz todos los días de mi vida. Te amo.

AGRADECIMIENTOS

A mi escuela querida FES Cuautitlán Campo 4, que me ha brindado la mayor de las oportunidades, el llegar a ser una profesionista. Gracias por abrirme siempre tus puertas.

Al CEDID-Microbiología (INIFAP), por ofrecerme sus instalaciones y su material para la realización de mi tesis.

A los miembros de mi jurado por enriquecer más este trabajo.

A Aurora Romero, por ser una amiga ejemplar, por compartir conmigo muchos increíbles momentos llenos de alegría, por estar a mi lado en los momentos más difíciles y hacerme ver que la vida es lo más hermoso que hay. Gracias por tu ayuda incondicional. Te quiero y te admiro mucho.

Al MVZ Alfredo García, quien me ha enseñado que los triunfos están llenos de esfuerzo y dedicación, por brindarme su ayuda sincera y ser un ejemplo a seguir.

Al MVZ Mario Vargas, por el gran apoyo y confianza brindados para la realización de mi tesis.

Al M. en C. Victor Manuel Banda Ruiz, por darme el apoyo necesario durante este proyecto, gracias por su confianza y por haber sido parte importante de este trabajo.

Al MVZ Miguel Angel Luna, por el gran apoyo que me brindo y por los conocimientos transmitidos para esta tesis.

A Gloria Becerril, ya que sin su apoyo hubiera sido más difícil la realización de este proyecto.

A todos mis compañeros y amigos del departamento de Leptospirosis: Lupita, Conchita, Vero y Enrique.

A Norma, Oscar y Marco por su linda amistad.

A mis amigos de toda la vida, con quienes he compartido momentos maravillosos imposibles de olvidar. Gracias por enriquecer mi vida, los quiero mucho: Carmen, Rosario, Elvia, Ana, Arturo, Alberto, Roberto, y Luis.

INDICE GENERAL

	Página
1. RESUMEN	í
2. INTRODUCCION	1
2.1 Definición y etiología.....	1
2.2 Transmisión.....	2
2.3 Signología.....	2
2.4 Lesiones Patológicas.....	3
2.5 Diagnóstico y tratamiento.....	4
2.6 Prevención y control.....	5
2.7 Situación actual de la leptospirosis en México.....	5
2.8 Antecedentes directos.....	6
3. HIPOTESIS	9
4. OBJETIVOS	9
5. JUSTIFICACION	9
6. METAS	9
7. MATERIAL Y METODOS	10
7.1 Prueba inmunoenzimática (ELISA).....	10
7.2 Prueba de aglutinación microscópica (AM).....	11
8. RESULTADOS	13
8.1 Prueba inmunoenzimática (ELISA).....	13
8.2 Prueba de aglutinación microscópica (AM).....	14
9. DISCUSION	16
10. CONCLUSIONES	20
11. ANEXOS	21
11.1 Anexo 1. Protocolo de la prueba inmunoenzimática (ELISA).....	21

11.2 Anexo 2. Protocolo de la prueba de aglutinación microscópica (AM).....	22
12. INDICE DE TABLAS	

	Página
Tabla 1. Edad de los becerros al primer muestreo.....	23
Tabla 2. Resultados generales de los 37 becerros a las pruebas ELISA y AM.....	24

13. INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en becerros calostrados. Muestreo 1 (día 0).....	25
Gráfica 2. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en becerros calostrados. Muestreo 2 (día 15).....	25
Gráfica 3. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en becerros calostrados. Muestreo 3 (día 30).....	26
Gráfica 4. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en becerros calostrados. Muestreo 4 (día 60).....	26
Gráfica 5. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en becerros calostrados. Muestreo 5 (día 90).....	27
Gráfica 6. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en becerros calostrados. Muestreo 6 (día 120).....	27
Gráfica 7. Número de becerros positivos y negativos a la prueba de ELISA.....	28
Gráfica 8. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en nodrizas.....	29
Gráfica A. Porcentaje de becerros positivos a las diferentes serovariedades de <i>L.interrogans</i> mediante la prueba de AM.....	30
Porcentaje de becerros positivos a las serovariedades altamente reactivas durante los 6 muestreos mediante la prueba de AM. (Gráficas: a1, a2, a3, a4).....	31

Porcentaje de becerros positivos a las serovariedades moderadamente reactivas durante los 6 muestreos mediante la prueba de AM (Gráficas: a5, a6, a7, a8)	32
Porcentaje de becerros positivos a las serovariedades menos reactivas durante los 6 muestreos mediante la prueba de AM. (Gráficas: a9, a10, a11, a12)	33
Gráfica B. Porcentaje de vacas nodrizas positivas a las diferentes serovariedades de <i>L. interrogans</i> en AM.....	34
Gráfica C. Número de serovariedades de <i>Leptospira</i> que reaccionaron en becerros en la prueba de AM.....	35
Gráfica D. Número de serovariedades de <i>Leptosira</i> que reaccionaron en vacas nodrizas en la prueba de AM.....	36
14. APENDICE DE REACTIVOS	37
15. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38

1. RESUMEN

La leptospirosis bovina es una enfermedad infecciosa que causa grandes pérdidas económicas en la industria ganadera debido a que provoca graves problemas reproductivos en el ganado. Es indispensable un adecuado manejo zootécnico y de bioseguridad dentro de las explotaciones para prevenir futuras infecciones, así como un apropiado calendario de vacunación que permita evitar el contagio de los animales. Por esta razón, es importante saber la etapa adecuada para comenzar la vacunación en animales jóvenes que nos permita asegurar su exitosa inmunización sin intervenir con la transferencia de anticuerpos maternos a través del calostro. El objetivo de este trabajo fue el conocer la duración de los anticuerpos maternos en los becerros provenientes de vacas vacunadas contra leptospirosis para poder establecer la fecha de vacunación conveniente, además de conocer las serovariedades presentes en la explotación. El presente trabajo se realizó en el Centro de Producción Bovina “Chelita” ubicado en el estado de Hidalgo, en el cual se efectuaron un total de 6 muestreos recolectando un total de 220 muestras de sangre de 37 becerros y de sus madres. En los becerros, los muestreos se realizaron a la semana de edad, a los 15 días posteriores y cada mes hasta que el título de anticuerpos en suero fuera muy bajo. Las vacas se muestrearon sólo una vez al momento en que se realizó el primer muestreo de sus crías. Se realizaron las pruebas de aglutinación microscópica (AM) y ELISA para la detección de anticuerpos. En el caso de AM, la dilución más alta que se realizó fue 1:6400. Todos los sueros de los becerros reaccionaron a más de una serovariedad en esta prueba y son las siguientes: *tarassovi*, *canicola*, *grippotyphosa* y H89 (100%), *pomona* y *hardjo* (92%), *wolffi* (87%), *portland vere* (79%), Palo Alto (57%), *icterohaemorrhagiae* y *pyrogenes* (49%), y *bratislava* (24%). En las nodrizas, las serovariedades fueron: *tarassovi* y *canicola* (96%), *grippotyphosa* y *hardjo* (91%), Palo Alto (86%), H 89 (82%), *icterohaemorrhagiae* y *wolffi* (73%), *pomona* (68%), *portland vere* (60%), *bratislava* (41%) y *pyrogenes* (32%). El título de anticuerpos en la mayoría de las serovariedades decae considerablemente al quinto muestreo (90 días). En la prueba de ELISA, el 72.22% de los becerros fueron positivos en el primer muestreo, el 67.57% a los 15 días, el 36.11% al día 30, el 32.43% al día 60, el 8.11% al día 90 y en el último muestreo (día 120), el 100% fueron negativos. En cuanto a las vacas nodrizas, el 41% fueron positivas a ELISA. En ambas pruebas, los niveles de anticuerpos de los becerros decaen a los 3 meses de edad. En conclusión, en este trabajo se observó que debido a la decadencia temprana del título de anticuerpos maternos en los becerros, es necesario realizar técnicas de manejo adecuadas como limpieza, control de fauna silvestre y nociva, así como la estabulación de animales de edades similares para prevenir que esta enfermedad los afecte cuando son más susceptibles. Asimismo, sería importante considerar que el inicio de la vacunación contra leptospirosis en becerros pudiera realizarse antes de los seis meses de edad como se practica generalmente en la mayoría de las explotaciones en México.

2. INTRODUCCION

2.1 Definición y etiología.

La leptospirosis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial, la cual se presenta con mayor frecuencia en los países de clima tropical, mientras que en América Latina, la mayoría de los casos se registran durante la época de lluvias (Ferrer, 1995; Banda 1996; Carrillo, 2005; Caballero, 1997). Es una enfermedad de origen bacteriano que afecta tanto a humanos como a diferentes especies animales, tanto silvestres como domésticos (Ferrer, 1995; Luna, 2005; Amstutz, 2000; Banda, 1996; Torres, 1995). La presencia en México de este padecimiento en las explotaciones bovinas es un factor negativo en los márgenes de ganancias dentro de la producción, ya que afecta seriamente el nacimiento de becerros, provoca retraso en el mejoramiento genético, ocasiona elevados costos por la compra de medicamentos y de manutención de los vientres, así como una baja eficiencia productiva y reproductiva, además de ser considerada como una zoonosis importante (Cantú, 2000).

La leptospirosis es causada por espiroquetas del género *Leptospira*. Estas se agrupan en serovariedades serológicamente distintas, muchas de las cuales se consideran como subgrupos de *Leptospira interrogans* (Amstutz, 2000; Banda, 1996; Scanlan, 1991). Son bacterias helicoidales gram-negativas, tienen forma de gancho en ambos extremos de la bacteria (Scanlan, 1991; Stanier, 1996; Caballero, 1997) y se mueven mediante dos flagelos periplásmicos que parten de cada uno de los polos (Ingraham, 1998; De la Peña, 2003). Su tamaño varía de 6-20 micras de longitud y 0.1 micras de diámetro (Scanlan, 1991; Carrillo, 2005) y pueden presentar 18 espiras o más. Son microaerofílicas y crecen a temperatura de 30°C y pH de entre 6.8 y 7.8 (Scanlan, 1991). Se han identificado alrededor de 250 variantes serológicas, agrupándose a su vez en 23 serogrupos basados en la estructura antigénica predominante que comparten (Carrillo, 2005).

Las serovariedades más comunes de *L. interrogans* son: *canicola* en caninos, *grippotyphosa* y *pomona* en animales salvajes, *hardjo*, *pomona* (M. Scanlan, 1991), *wolffi* y *tarassovi* en bovinos (Cantú, 2000) e *icterohaemorrhagiae* en roedores (Scanlan, 1991). Es importante resaltar el hecho de que la serovariedad *hardjo* ha sido reportada a nivel mundial como la más patógena en el ganado bovino y la que está más frecuentemente asociada a problemas reproductivos (Cantú, 2000). Muchas serovariantes se encuentran de forma

predominante en hospederos mamíferos, pero la distribución de una serovariedad específica no es exclusiva de un determinado hospedador (Rebhum, 1999).

2.2 Transmisión.

La infección se produce por la penetración de la bacteria a través de las mucosas de la conjuntiva, del tracto digestivo, del tracto reproductor, de heridas por la piel o en la piel dañada por la humedad (Ellis, 2001; Amstutz, 2000; Rebhum, 1999; Scanlan, 1991; Torres, 1995; Rubin, 1999). La transmisión puede ser en forma indirecta a través de la contaminación del medio ambiente ya sea por orina de animales convalecientes o crónicos (reservorios), fetos abortados y secreciones uterinas, los cuales van a contaminar los pastos, alimentos y el agua de bebida. La infección directa puede ocurrir por la ingestión de leche de vacas infectadas, por vía venérea cuando los genitales están contaminados con restos de orina, semen, y por el contacto hocico-genitales (Rebhum, 1999; Moles, 2003; Ellis, 1986; Torres, 1995; Esparza, 1998). Los fetos se pueden infectar por vía transplacentaria. Los fetos infectados en el útero pueden morir y ser abortados, o bien pueden sobrevivir a la infección, desarrollar inmunidad y nacer con la infección preestablecida (Tirado, 2002). Una vez en el organismo del animal, generalmente se produce septicemia y luego la bacteria se dirige especialmente al hígado y al riñón (Ellis, 2001). Luego de un periodo donde aparecen o no signos clínicos, se eliminan leptospiras vivas a través de la orina durante lapsos de tiempo variables (Rebhum, 1999).

