

01670
2ej.
1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y PESQUERÍA
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ZOOTECNICAS

INMUNIDAD HUMORAL EN LA ANAPLASMOSIS Y BABESIOSIS BOVINAS EN BECERROS MANTENIDOS EN UNA ZONA ENDEMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

P R E S E N T A :

JESUS ANTONIO ALVAREZ MARTINEZ



Aprobado por: MVZ. Carlos A. Vega y Murguía Ph.D.
MVZ. Germinal J. Canto Alarcón MS.

MEXICO, D. F.

1989

TESIS CON
FALLA DE ORDEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

DATOS BIOGRAFICOS.

El autor nació en México, D.F., el 12 de junio de 1937. Cursó la licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, obtuvo el grado el 12 de junio de 1981.

En 1979 ingresó al Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarías (INIP) y hasta 1982 trabajó como epizootólogo de campo en el Centro Experimental Pecuario "La Posta" en Paso del Toro, Veracruz. En 1983 ingresó al Departamento de Hemoprotozoarios en la Unidad Central del INIP, en Palo Alto, D.F.

En 1983 inició los cursos de la Maestría en Ciencias Veterinarias con orientación en Medicina Preventiva, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Ha publicado artículos en revistas nacionales y pertenece a la Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria y a la Asociación Mexicana de Microbiología. A partir de 1987 se hizo cargo de la División de Hemoprotozoarios en el Centro Nacional en Investigaciones Disciplinarias en Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de la SARH.

LISTA DE CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION.....	1
A. Presentación del problema.....	1
B. Revisión de la literatura.....	3
B.1 Sistema inmune del bovino:	
B.1.1 Tejidos componentes del sistema inmune.....	4
B.2 Organos linfoides primarios:	
B.2.1 Médula ósea.....	4
B.2.2 Timo.....	5
B.2.3 Bolsa de Fabricio.....	7
B.3 Organos linfoides secundarios:	
B.3.1 Ganglios linfáticos.....	8
B.3.2 Bazo.....	10
B.3.3 Sistema inmune de las mucosas.....	11
B.4 Respuesta inmune específica:	
B.4.1 Inmunidad celular.....	12
B.4.2 Inmunidad humoral:	
B.4.2.1 Anticuerpos o inmunoglobulinas....	17
B.4.2.2 Complemento.....	21
B.5 Cambios en el Sistema Inmune de la Madre:	
B.5.1 Placentación.....	22
B.5.2 Glándula mamaria de la vaca durante la preñez.....	25
B.6 Desarrollo del sistema inmune en el becerro nonato:	
B.6.1 Duración de la gestación.....	27
B.6.2 Ontogenia del sistema inmune.....	28
B.7 El bovino recién nacido:	
B.7.1 Nacimiento del becerro.....	31
B.7.2 Absorción de calostro.....	32
B.7.3 Eventos celulares en la absorción de calostro.....	34
B.7.4 Unión y transporte de inmunoglobulinas.....	36

B.8	Anaplasmosis y babesiosis en bovinos recién nacidos.....	38
C.	Hipótesis.....	40
D.	Objetivos.....	40

II. MATERIAL Y METODOS:

A.	Determinación de indicadores epidemiológicos:	
A.1	C.E. La Posta. Localización y manejo:	
A.1.1	Localización.....	42
A.1.2	Composición del Hato.....	42
A.1.3	Manejo.....	42
A.2	Pruebas serológicas:	
A.2.1	Anaplasma marginale.....	44
A.2.2	Babesia spp.....	44
A.3	Prevalencia.....	45
A.4	Probabilidad diaria de infección..	46
B.	Identificación de hembras donadoras de calostro:	
B.1	Localización.....	47
B.2	Esquema de muestreo y Selección de donadoras.....	48
B.3	Recolección de calostros.....	48
C.	Ensayos sobre caracterización Inmunológica del calostro:	
C.1	Pruebas generales.....	49
C.2	Pruebas específicas.....	50
D.	Caracterización de perfiles e indicadores en biológicos en becerros:	
D.1	Diseño:	
D.1.1	Obtención de becerros.....	50
D.1.2	Diseño experimental.....	52
D.1.3	Distribución de grupos.....	52
D.2	Indicadores clínicos.....	53
D.3	Indicadores hematológicos.....	53
D.4	Indicadores serológicos.....	54
D.4.1	De 0-24 hrs.....	54
D.4.2	De 1-180 días de edad.....	55