2.3 Signología.

La leptospirosis bovina puede desarrollarse en dos presentaciones:

a) *Leptospirosis aguda*: La leptospirosis aguda causada por *L. pomona* es más frecuente en los terneros, pero se puede ver en las vacas lecheras adultas. Los terneros tienen un comienzo agudo de fiebre de 41°C, septicemia, anemia hemolítica, hemoglobinuria, inapetencia, frecuencias cardíaca y respiratoria aumentadas e ictericia. La mortalidad es elevada en los terneros de menos de 2 meses de edad (Rebhum, 1999). Las vacas adultas con infecciones agudas por *pomona*, presentan septicemia, tienen fiebre elevada y un cese completo del flujo de leche acompañado de una ubre laxa y una secreción espesa que es de color rojo, naranja o amarillo oscuro en todos los cuartos. Las vacas adultas pueden manifestar

hemoglobinuria y pueden abortar durante la fase septicémica (Banda, 1996; Rebhum, 1999; Scanlan, 1991).

b) *Leptospirosis subaguda o crónica*: Es más frecuente en vacas lecheras adultas y a no ser que presenten fiebre, hemoglobinuria o ictericia, pueden pasar inadvertidas sin ser diagnosticadas hasta que aparecen los abortos epidémicos. El aborto suele ocurrir varias semanas después de la infección, pudiendo abortar un grupo de animales en un plazo de pocos días o de pocas semanas. Los becerros infectados en el útero durante las fases terminales de la gestación pueden nacer prematuros, mueren en un periodo de 24 a 48 hrs o nacen muertos y en ocasiones hay infertilidad pasajera. Los fetos abortados pueden presentar ligera autólisis (Rebhum, 1999; Torres, 1995) o momificación (Banda, 1996; Torres, 1995).

Las vacas infectadas de modo natural con la serovariedad *hardjo*, pueden eliminar la bacteria en su orina durante un periodo de 28 a 40 semanas (Rebhum, 1999). Cuando la enfermedad se introduce en el rebaño, es posible una septicemia aguda la cual se manifiesta por fiebre, abatimiento, inapetencia y una ubre laxa que segrega leche espesa de un color amarillo a naranja en todos los cuartos, el aborto puede ocurrir entre las 4 y 12 semanas después de la infección (Banda, 1996; Rebhum, 1999; Scanlan, 1991). Sin embargo, la infección clínica seguida de aborto, es la presentación más común de la serovariedad *hardjo*. En este tipo de rebaños endémicos, pueden existir vacas adultas resistentes, pero los problemas reproductivos se presentan principalmente en novillas de primer parto que se incorporan al rebaño (Rebhum, 1999).

2.4 Lesiones patológicas.

Entre las principales lesiones destacan la ictericia debido al daño hepático y hemorragias submucosas en casos agudos. Los riñones se encuentran congestionados e inflamados con petequias multifocales y hemorragias equimóticas. Existe hepatomegalia con áreas mínimas de necrosis focal. Pueden observarse petequias en otros órganos en casos fulminantes, sin embargo, en las infecciones de alta prevalencia provocados por *hardjo*, las lesiones están limitadas principalmente a riñón (Amstutz 2000; Banda, 1996; Scanlan, 1991). Posteriormente puede sobrevenir la muerte por uremia o insuficiencia hepática. Los fetos normalmente mueren en el útero y sufren autólisis moderada antes de ser abortados, y muchos de ellos tienen nefritis intersticial leve (Scanlan, 1991).

2.5 Diagnóstico y tratamiento.

El diagnóstico de leptospirosis generalmente se realiza en base a signos clínicos, y se requiere del apoyo del diagnóstico de laboratorio. La prueba de aglutinación microscópica (AM), es un método de diagnóstico estándar internacional recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) por ser una prueba sensible y específica para determinar la serovariedad involucrada en la infección (Céspedes, 2002; Banda, 1994; Cho, 1989; Surujballi, 1997; Cousins, 1985; Smith, 1994; Moles, 2003; Torres, 1995). Esta prueba detecta tanto anticuerpos de tipo IgM como IgG, aunque su limitante principal es la incapacidad para diferenciar entre títulos después de la vacunación y los producidos después de una infección, debido a que los títulos pueden tener la misma magnitud (Radostits, 2002; Smith, 1994). Otras de las desventajas de esta prueba son la utilización y manejo de antígenos vivos, suele ser una prueba complicada y tediosa de realizar, y puede existir diversidad en los resultados por los diferentes criterios de las personas que realizan el diagnóstico, por lo cual se requiere de un personal altamente capacitado. (Banda, 1994; Cousins, 1985; Bercovich, 1990).

Por esta razón, se han buscado otras alternativas de diagnóstico como la prueba inmunoenzimática (ELISA), la cual tiene un alto grado de sensibilidad y especificidad (Cousins, 1985), además de que es capaz de diagnosticar reacción cruzada entre serovariedades (Cho, 1989; Cousins, 1985). La prueba tiene muchas ventajas desde el punto de vista práctico, entre las cuales destacan el manejo de una gran cantidad de muestras de suero, es rápida y sencilla de realizar, además es específica para diferenciar entre anticuerpos IgM o IgG. En consecuencia, un resultado positivo de ELISA específico de IgM indica que la infección es reciente (Goddard, 1991; Cousins, 1985).

El tratamiento para la leptospirosis esta basado en la administración de antibióticos como la estreptomycinina e hidroestreptomycinina a razón de 25 mg/kg de peso vivo (Banda, 1996; Moles 2003) una vez al día repitiendo la dosis a los 15 días (Banda, 1996; Rebhum, 1999), Ha resultado eficaz cuando se administran en las primeras fases de la enfermedad reduciendo el número de leptospiras en riñón y otros tejidos durante el tratamiento. La clortetraciclina y oxitetraciclina también son antibióticos de elección para el tratamiento de esta enfermedad (Amstutz, 2000).

2.6 Prevención y control.

Los métodos de manejo utilizados para reducir la transmisión de la leptospirosis, incluyen el control de ratas y perros, el confinamiento del ganado en áreas cercadas para evitar su acceso a los arroyos, lagunas o estancamientos de agua potencialmente contaminados y la selección de animales de reemplazo en rebaños que son serológicamente negativos. Sin embargo y a pesar de controlar todos estos factores, es necesario establecer un calendario adecuado de vacunación dentro de las explotaciones (Amstutz, 2000; Banda, 1996; Rebhum, 1999). El empleo de inmunógenos elaborados con serovariedades identificadas en la zona en donde se pretende inmunizar reduce considerablemente la incidencia de la enfermedad, además de que se debe revacunar constantemente para mantener un grado suficiente de inmunidad en el hato (Banda, 1996). Este periodo de vacunación varía entre explotaciones, teniendo un rango de entre 4 a 6 meses entre cada revacunación según la prevalencia de la enfermedad y los animales comienzan a ser vacunados a partir de los 6 meses en muchas de las explotaciones en México (Rebhum, 1999; Moles, 2003). De esta manera, la edad óptima para inmunizar a un animal joven es después de que los anticuerpos maternos han sido catabolizados y cuando el sistema inmunitario es suficientemente maduro para responder frente a los antígenos con cantidades adecuadas de anticuerpos (Gorman, 1992).

2.7 Situación actual de la leptospirosis en México.

Ante los problemas que causa la leptospirosis a nivel económico y de zoonosis en explotaciones bovinas, se han realizado algunas investigaciones sobre la prevalencia de las diferentes serovariedades de leptospira en nuestro país, así como su distribución a nivel nacional. Un estudio realizado entre los años 1991 a 2003 refiere una seropositividad del 49.7% en diferentes zonas de México, mostrando una mayor prevalencia de la enfermedad en estados con clima trópico húmedo (Luna, 2005; Moles, 2003), (63.8%), seguido de un 45.9% en clima trópico seco. Las serovariedades más sobresalientes fueron *hardjo*, *wolffi* y *tarassovi*. En la zona templada, la frecuencia promedio de leptospirosis fue de 39.4% predominando *hardjoprajitno* cepa H-89, *hardjo*, *wolffi* y *tarassovi* (Luna, 2005).

Actualmente, estos problemas han ido disminuyendo a través de la aplicación de vacunas, aunque es necesario enfatizar que una vacuna bien elaborada y que contenga las

serovariedades que están afectando al hato confiere una protección inmunológica satisfactoria (Moles, 2003).

2.8 Antecedentes directos.

La presencia de inmunoglobulinas en el suero de un animal recién nacido, si este no ha recibido calostro, es indicativa de un estímulo antigénico intrauterino y pueden utilizarse en el diagnóstico serológico de una infección fetal (Smith, 1994; Tizard, 2000; Gorman, 1992). Sin embargo, si se introducen antígenos de forma experimental o por una infección natural la reacción fetal dependerá de la naturaleza del antígeno y de la etapa de gestación en la que se encuentre la madre, ya que las infecciones mortales se producen antes de que el sistema inmune del feto pueda elaborar una respuesta protectora, principalmente durante las primeras fases de gestación (Gorman, 1992). Algunas investigaciones han demostrado que la actividad bactericida está presente en el suero del feto bovino a los 75 días de gestación, encontrándose anticuerpos frente a *Leptospira saxcoebing* a partir de los 162 días tras la inoculación de este antígeno (Gorman, 1992).

Normalmente, debido al tipo de placentación en bovinos (epiteliocorial) no existe transferencia de anticuerpos de la madre a la cría (Tizard, 2000; Gorman, 1992; Cano, 2002). Por esta razón es de vital importancia la administración del calostro a la cría, ya que contiene una gran cantidad de inmunoglobulinas las cuales se absorben por pinocitosis en las células del epitelio del intestino delgado, siendo el íleon el principal órgano para la absorción, con escasa absorción en el duodeno y en el yeyuno (D.C., 1993). El transporte de las inmunoglobulinas se lleva a cabo por medio de vacuolas que llegan a los vasos linfáticos, de ahí pasan al conducto torácico y posteriormente a la sangre, este proceso es muy rápido, ya que estos anticuerpos se pueden detectar en el conducto linfático y torácico en 6 a 120 minutos (Cano, 2002; Palit, 1991). En condiciones normales las concentraciones máximas de inmunoglobulinas se alcanzan entre 12 y 24 horas después del nacimiento (Tizard, 2000; Morilla, 1989). Las IgG₁ e IgG₂ tienen una capacidad de absorción del 90% y proceden del suero de la madre; la IgM se absorbe en un 59%, proviniendo tanto del suero de la madre como de la glándula mamaria, mientras que el 60% de la IgA es sintetizada en la glándula mamaria y se absorbe hasta en un 48% (Cano, 2002). Además de estas inmunoglobulinas, el calostro contiene linfocitos y macrófagos así como otros componentes inmunológicos

inespecíficos (lisozima, lactoferrina, complejo lactoperoxidasa/tiocianato/H₂O₂), proteínas fijadoras de vitamina B₁₂ y folato entre otros, que confieren inmunidad al becerro y lo protegen contra las infecciones presentes en la explotación (Illera, 1994; Morilla, 1989).

La absorción en el neonato de todas las inmunoglobulinas disminuye considerablemente después de aproximadamente 24 horas post-nacimiento y esto se debe a que las células epiteliales intestinales encargadas de absorberlas se van modificando, además de que existe un aumento de enzimas proteolíticas en la luz intestinal y un descenso del pH en los pre-estómagos (Gorman, 1992; Morilla, 1989). La mayor absorción de inmunoglobulinas se presenta inmediatamente después de nacido y declina drásticamente seis horas después, es por esto que la primera toma de calostro debe realizarse durante las primeras dos horas o máximo tres horas después de haber nacido el animal (Tizard, 2000; D.C., 1993). La presencia de la madre puede relacionarse con una mayor absorción de inmunoglobulinas. Cerca del 97% de las inmunoglobulinas maternas IgA, IgM e IgG son catabolizadas a los 14, 24 y 100 días respectivamente, aunque la duración exacta de la inmunidad pasiva es muy variable, ya que depende de la concentración de anticuerpos en la madre, del volumen ingerido y la eficiencia con que ésta los transfiera a sus hijos (Gorman, 1992).

El medir el grado de transferencia de inmunidad pasiva en los becerros recién nacidos en una explotación lechera es muy importante, ya que esto reduce la incidencia de enfermedades y muertes en las primeras horas de vida. Por tal motivo, existe un método para evaluar la calidad del calostro, mediante la estimación de la gravedad específica (calostrómetro), el cual cuantifica el total de proteínas y sólidos totales, traduciéndose que a mayor densidad, mayor cantidad de anticuerpos presentes (Tizard, 2000; Cano, 2002; Blanco, 2002).

Por la importancia que representa la leptospirosis dentro de la industria ganadera en nuestro país, es importante saber la etapa adecuada para comenzar el esquema de vacunación en los animales jóvenes, y así prevenir futuras infecciones dentro de las explotaciones. Teóricamente, la vacunación de los animales debe realizarse cuando el sistema inmune del becerro madure, lo cual sucede a los 6 meses de edad aproximadamente y cuando los anticuerpos maternos han descendido (Moles, 2003); sin embargo, estos parámetros han sido poco estudiados en el caso de leptospirosis. En el presente trabajo, se evaluará la transmisión de los anticuerpos maternos provenientes de vacas vacunadas contra leptospirosis a becerros,

así como su persistencia en los becerros y las principales serovariedades que prevalecen en la zona del altiplano mexicano.

HIPOTESIS

Los anticuerpos producidos en respuesta a la inmunización contra leptospirosis en vacas, son transferidos a los becerros por medio de inmunidad pasiva, protegiéndolos de ésta enfermedad en los primeros meses de vida hasta el momento de su vacunación.

4. OBJETIVOS

- 4.1** Determinar la presencia de anticuerpos maternos en sueros de animales nacidos de vacas inmunizadas contra leptospirosis.
- 4.2** Determinar las serovariedades de leptospira.
- 4.3** Determinar la duración de la inmunidad pasiva en los becerros.

5. JUSTIFICACION

Se consideró importante la realización de esta investigación no sólo para conocer la cantidad y la duración de anticuerpos que mantienen los becerros debido a la inmunidad pasiva que les confieren sus madres vacunadas, sino también para detectar las serovariedades de *Leptospira Interrogans* que existen en la zona y así emplear el tipo de inmunógeno específico y conocer la fecha o época más apropiada para la vacunación.

METAS

Al final del proyecto se determinó la respuesta inmune pasiva en becerros nacidos de vacas vacunadas y establecer calendarios de vacunación adecuados en los mismos para prevenir futuras infecciones.

7. MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 37 animales de la raza Holstein Friesian (15 machos y 22 hembras), los cuales provienen del Centro Intensivo de Producción Bovino ubicado en Atitalaquia, Hidalgo. Existe un manejo preventivo a base de vacunas contra IBR, DVB, PI-3 (EXPRESS 3, *BOEHRINGER INGELHEIM*), brucelosis (RB-51, *PRONAVIBE*) y clostridiasis (ULTRAVAC 7, *PFIZER*) además de la aplicación de vitaminas ADE. Los becerros al nacer, se separaron de sus madres y se alimentaron inmediatamente con calostro el cual se seleccionó a través de un calostrómetro que mide la densidad específica (1.047-1.075). Este se administró durante los primeros tres días de nacidos (4 litros divididos en 2 tomas) para posteriormente ser alimentados con sustituto de leche (*Alltech Lab.*) hasta los 60 días de edad (destete). En esta explotación los animales se comienzan a vacunar a los 6 meses de edad y se revacunan cada 3 meses con la vacuna comercial Leptoferm 5 (*PFIZER*) la cual contiene las serovariedades (Sv): *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *hardjo* y *pomona*.

Las muestras de sangre de los becerros se obtuvieron al periodo cercano del nacimiento, después a los 15, 30, 60, 90 y 120 días. También se obtuvieron muestras de las madres el mismo día de la primera toma su cría. Todas las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos con el fin de obtener el suero y se mantuvieron en tubos *ependorf* de 1.5 ml a una temperatura de -20° C hasta su uso en el laboratorio.

Para determinar anticuerpos se realizó la prueba de ELISA, mientras que para conocer el título de anticuerpos y la Sv. involucrada se empleó la AM.

7.1 Prueba inmunoenzimática (ELISA).

Para sensibilizar las placas, se utilizó la cepa de *L. interrogans* Hardjoprajitno Sv *hardjo* la cual fue cultivada en medio líquido de Cox e incubada a 30°C durante siete días. La cepa fue cosechada por centrifugación a 12,000 g (*Beckman Coulter TM*) y fraccionada por métodos físicos lo cual consiste en calentar a 56°C durante 30 min y enfriar a -70°C 30 minutos tres veces. Posterior a esto se cuantificó la proteína por el método de Bradford (*BIO-RAD*).

Para estimar el punto de corte de la ELISA se empleó un “tablero de ajedrez”, el cual consistió en realizar diluciones dobles del antígeno en placas de 96 pozos en forma horizontal iniciando con la dilución 1:10, de la misma forma se realizaron diluciones dobles en forma vertical, de un suero control positivo a leptospira (el cual se obtuvo de un animal positivo a AM

con un título de 1:200 a las Svs *wolffi*, *hardjo*, *tarassovi*, *grippotyphosa*, *canicola* , y a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obteniendo un producto de amplificación de 370 pb con los iniciadores Hr1 y Hr2 en orina). La dilución inicial fue de 1:20.

El punto de corte se determinó en 0.350 densidades ópticas (DO), considerando como sueros positivos en el ensayo a todos los sueros con igual o mayor DO. La dilución de trabajo del antígeno y de los sueros es de 1:300 y 1:200 respectivamente. El protocolo de esta prueba se muestra en el *Anexo 1*.

7.2 Prueba de aglutinación microscópica (AM).

En el CENID-Microbiología se cuenta con una batería de 12 Sv de *L. interrogans*: *icterohaemorrhagiae* cepa RGA; *bratislava* cepa Jez-Bratislava; *pyrogenes* cepa Salinem; *grippotyphosa* cepa Moska V; *canicola* cepa Hond Utrech IV; *pomona* cepa pomona; *wolffi* cepa 3705; *hardjo* cepa Hardjoprajitno; *tarassovi* cepa Perepelicin (provenientes del Collaborating Center for Reference and Research of Leptospirosis, Australia and Western Pacific Region, Queensland, Australia, las cuales están en resguardo del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica de la Secretaría de Salud (INDRE), D.F), *hardjo* cepa H89, *icterohaemorrhagiae* cepa Palo Alto y *portland vere* cepa Sinaloa (las últimas tres son de aislamiento nacional) que son utilizadas para la prueba de AM (Cortesía del MVZ. Miguel Ángel Luna Álvarez).

Las cepas se sembraron cada 14 días, en medio líquido de Cox, y se suplementaron con 10% de suero de conejo, el cual se obtuvo de conejos provenientes del Centro Nacional de Cunicultura (Irapuato, Guanajuato). La sangre fue colectada por sacrificio y el suero fue extraído por centrifugación. Para esterilizar el suero se utilizó un sistema *Millipore*, empleando membranas de nitrocelulosa con poros que van de 1.6, 1.2, 0.8, 0.45 y 0.22 μ . El suero estéril se almacenó hasta su uso a -20° C.

25% Aglutinación con 75% de células libres
50% Aglutinación con 50% de células libres
75% Aglutinación con 25% de células libres
100% Aglutinación o lisadas con 0% de células libres

En los becerros y vacas se consideró una reacción antígeno-anticuerpo a partir de la dilución 1:50. El protocolo de esta prueba se muestra en el *Anexo 2*.

8. RESULTADOS

El primer muestreo realizado en los becerros se efectuó durante la primera semana de nacidos (de 0 a 8 días de edad) el cual se consideró como el día cero. En la **Tabla 1** se muestra la fecha de nacimiento y la edad en la cual los becerros fueron muestreados, así también como el número de la madre, no. de partos y la nodriza de cada uno de ellos. En la **Tabla 2** se muestran detalladamente los resultados de ambas pruebas realizadas a los 37 becerros investigados.

8.1 Prueba inmunoenzimática (ELISA)

El 72.22 % (26/36) de los becerros al primer muestreo resultó positivo a la prueba, mientras que a los 15 días posteriores (segundo muestreo), el porcentaje se redujo hasta un 67.57% (25/37), observándose una reducción de animales positivos en un 4.6% entre ambos muestreos (**Gráfica 1 y 2**). Al muestreo del día 30, el porcentaje de animales positivos fue de 36.11 % (13/36) y de un 32.43% (12/37) al día 60, observándose una reducción del 3.68% de anticuerpos entre estos dos muestreos (**Gráfica 3 y 4**). El porcentaje de muestras serológicas positivas al día 90 fue de un 8.11% (3/37) y del 0% al día 120 como se observa en las **Gráficas 5 y 6**.

En general se observa una reducción en el número de becerros positivos entre los primeros dos muestreos (2 animales), sin embargo, la dos reducciones más importantes de anticuerpos que se observaron en esta prueba fueron entre los muestreos del día 15 y 30 de edad con un porcentaje de 31.46% (12 animales) de diferencia y 24.32 % (9 animales) entre los muestreos del día 60 y a 90. Todos los becerros fueron negativos a la presencia de anticuerpos maternos IgG al día 120 de edad (4 meses) (**Gráfica 7**). De los 37 becerros muestreados, el 8.11% (3/37) fueron negativos a ELISA en los seis muestreos realizados y el 91.89% (34/37) fueron positivos en uno o a más muestreos (**Tabla 2**).

En cuanto a los resultados de la prueba de ELISA en vacas nodrizas mostraron que solo 9 de ellas tuvieron anticuerpos contra leptospira (**Gráfica 8**).

8.2 Aglutinación microscópica (AM).

De las muestras obtenidas de los becerros, el 100% reaccionaron a las Svs *canicola*, *tarassovi*, *grippotyphosa* y H 89; 92% a *pomona* y *hardjo*, 87% a *wolffi*, 79% a *portland vere*, 57% a Palo Alto, 49% a *icterohaemorrhagiae* y *pyrogenes* y 24% a *bratislava* (**Gráfica A**).

El 78% de los animales fueron positivos a Sv *tarassovi* en el primer muestreo, llegando a un 89% (33/37) al segundo muestreo. Los anticuerpos descendieron a 86% (31/36) en el tercer muestreo, 62% (23/37) descendió en el cuarto, el 24% (9/37) en el quinto y de 3% (1/36) en el sexto (**Gráfica a1**). La Sv *canicola* reaccionó a la prueba de AM en el 95% de los becerros (35/37) durante el primer muestreo, observando un pico del 100% al día 15. Para el tercer muestreo (día 30) inició la disminución de anticuerpos contra esta serovariedad al 97%, 84%, 22% y 3% a los días 30, 60, 90 y 120 respectivamente (**Gráfica a2**).

La Sv *grippotyphosa* mostró un porcentaje del 84% (31/37) de animales positivos en el primer muestreo, manteniéndose igual para el segundo muestreo. La curva desciende gradualmente hasta el sexto muestreo con 3% de animales positivos (**Gráfica a3**). El porcentaje de animales positivos en la Sv H89 llegó a un máximo de 92% (34/37) en el segundo muestreo, descendiendo gradualmente hasta llegar a 6% de animales positivos en el sexto muestreo (**Gráfica a4**).

El 65% (24/37) de los becerros, fueron positivos a la Sv *pomona*, teniendo un descenso en el quinto muestreo con 8% (3/37). Para el sexto muestreo, los animales ya no presentan anticuerpos (**Gráfica a5**). El 70% de los animales reaccionaron a la Sv *hardjo* en el primer muestreo, notando una disminución considerable al segundo (38%). Posteriormente, se observa un incremento de animales positivos en el cuarto muestreo hasta alcanzar el 70% nuevamente y desciende a un 27% en el quinto muestreo, para ser negativos todos los animales al día 120 (**Gráfica a6**).

El 81% de los animales en la Sv *wolffi* (29/37) fueron positivos en el primer muestreo descendiendo gradualmente hasta el quinto muestreo con 3% de positividad (**Gráfica a7**). La Sv *portland vere*, 65% (24/37) de los becerros fueron positivos en el primero y segundo muestreo, sin embargo, desciende a un 22% (8/36) en el tercer muestreo. Sólo un animal presenta anticuerpos en el quinto muestreo (**Gráfica a8**).

En cuanto a la Sv Palo alto, se reportó que el 51% de los becerros fueron positivos al día 0, descendiendo notablemente en el segundo muestreo (14%). Al día 30 se eleva el porcentaje de positividad al 25% para descender al quinto muestreo hasta el 3% (**Gráfica a9**). En cuanto a la Sv *icterohaemorrhagiae*, se observa una positividad máxima del 36% (13/36) de los becerros en el tercer muestreo, sin embargo, los anticuerpos persistieron hasta el sexto muestreo con 3% (1/37) de los animales (**Gráfica a10**).

Existió una positividad del 32% de los animales (12/37) en la Sv *pyrogenes*, en el primer muestreo descendiendo hasta el 3% (1/37) al quinto muestreo (**Gráfica a11**). Para la Sv *bratislava*, se mostró una reactividad muy baja, encontrando en el primer muestreo el 22% de animales positivos, reduciendo considerablemente hasta el 5% al segundo muestreo. Prácticamente al quinto muestreo todos los animales fueron negativos (**Gráfica a12**).

El becerro No. 1817 fue negativo en el primer muestreo a AM y ELISA, la muestra de este fue recolectada antes de ser calostrado. El becerro No. 417 fue muestreado inmediatamente después de haber recibido calostro (**Tabla 1 y 2**).

La reactividad de los sueros de las nodrizas a leptospira fue el siguiente: 96% (21/22) a *tarassovi* y *canicola*, 91% (20/22) a *grippotyphosa* y *hardjo*, 86% (19/22) a Palo Alto, 82% (18/22) a *H 89*, 73% (16/22) corresponden a *icterohaemorrhagiae* y *wolffi*, 68% (15/22) a *pomona*, 60% (13/22) a *portland vere*, 41% (9/22) a *bratislava* y 32% (7/22) a *pyrogenes*. (**Gráfica B**).

La mayoría de los becerros y nodrizas respondieron a más de una Sv en esta prueba. El número de Svs presentes en becerros fue el siguiente: el 2.7% de los becerros respondieron a 5 Svs, el 5.4% a 6 y 7 Svs, el 18.9% a 8, 9 y 11 Svs, el 21.6% a 10 Svs, y el 8.1% respondieron a todas las Svs (**Gráfica C**). En cuanto a las nodrizas las Svs fueron las siguientes: el 4.5% respondieron a una, 5, 6 y 9 Svs, el 9.1% respondieron a 7 y 12 Svs y el 27.3% respondieron a 8 Svs (**Gráfica D**).

9.-DISCUSION

Los problemas reproductivos en las explotaciones bovinas son ocasionados en gran parte a agentes infecciosos que causan significativas pérdidas económicas, además de que algunos de ellos, como la leptospirosis son consideradas como zoonosis importantes (Cantú, 2000). Por tal motivo, existen diversas medidas preventivas como una buena alimentación, adecuada higiene en las instalaciones, un apropiado calendario de vacunación y en general un buen manejo de los animales para su control. Paralelo a esto, es de suma importancia la administración adecuada de calostro en los becerros recién nacidos, ya que aparte de su valor altamente nutritivo, constituye su primera fuente de protección inmunológica (Blanco, 2002; Olguin, 2002).

En el presente trabajo se analizaron sueros de becerros calostrados para la identificación y cuantificación de anticuerpos maternos contra leptospirosis por medio de las pruebas ELISA y AM. En general, los resultados demostraron que la mayoría de los animales absorbieron anticuerpos maternos adecuadamente, de caso contrario serían gamaglobulinémicos (Cano, 2002; Olguin, 2002). Durante el primer muestreo (día 0) el becerro No. 1817 fue muestreado antes de recibir calostro, resultando negativo en las pruebas de ELISA y AM, por lo que se demostró que los anticuerpos maternos no atraviesan la barrera placentaria como previamente se ha mencionado (Gorman, 1992; Cano, 2002). El becerro No. 417 se muestreó inmediatamente después de administrarle calostro obteniendo títulos bajos en la AM (1:50) en sólo dos Svs (*canicola* y *hardjo*). En ELISA también fue negativo, lo cual refuerza la teoría que los anticuerpos maternos aparecen en la sangre después de algunos minutos (6 a 120 minutos) de haber ingerido calostro (Cano 2002; Palit. A. 1991).

Mediante la prueba de ELISA, la mayoría de los animales (72.22%) muestreados al día 0, mostraron positividad de anticuerpos maternos IgG. En los siguientes 5 muestreos se observó una disminución gradual de animales positivos (67.57%, 36.11%, 32.43%, 8.11% y 0% en los muestreos 15, 30, 60, 90 y 120 respectivamente), mostrando claramente una curva descendiente de inmunoglobulinas maternas en el suero de los becerros. Estos datos coinciden con lo ya previamente reportado en diversos trabajos, los cuales demuestran el catabolismo de los anticuerpos transferidos (Rebhum, 1999; Palit, 1991).

En cuanto a los resultados obtenidos en la técnica de AM, se encontró un mayor número de animales positivos, ya que a diferencia de la ELISA, es posible detectar anticuerpos principalmente del tipo IgM y en menor cantidad IgG (Radostits, 2002; Smith, 1994). Al mismo tiempo, este método determina la serovariedad implicada en la infección. La vacuna que se administra en la explotación contiene las Svs: *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *hardjo* y *pomona*, sin embargo, en los animales se encontraron anticuerpos contra las 12 Svs de leptospira que se emplean en el diagnóstico, siendo algunas más reactivas que otras. La inmunidad cruzada es un evento que se ha reportado anteriormente en el diagnóstico de la leptospirosis (Smith, 1994), en donde algunos trabajos mencionan que un gran porcentaje de animales la presentan (Cho HJ y col. 1989; Cousins, 1985), a diferencia de otros que la refieren como un evento poco frecuente (Surujballi, 1997). Por esta razón, no se debe descartar la posibilidad de reacción cruzada entre Svs en el estudio, para lo cual se requieren futuras investigaciones.

El becerro No.1829 presentó al día 0 títulos de 1:6400 a las Svs *grippotyphosa*, *canicola*, *tarassovi* y *portland vere* y de 1:3200 a *grippotyphosa* y *tarassovi* en el segundo muestreo, observándose una lenta absorción de anticuerpos maternos, ya que para el día 90 el título de anticuerpos todavía era alto (1:400) a *tarassovi*, disminuyendo a 1:50 en las Svs *grippotyphosa* y *canicola* a los 120 días. El becerro No. 414 presentó títulos de 1:3200 a *pomona* en el primer muestreo y de 1:1600 a las Svs *grippotyphosa*, *tarassovi* y *H 89*. La Sv *tarassovi* llegó al sexto muestreo con un título de 1:100. Los altos títulos encontrados en los becerros (números reportados previamente) demuestran que existe una gran cantidad de anticuerpos maternos presentes en el calostro de la vaca algunos días antes y después del parto, concentrando principalmente grandes cantidades de IgG1 (1.5 a 2 kg de IgG pueden ser secretadas los primeros 5 días de ordeño después del parto) (Gorman, 1992; Stanley, 1985), las cuales son absorbidas intactas por el intestino del becerro durante las primeras 24 horas de nacido, no existiendo una selectividad en la absorción a cualquiera de las inmunoglobulinas presentes en el calostro (Gorman, 1992). Aunque no se han realizado estudios que midan títulos de anticuerpos específicos contra leptospirosis en becerros calostrados, es importante mencionar que todos los animales utilizados durante este estudio se observaron clínicamente sanos durante y después de los muestreos, por lo cual se deduce que los anticuerpos detectados en estos becerros fueron calostrales.

En comparación con los estudios de Luna (2003), las Svs detectadas serológicamente en este trabajo son semejantes a las encontradas en la zona templada (la cual abarca el estado de Hidalgo), ya que señala como las más predominantes a *tarassovi*, *hardjo*, *wolffi* y H89. En este estudio predominaron también las *Sv canicola* y *grippotyphosa* además de las previamente mencionadas. La mayoría de las serovariedades mostraron una curva descendente de anticuerpos, excepto las Svs *hardjo*, la cual aumenta en el tercer y cuarto muestreo (44% al 70%) e *icterohaemorrhagiae*, que también aumenta en el tercer muestreo (de 22% a un 36%). Como se mencionó al principio del trabajo, la lectura en AM es muy subjetiva y requiere de personal altamente capacitado, por lo tanto este resultado pudo haber sido una mala interpretación de resultados, a pesar de la existencia de anticuerpos y su descenso evidente.

Las vacas nodrizas se vacunaron entre 1 y 2 meses antes tomarse las muestras de sangre de las cuales 11 presentaron títulos de 1:800 y 2 presentaron títulos de 1:1600 (una a la *Sv grippotyphosa* y otra a *tarassovi*), mientras las demás tuvieron títulos de 1:50 a 1:400. En general los títulos de anticuerpos observados en las nodrizas son bajos (1:1600 el más alto) en comparación con los títulos observados en los becerros (1:6400 el más alto). En la prueba de ELISA el 41% de las vacas nodrizas fue positivo. Cabe mencionar que el bovino concentra selectivamente grandes cantidades de inmunoglobulina IgG a partir del suero hacia el calostro durante el período seco, además de que al momento del parto se observa un profundo descenso de este anticuerpo en el suero de la vaca (Gorman 1992). Asimismo, no se debe olvidar la notable inmunosupresión durante la gestación debido al desequilibrio hormonal y metabólico por el que atraviesan los animales (Mallard BA, 1998).

La duración exacta de la inmunidad pasiva es muy variable, ya que depende sobre todo de la concentración de anticuerpos en la vaca y los absorbidos por el neonato (Gorman, 1992). Se observó en ambas pruebas, que la duración pasiva en los becerros fue aproximadamente de 120 días de edad. Este dato es similar al citado por Palit A. (1991) y Rebhum (1999), ellos mencionan que los anticuerpos maternos persisten entre los 120 y 128 días de nacidos en los becerros, siendo un dato importante, ya que en la mayoría de las explotaciones en México los animales se comienzan a vacunar a partir de los 5 o 6 meses de edad, (dependiendo de la prevalencia de la enfermedad) lo cual provoca que exista un periodo donde los animales se encuentran desprotegidos de anticuerpos maternos y vacunales (Rebhum, 1999; Moles, 2003).

Como bien se sabe, la edad óptima para la vacunación en un animal joven es cuando los anticuerpos maternos han sido catabolizados por el organismo del animal y cuando su sistema inmune es suficientemente maduro para responder a los antígenos con niveles adecuados de anticuerpos y de células efectoras. La competencia inmunológica de los becerros recién nacidos se calcula que aparece a partir de los 30 días de vida, mientras que la respuesta total aparece más tarde ya que los órganos linfoides aumentan de tamaño hasta cerca de la pubertad. (Gorman 1991)

En el presente estudio se observó que los anticuerpos maternos desaparecen casi por completo a los cuatro meses de edad. Se han realizado estudios en donde la respuesta serológica a la vacunación contra la Sv *hardjo* en becerros de 3 meses de edad está por debajo que en aquellos que se vacunan a los 6 meses de edad debido a la interferencia de anticuerpos maternos (Smith, 1994). Otro estudio señala que la vacunación contra la Sv *pomona* y *hardjo* es más efectiva a los 6 meses de edad (Schollum, 1985). Radostits (2002) plantea que la vacunación en becerros debe comenzar entre los 4 y 6 meses de edad y no a los 3 meses, sin embargo, un estudio realizado por Palit (1991), demuestra que la vacunación en becerros de un mes de edad contra la Sv *hardjo* tipo *hardjobovis* es efectiva, aún con la presencia de anticuerpos maternos circulantes. Por tal razón, además de establecer normas de bioseguridad y un adecuado manejo zootécnico para evitar que los animales se infecten a partir de que se inicia la decadencia de los anticuerpos maternos, se sugiere un calendario de vacunación a una edad más temprana de la que normalmente se realiza en la mayoría de las explotaciones en México.

10.-CONCLUSIONES

La vacunación de animales jóvenes en contra de la leptospirosis es de suma importancia dentro de las explotaciones ganaderas por lo que en este trabajo se concluye que la vacunación pudiera iniciarse entre los 4 y 5 meses edad, tiempo en que los anticuerpos maternos han sido catabolizados por completo y en el que los órganos linfoides están desarrollados. Paralelo a esto, es de crucial importancia realizar técnicas de bioseguridad como limpieza, control de fauna silvestre y nociva, así como de manejo zootécnico para prevenir la presencia y diseminación de esta enfermedad, sobre todo en etapas susceptibles en donde los becerros se encuentran desprotegidos de la inmunidad pasiva provista por la madre.

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1. ELISA (Prueba inmunoenzimática).

1. Se sensibilizaron las placas de poliestireno de 96 pozos (*Labsystem*), con 100 μ l de antígeno a una concentración de 350 μ g/pozo adicionado a buffer de carbonatos pH 9.6.
2. Se incubaron por 14 hrs a una temperatura de 4°C y se desechó la solución.
3. Se realizaron 3 lavados a cada placa con una solución de lavado para eliminar el antígeno que no se absorbió en las placas.
4. Se añadieron 100 μ l de la solución de bloqueo a cada pozo y se incubaron durante una hora a 37°C en la estufa bacteriológica (*Hybaid*).
5. Se realizaron 3 lavados.
6. Se colocaron en cada pozo 100 μ l de suero problema diluido 1:200 (en solución bloqueadora) y se incubaron una hora a 37°C.
7. Se realizaron 3 lavados.
8. Se añadieron a todos los pozos la cantidad de 100 μ l de proteína G bovina conjugada con peroxidasa (*ICN Pharmaceuticals, Inc*) a una dilución de 1:5000 en solución bloqueadora y se incubaron las placas una hora a 37°C.
9. Se realizaron 3 lavados.
10. Se añadieron a cada pozo 100 μ l de solución de revelado.
11. Se detuvo la reacción enzimática a los 10 minutos adicionando 100 μ l de solución de paro.
12. La lectura se realizó en el lector de ELISA (*Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer, BIO-RAD*) y se obtuvieron las densidades ópticas con un filtro de 490 nm.

11.2 Anexo 2. Aglutinación microscópica (AM).

1. Se colocaron 9 ml de medio de cultivo de Cox a 12 tubos de ensaye de 20 ml y se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos en autoclave (*AESA*).
2. Se agregó asépticamente 10% de suero estéril de conejo a cada tubo con el medio y se incubaron durante 24 horas a 36°C comprobándose su esterilidad a través del microscopio de campo oscuro (*Reichert*).
3. A cada tubo se añadió 10% de cada antígeno y se incubaron durante una semana a 36°C.
4. Se colocaron en cada pozo de las primeras 7 columnas de la placa de poliestireno (*Max Sorp*) 50 µl de los sueros problemas diluidos 1:25 (diluido en PBS). En la octava columna se añadieron 50 µl de PBS para los antígenos controles.
5. A los pozos del suero problema y de PBS se le agregaron 50 µl de cada uno de los antígenos correspondientes obteniendo un título final de 1:50 por pozo.
6. Las placas se incubaron una hora a temperatura ambiente.
7. Se observó el grado de aglutinación de cada dilución en relación con el antígeno control.
8. Aquellos sueros que tuvieron desaparición celular o aglutinación del 50% se sometieron a diluciones dobles empezando de 1:100 hasta 1:6400, añadiendo 50 µl a cada pozo del suero problema y 50 µl del antígeno al cual reaccionó.
9. Las placas se incubaron una hora a temperatura ambiente.
10. Se observó el grado de aglutinación de cada dilución.

12. TABLAS

12.1. TABLA 1. Edad de los becerros al primer muestreo.

Número de becerro	Madre	No. partos de la madre	Nodriza	Fecha/parto	Edad de los becerros (días) al primer muestreo
417	186	1	314	05-nov-04	0
1817	33	1	93	05-nov-04	0
419	235	1	336	11-nov-04	1
428	17	2	274	02-dic-04	1
1820	336	3	336	11-Nov.04	1
416	153	1	93	03-nov-04	2
1835	184	3	141	08-dic-04	2
1836	119	2	119	08-dic-04	2
1837	207	3	141	08-dic-04	2
1838	233	2	233	08-dic-04	2
415	115	1	314	02-nov-04	3
418	244	1	93	09-nov-04	3
424	114	5	114	23-nov-04	3
1816	93	3	93	02-nov-04	3
1828	338	1	342	30-Nov-04	3
1829	328	1	25	30-nov-04	3
1834	141	3	141	07-dic-04	3
414	237	1	237	01-nov-04	4
420	52	5	52	15-nov-04	4
423	34	2	34	22-nov-04	4
427	274	1	25	29-nov-04	4
1818	232	1	146	08-nov-04	4
1819	175	1	146	08-nov-04	4
1822	172	2	172	15-nov-04	4
1823	219	1	172	15-nov-04	4
1826	83	2	83	22-nov-04	4
1832	202	1	202	06-dic-04	4
1833	124	1	124	06-dic-04	4
413	314	2	314	31-oct-04	5
1831	229	3	229	05-dic-04	5
422	179	2	179	20-nov-04	6
429	256	1	334	04-dic-04	6
1815	146	1	146	30-oct-04	6
1824	315	3	315	20-nov-04	6
1827	25	5	25	27-Nov-04	6
1830	334	3	334	04-dic-04	6
426	342	2	342	25-nov-04	8

12.2. TABLA 2. Resultados generales de los 37 becerros a las pruebas ELISA y AM

ID ^a	Día 0		Día 15		Día 30		Día 60		Día 90		Día 120	
	AM ^b	ELISA ^c	AM	ELISA	AM	ELISA	AM	ELISA	AM	ELISA	AM	ELISA
413	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
414	+	**	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
415	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
416	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
417	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
418	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
419	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
420	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
422	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
423	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
424	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
426	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
427	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
428	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
429	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1815	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
1816	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
1817	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
1818	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
1819	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1820	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1822	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
1823	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1824	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	**	**
1826	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1827	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
1828	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1829	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
1830	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
1831	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
1832	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
1833	+	-	+	+	**	**	-	+	-	-	-	-
1834	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1835	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1836	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
1837	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1838	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	35	26	35	25	32	13	19	12	3	3	0	0

^a Identificación de los becerros

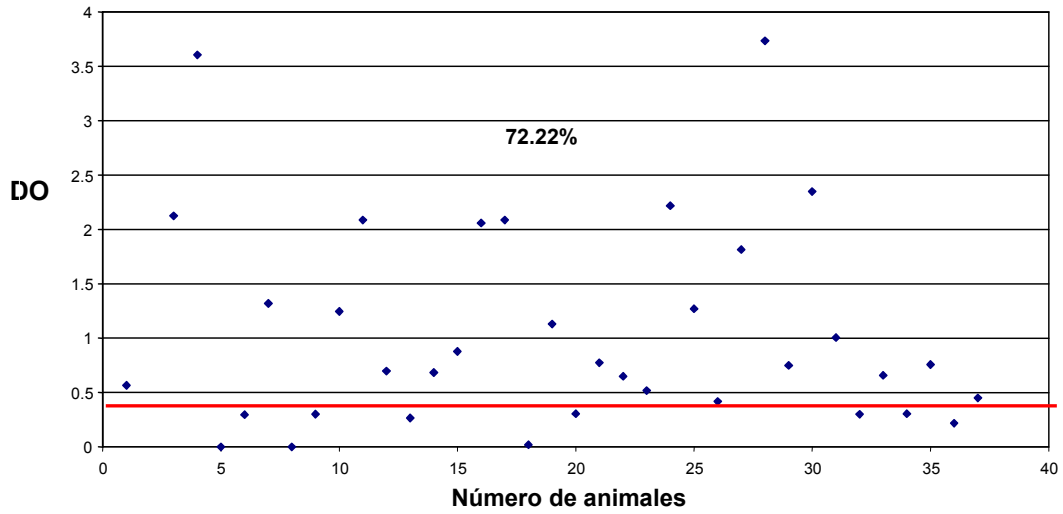
^b Prueba de Aglutinación Microscópica (AM). Se dieron como positivos a los animales con títulos iguales o mayores de 1:50

^c Prueba de ELISA. Se dieron como positivos a los animales con DO₄₉₀ mayores a 0.350

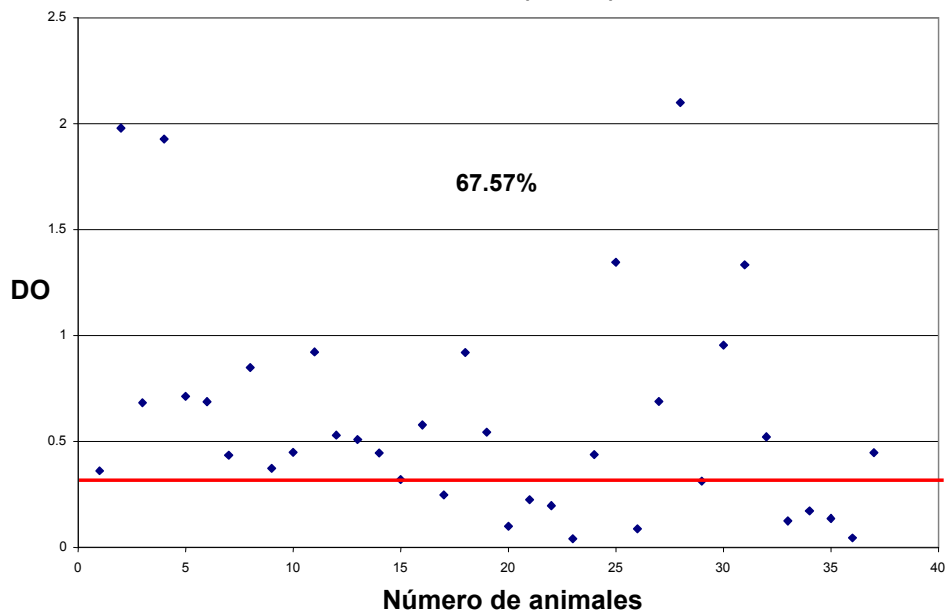
** Muestras no trabajadas

13. GRÁFICAS

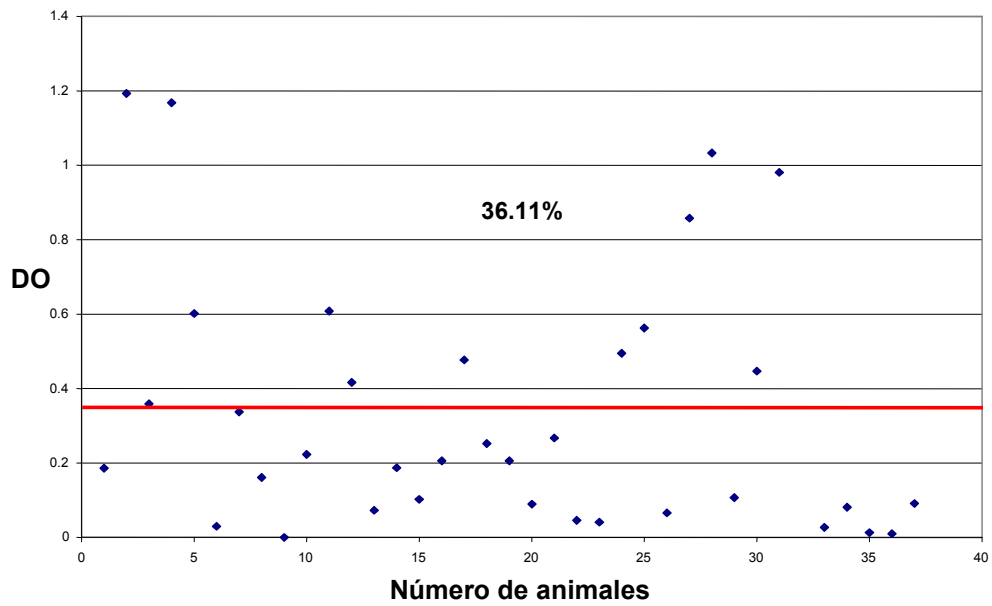
**Gráfica 1. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en becerros calostrados
Muestreo 1 (Día 0)**



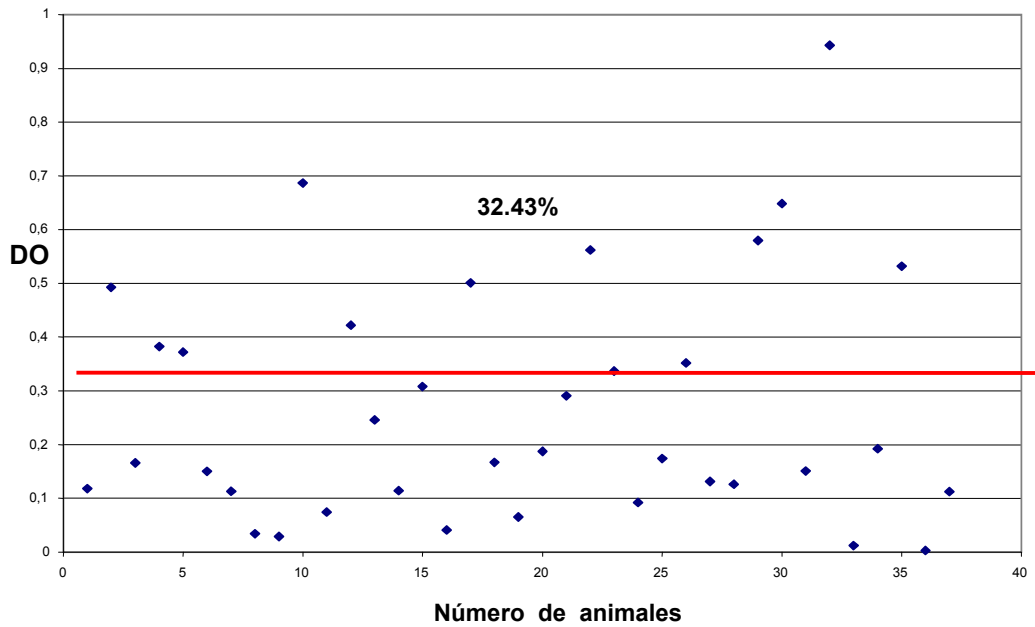
**Gráfica 2. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en becerros calostrados
Muestreo 2 (Día 15).**



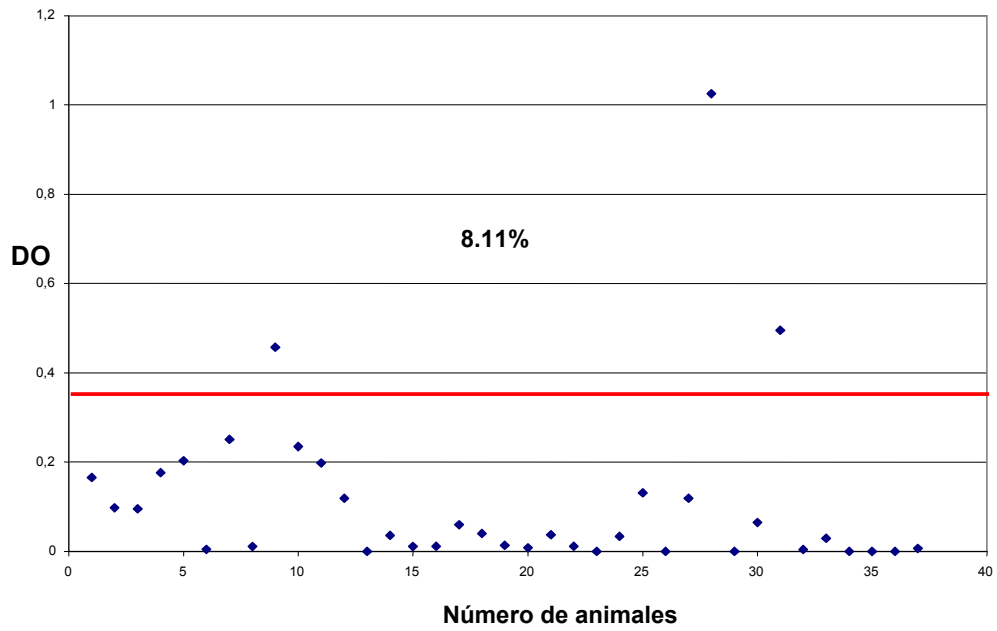
**Gráfica 3. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en becerros calostrados
Muestreo 3 (Día 30)**



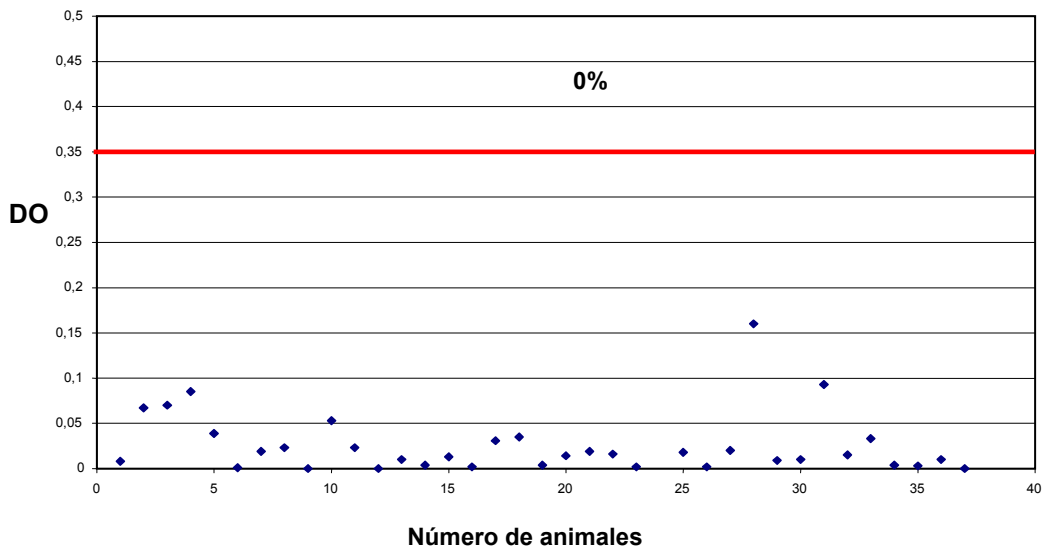
**Gráfica 4. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en becerros calostrados
Muestreo 4 (Día 60)**



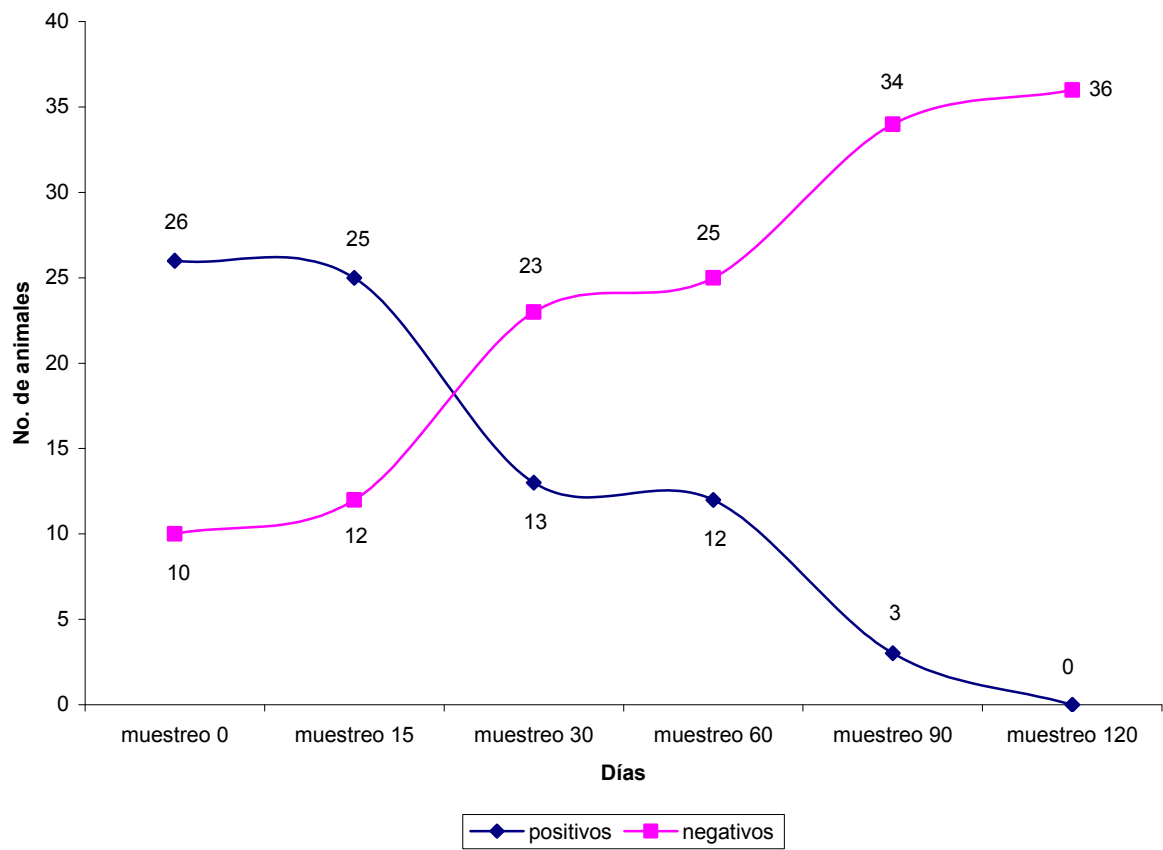
**Gráfica 5. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en becerros calostrados
Muestreo 5 (Día 90)**



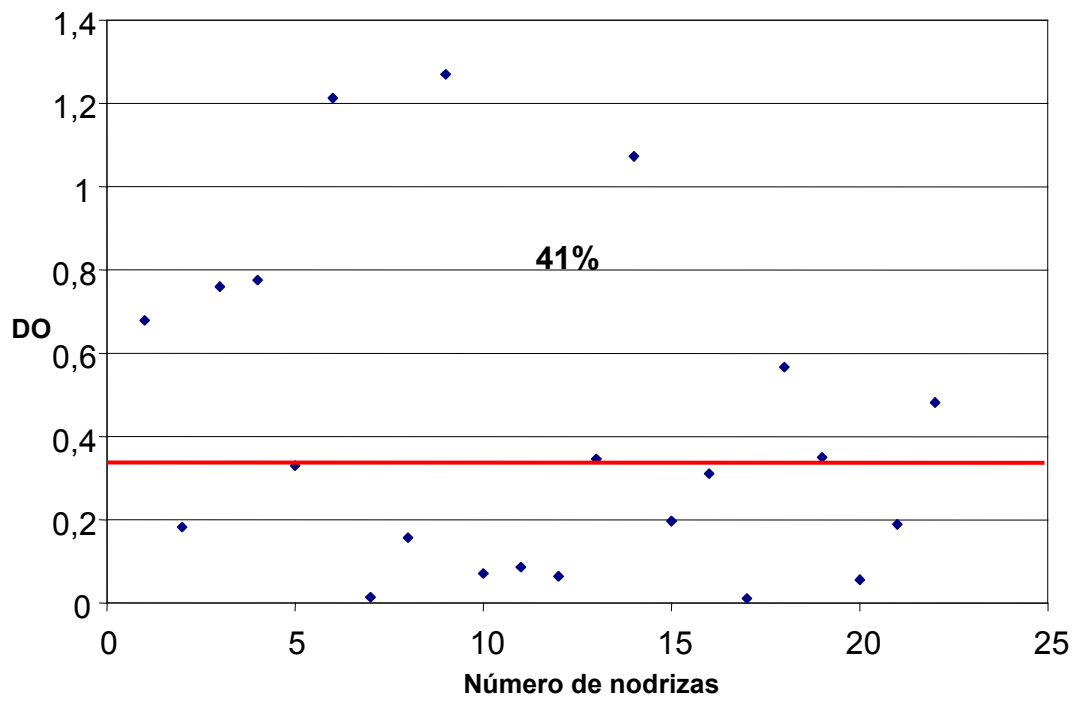
**Gráfica 6. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en becerros calostrados
Muestreo 6 (Día 120)**



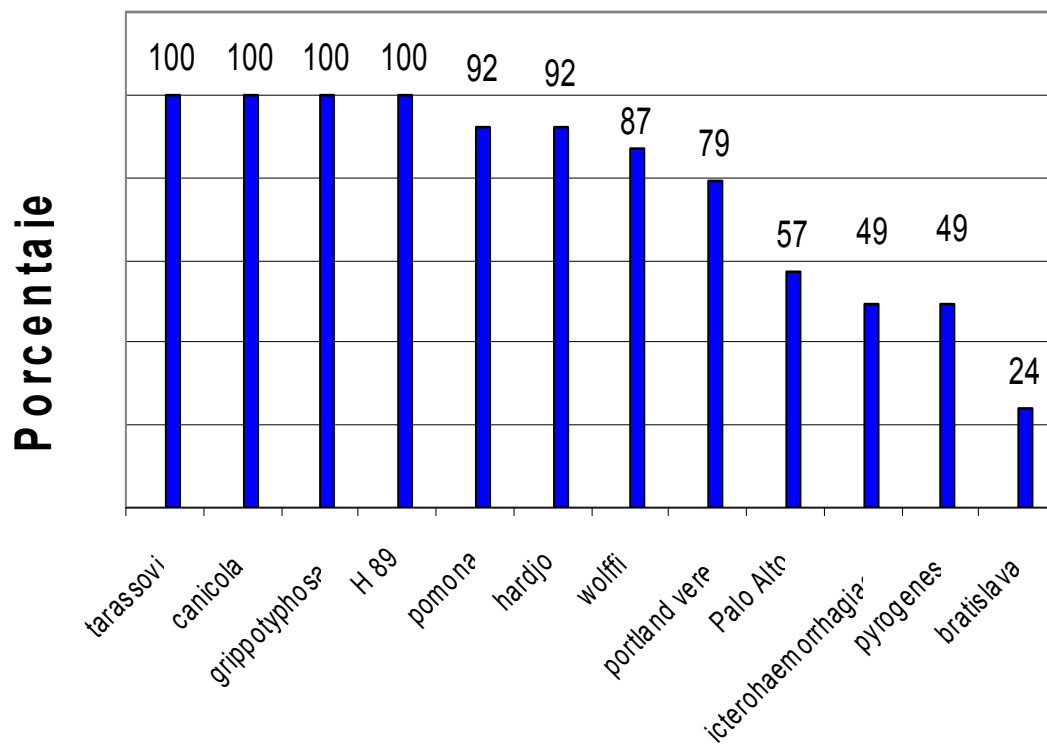
Gráfica 7. Número de becerros positivos y negativos a la prueba de ELISA en los diferentes muestreos



Gráfica 8. Resultados de la prueba de ELISA indirecto en nodrizas

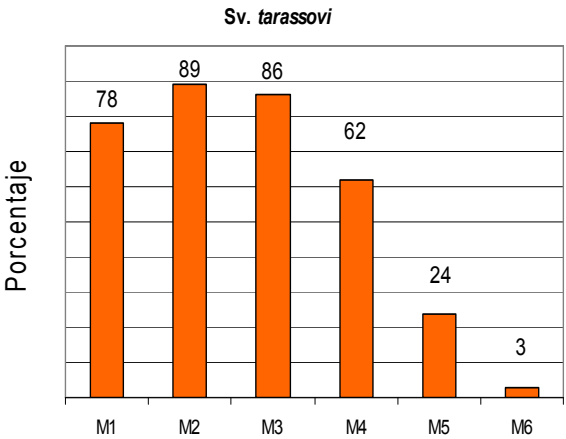


Gráfica A. Porcentaje general de becerros positivos a las diferentes serovariedades de *L. interrogans* mediante la prueba de AM.

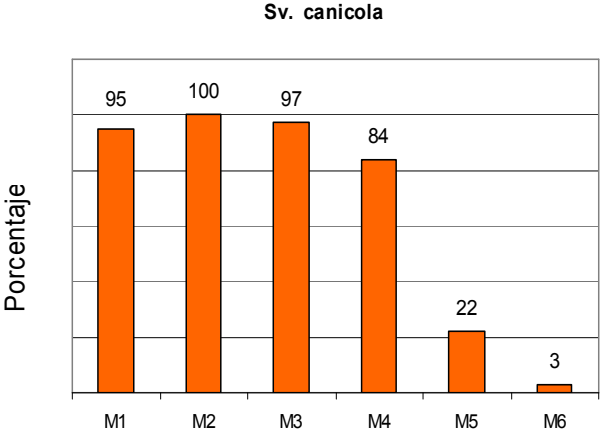


Porcentaje de becerros positivos a las serovariedades altamente reactivas durante los 6 muestreos mediante la prueba de AM.

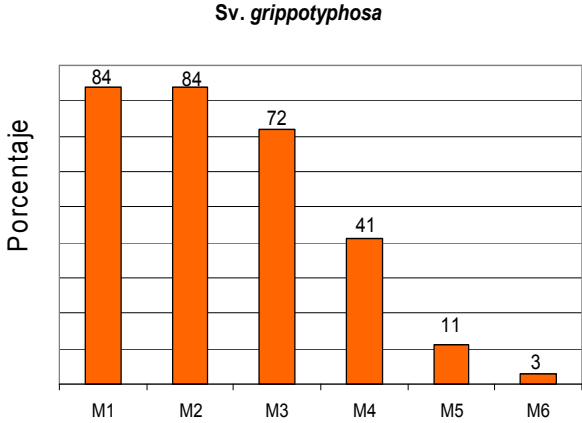
Gráfica a1



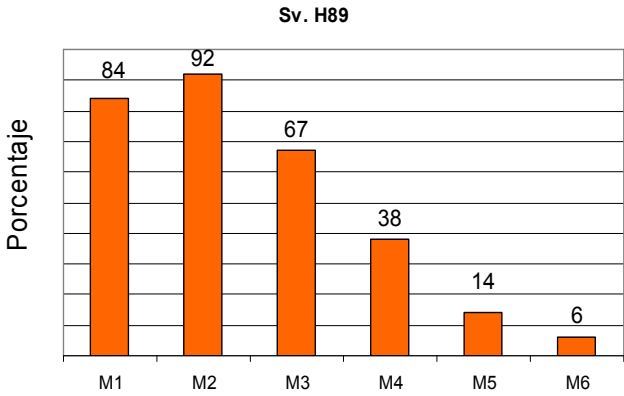
Gráfica a2



Gráfica a3



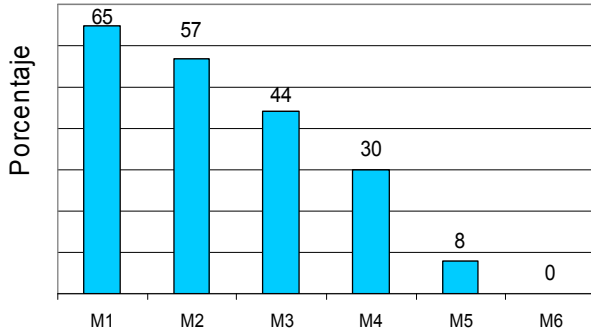
Gráfica a4



Porcentaje de becerros positivos a la serovariedades moderadamente reactivas durante los 6 muestreos mediante la prueba de AM.

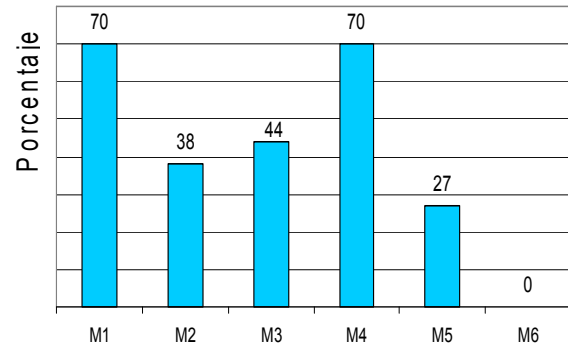
Gráfica a5

Sv. pomona



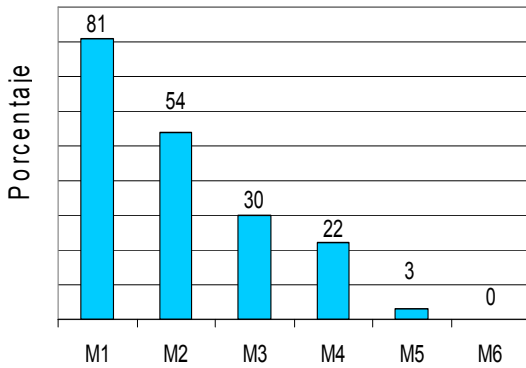
Gráfica a6

Sv. hardjo



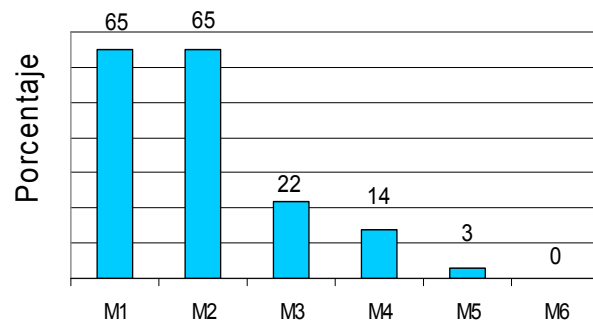
Gráfica a7

Sv. wolffi



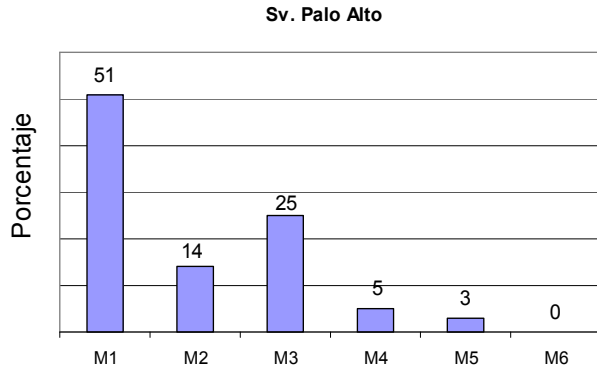
Gráfica a8

Sv. portland vere

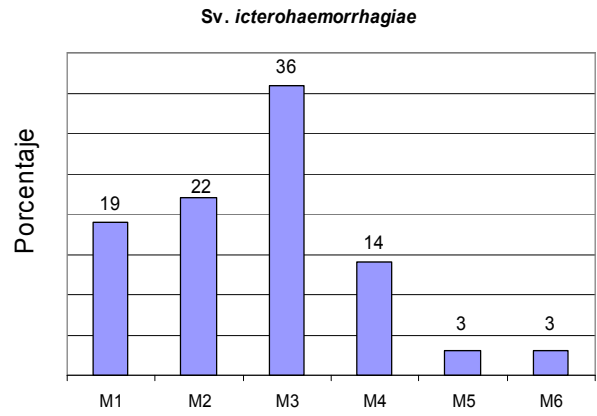


Porcentaje de becerros positivos a las serovariedades menos reactivas durante los 6 muestreos mediante la prueba de AM.

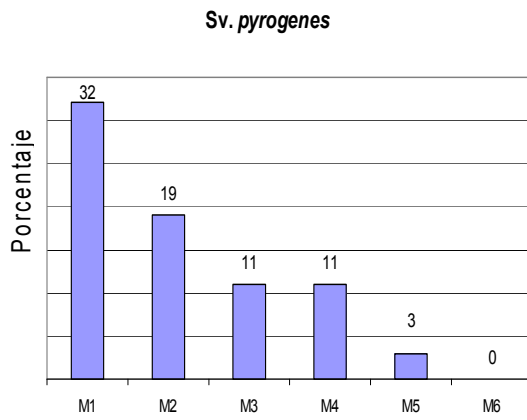
Gráfica a9



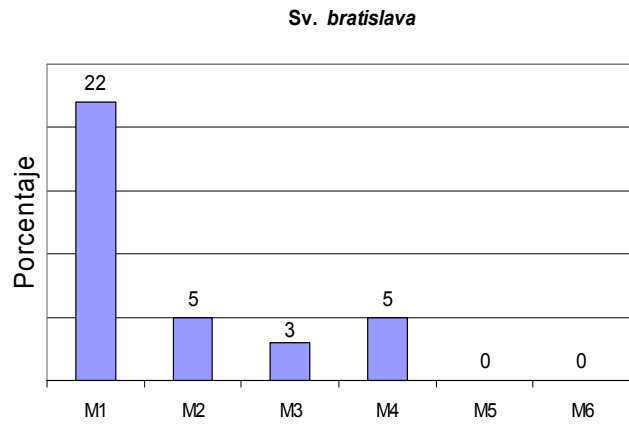
Gráfica a10



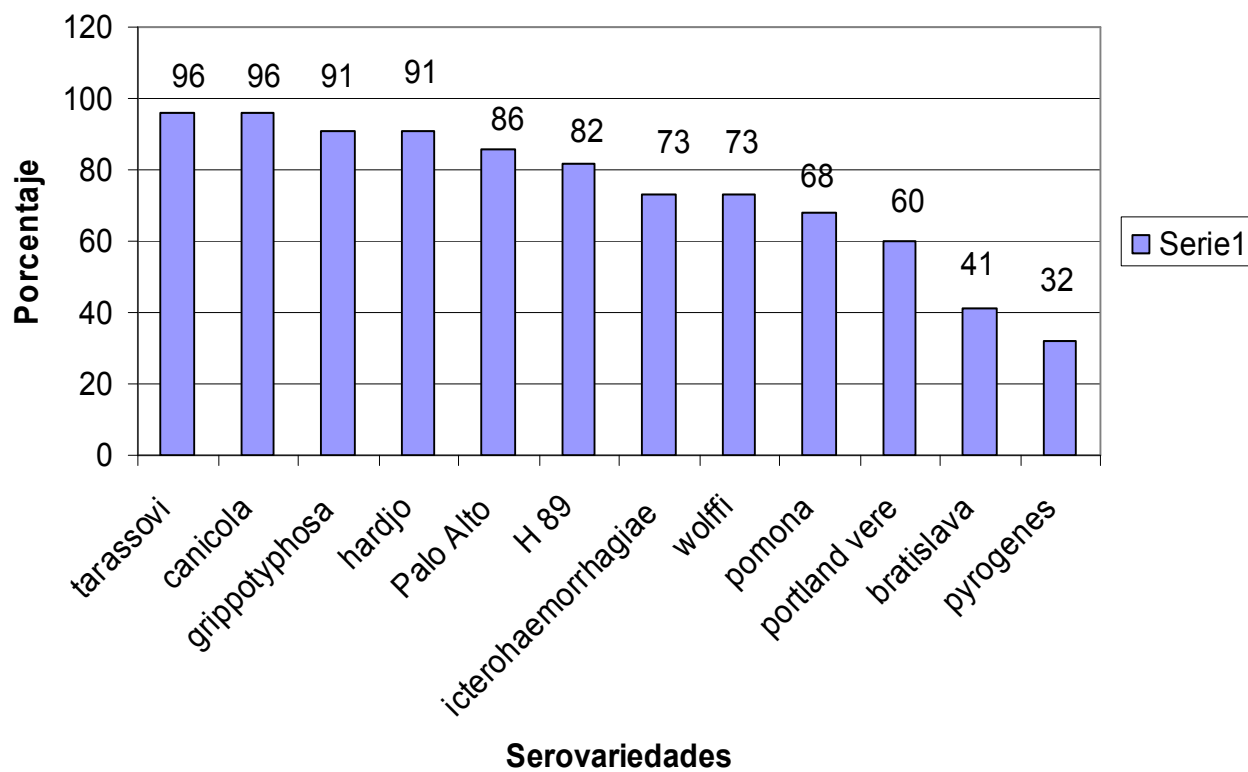
Gráfica a11



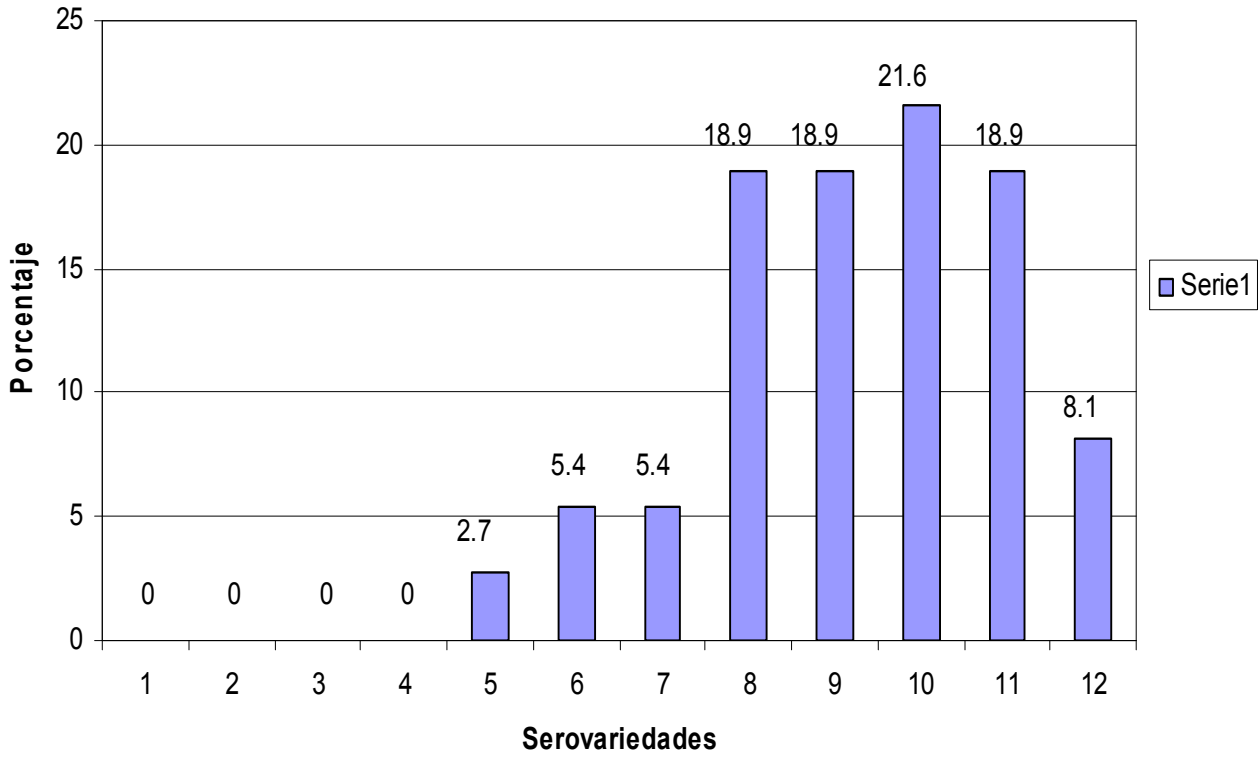
Gráfica a12



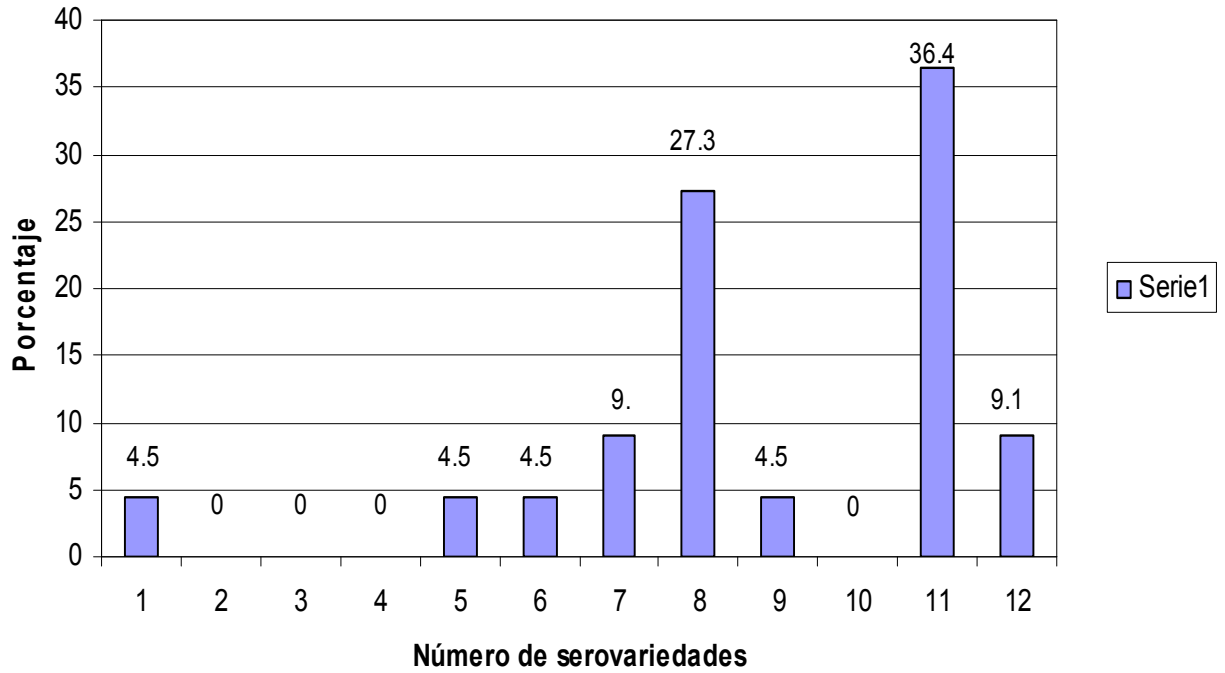
Gráfica B. Porcentaje de vacas nodrizas positivas a las diferentes Svs de *L. interrogans* en AM.



Gráfica C. Número de Svs. que reaccionaron en becerros en la prueba de AM.



Gráfica D. Número de Svs. que reaccionaron en vacas nodrizas en la prueba de AM.



14. APENDICE DE REACTIVOS UTILIZADOS

Buffer de carbonatos pH 9.6

Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	1.3 g
Bicarbonato de sodio (Na_2HCO_3)	3.8 g
Agua destilada	1000 ml

Buffer de citratos pH 4.5

Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	7.64 g
Acido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	4.6 g
Agua destilada	1000 ml

PBS (Buffer de fosfatos) 1X pH 7.2

Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Fosfato de sodio (Na_2HPO_4)	1.10 g
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	0.32 g
Agua destilada	1000 ml

Solución bloqueadora

3% de leche descremada en PBS 1X y 0.05% de Tween 20

Buffer de lavado pH 7.2

PBS 1X con 0.05% Tween 20

Solución de revelado

10 ml de buffer de citratos pH 4.5 adicionando 6 mg de orto-fenilendiamina (OPD) y 6 ml de agua oxigenada (H_2O_2) por placa.

Solución de paro

Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2M	52.6 ml
Agua destilada	500 ml

Medio líquido de Cox

Caldo biotriptosa	2.0 g
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	40 ml
Rojo fenol al 0.4%	1.0 ml
Agua destilada	1008 ml

Ajustar el pH de 7.2-7.4 y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 lbs (121 °C) de presión.

15. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Amstutz, Harol E. Y Anderson, David P., 2000. El Manual de Merck de Veterinaria. Editorial Océano, Barcelona España. 529-531.
2. Banda, Ruiz Víctor Manuel y Loza, Rubio Elizabeth. 1996. Folleto informativo sobre leptospirosis bovina. SARH-INIFAP. México, D.F. 1-10.
3. Banda, Ruiz Víctor Manuel. 1994. Estandarización de la técnica de anticuerpos fluorescentes para determinar la presencia de *Leptospira interrogans* en bovinos productores de leche. (Tesis de Maestría). México, D.F., UNAM. Pág 1.
4. Bercovich Z, Taaijke R, Bokhout BA. 1990. Evaluation of an ELISA for the diagnosis of experimentally induced and naturally occurring *Leptospira hardjo* infections in cattle. *Veterinary Microbiology*. 21:255-262.
5. Blanco, Ochoa M.A. Uso del calostro en becerras recién nacidas. Memorias Vol. 2; 2002 Noviembre (Ciudad Universitaria). Colegio de Médicos Veterinarios Zootecnistas del Distrito Federal, A.C.
6. C.J.C: Phillips. Principios de reproducción bovina. 2003. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza España. 13
7. Caballero, AS, García RG. 1997. Manual de procedimientos de laboratorio del INDRE Leptospira. INDRE SSA. 8:11-12.
8. Cano, Celada Pedro J. Inmunidad pasiva en bovinos. Memorial Vol. 2; 2002 Noviembre (Ciudad Universitaria). Colegio de Médicos Veterinarios Zootecnistas del Distrito Federal, A.C.
9. Cantú, Covarruvias Antonio. 2000. Enfermedades reproductivas en el ganado bovino. Campo experimental Aldama-INIFAP. Tamaulipas. www.ranchonet.com.mx
10. Carrillo, Casas E. Margarita. 2005. Evaluación de la regulación de la transcripción de la región intergenética orfJ14-orfJ15 del locus rfb de *leptospira interrogans* serovariedad *Hardjo* subtipo *Hardjoprajitno*. (Tesis de maestría). México D.F. UNAM. 5-6.
11. Céspedes, Zambrano Manuel y Glenny Aranjó, Martha. 2002. Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Instituto Nacional de la Salud. Lima Perú. 33.
12. Cousins DV, Robertson GM, Hustas L. 1985. The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovars *hardjo*, *pomona* and *tarassovi* in cattle. *Veterinary Microbiology*. 10:439-450.

13. Cho HJ, Gale SP, Masri SA, Malkin KL. 1989. Diagnostic specificity, sensitivity and cross-reactivity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against *Leptospira interrogans* serovars *pomona*, *sejroe* and *hardjo* in cattle. *Can J Vet Res.* 53:285-289.
14. D.C. Church. 1993. El rumiante. Fisiología digestiva y nutrición. Editorial Acribia. S.A., Zaragoza España. 468-469.
15. De la Peña-Moctezuma Alejandro. Morfología y estructura antigénica de la leptospira. Memorias de Simposio de leptospirosis. 2003 marzo. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos.
16. Ellis, William. 2001. Leptospirosis. Vacunas y vacunación en bovinos. Folleto técnico Núm. 3, CENID-Microbiología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM- Xochimilco. 1-3.
17. Esparza, Villanueva J. Carlos. 1998. Comparación de la seropositividad contra leptospirosis en humanos, bovinos y roedores de la cuenca Xochimilco. (Tesis de Licenciatura). México D.F. UNAM. p. 3.
18. Ferrer, campos Silvia. 1995. Correlación de los resultados obtenidos en perros de la prueba de microaglutinación. (Tesis de licenciatura). Cuautitlán Izcalli. Edo. Méx. UNAM. p. 5.
19. Goddard RD, Luff PR, Thornton DH. 1991. The serological response of calves to *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* vaccines and infection as measured by the microscopic agglutination test anti-IgM and anti-IgG enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Microbiology.* 26:191-120.
20. Gorman, T. Neil y Halliwell, Richard E. W. 1992. Inmunología Clínica Veterinaria. Editorial Acribia, Zaragoza España. 29, 207-213.
21. Hernández, G. Armando. Manual de Inmunología. 1999. Laboratorio Pfizer, S.A. División de Salud Animal, México, D.F. p. 21.
22. Illera, Martín Mariano. 1994. Reproducción de los animales domésticos. Editorial Aedos. Primera edición. Barcelona España. p. 332.
23. Ingraham, Jhon L. 1998. Introducción a la Microbiología. Editorial Reverte, Barcelona España. p. 592.
24. Luna, Alvarez MA. 2005. Estudio retrospectivo de seroprevalencia de *leptospirosis* bovina en México considerando las regiones ecológicas. *Rev. Cubana Med. Trop.* 57(1):28-31.

25. Mallard BA, Dekkers JC, Ireland M, Leslie K, Sharif S, Vankampen C, Walter I, Wikie B. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy. Sci.* Feb 81(2):585-95.
26. Moles, y Cervantes Luis Pedro. Situación de la leptospirosis en el estado de Tabasco. 2003 marzo. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en bovinos, A.C.
27. Moles, y Cervantes Luis Pedro. Consideraciones sobre el diagnóstico de la leptospirosis bovina. 2003 marzo. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en bovinos, A.C.
28. Moles, y Cervantes Luis Pedro. Aspectos Epidemiológicos de la leptospirosis bovina en México. 2003 marzo. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en bovinos, A.C.
29. Morilla, González Antonio. 1989. *Inmunología Veterinaria*. Editorial Diana; Primera edición. México, D.F. 161,163.
30. Olguin, y Bernal Arturo. Síndrome diarreico neonatal. *Memorias Vol. 2; 2002 Noviembre (Ciudad Universitaria)*. Colegio de Médicos Veterinarios Zootecnistas del Distrito Federal, A.C.
31. Palit A, Middleton H, Sheers J, Parkville, Victoria. 1991. The influence of maternal antibody and age of calves on effective vaccination against *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Australian Veterinary Journal*. 68(9):299-303.
32. Radostits OM, Gay C.C, Blood D.C. 2002. *Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Vol. I*. Editorial McGraw-Hill, Interamericana, España. Novena edición. 1158,1161.
33. Rebhum, C. William. 1999. *Enfermedades del ganado vacuno lechero*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. 611-613.
34. Rubín, Emanuel. *Patología*. 1999. Editorial Medica Panamericana, S.A. México, D.F. p. 715.
35. Scanlan, Charles. 1991. *Introducción a la bacteriología veterinaria*. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza España. 185-187.
36. Schollum Linda M., Marshall Roger B. 1985. Age and the ability of calves to respond to a leptospiral vaccine. *N.Z. vet. J.* 33:146-147.
37. Smith CR, Ketterer PJ, McGowan MR, Corney BG. 1994. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in cattle. *Aust Vet J.* 71:290-294.

38. Staley TE, Bush, LJ. 1985. Receptor mechanisms of the neonatal intestine and their relationship to immunoglobulin absorption and disease. *J. Dairy Sci.* 68:184:-205.
39. Stanier, Y. Roger; Ingraham, Jhon L. 1996. *Microbiología*. Editorial Reverte. Barcelona España, Segunda edición. 497,502.
40. Surujballi OP, Matenger RM, Eaglesome MD. 1997. Development and initial evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* antibodies in bovine sera. *Can J Vet Res.* 61(4):260-266.
41. Tirado, Miguel Antonio. *Leptospirosis bovina*. 2002. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valencia, Venezuela. (www.pzca.com)
42. Tizard, Ian R. 2002. *Inmunología Veterinaria*. Editorial McGraw-Hill. Sexta edición. 230234.
43. Torres, Agaton Fernando. 1995. Frecuencia de leptospirosis en bovinos productores de leche con problemas reproductivos en una explotación de Ixtapaluca. Edo. Méx. (Tesis de Licenciatura). México D.F. UNAM. 3-6.
44. Torres, Barranca. *Estrategias para el control de la leptospirosis bovina*. 2003 marzo. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en bovinos, A.C.