III. RESULTADOS

A.	Indicadores epidemiológicos en el C.E. La Posta:	
A.1	Prevalencia en el C.E.....	56
A.2	Tasa o probabilidad diaria de infección.....	56
B.	Vacas donadoras de calostro en Hidalgo y Veracruz.....	57
C.	Caracterización del calostro:	
C.1	Pruebas generales.....	57
C.2	Pruebas específicas:	
C.2.1	Anaplasma marginale.....	58
C.2.2	Babesia spp.....	58
D.	Indicadores biológicos en becerros experimentales:	
D.1	Distribución de los becerros.....	59
D.2	Indicadores clínicos.....	59
D.3	Hematología.....	61
D.4	Serología:	
D.4.1	Becerros de 0-24 hrs.....	63
D.4.2	Becerros de 1-180 días.....	65
IV.	DISCUSION.....	68
V.	LITERATURA CITADA.....	82
VI.	APENDICE:	
1.	Fijación de complemento.....	90
2.	Inmunofluorescencia indirecta.....	91
3.	Electroforesis.....	92
4.	Prueba de turbidez con sulfato de zinc.....	93
5.	Determinación de proteínas.....	94
6.	Prueba de ELISA.....	95
7.	Prueba de aglutinación en tarjeta.....	96
8.	Análisis de varianza (ELISA).....	97
9.	Soluciones de trabajo.....	98
CUADROS	100
GRAFICAS	113

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Características físicoquímicas de las principales clases de inmunoglobulinas en los mamíferos.....	18
2. Concentraciones de inmunoglobulinas en el suero de animales domésticos (g/l).....	19
3. Componentes del calostro y de la leche de bovino (g/l).....	26
4. Distribución de vacas donadoras de calostro.....	100
5. Electroforesis y Prueba de turbidez con Sulfato de Zinc. Valores de proteínas plasmáticas en calostros.....	100
6. Frecuencia cardiaca en becerros mantenidos en el trópico.....	101
7. Frecuencia respiratoria en becerros mantenidos en el trópico.....	101
8. Temperatura rectal en becerros mantenidos en el trópico.....	102
9. Medias mensuales de los conteos de glóbulos rojos en becerros mantenidos en el trópico.....	102
10. Registros del hematocrito de becerros mantenidos en el trópico.....	103
11. Conteos de glóbulos blancos (GB) en becerros mantenidos en el trópico.....	103
12. Prueba de turbidez con Sulfato de Zinc. Preingestión y posingestión de calostro.....	104
13. Detección de anticuerpos anti-A. marginales a las 24 hrs posingestión de calostro.....	104
14. Detección de anticuerpos anti-Babesia spp en becerros a 24 hrs posingestión de calostro. Prueba de inmunofluorescencia indirecta.....	105

15. Títulos de anticuerpos anti-A. marginale determinados por ELISA y su valor logarítmico en becerros del grupo T+.....	106
16. Títulos de anticuerpos anti-A. marginale determinados por ELISA y su valor logarítmico en becerros del grupo A+.....	107
17. Comportamiento de los títulos de anticuerpos anti-A. marginale determinados por ELISA en becerros del grupo T-.....	108
18. Títulos de anticuerpos anti-A. marginale determinados por ELISA y sus valores logarítmicos en becerros del grupo A-.....	109
19. Prueba de ELISA. Medias geométricas de anticuerpos anti-A. marginale determinados por ELISA en becerros mantenidos en una region tropical.....	110
20. Título de anticuerpos anti-A. marginale determinados por ELISA en becerros mantenidos en una región tropical.....	110
21. Becerros reactivos positivos a la presencia de anticuerpos contra A. marginale determinados por la prueba de aglutinación en tarjeta (PATA).....	111
22. Becerros reactivos positivos a la presencia de anticuerpos anti-A. marginale determinados por la prueba de fijación de complemento (FC)....	111
23. Becerros reactivos positivos a Babesia spp mantenidos en el trópico, determinados por la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)....	112
24. Prueba de Lowry y Electroforesis. Valores de proteínas plasmáticas en calostro.....	112

LISTA DE GRAFICAS

Gráficas

Página

1. Tasa de inoculación (h) ajustada a los 9 meses de edad en bovinos del Campo Experimental Pecuario "La Posta".....113
2. Frecuencia cardiaca de becerros mantenidos en el trópico.....114
3. Temperatura rectal de becerros mantenidos en el trópico.....115
4. Conteos de glóbulos rojos de becerros mantenidos en el trópico.....116
5. Valores de hematocrito en becerros mantenidos en el trópico.....117
6. Conteos de glóbulos blancos en becerros mantenidos en el trópico.....118

RESUMEN

ALVAREZ MARTINEZ, JESUS ANTONIO. Inmunidad humoral en la anaplasmosis y babesiosis bovinas en becerros mantenidos en una zona endémica (Bajo la dirección de Carlos A. Vega y Murguía y Germinal J. Cantó Alarcón)

Los objetivos de este estudio fueron conocer la relación entre la ingestión de calostro con anticuerpos anti-*Anaplasma marginale*, anti-*Babesia* spp. y la procedencia geográfica de los becerros, con la presentación de anaplasmosis y babesiosis, y estudiar la variación de los anticuerpos hasta los 6 meses de edad. Se utilizaron becerros Holstein Friesian recién nacidos, se distribuyeron de acuerdo a su procedencia en: animales del altiplano (A), del trópico (T), y por el suministro de calostro, con (+) y sin (-) anticuerpos anti-*A. marginale*, anti-*Babesia* spp. formándose 4 grupos: T+, A+, T- y A- que fueron mantenidos en una región endémica de anaplasmosis y babesiosis. Los indicadores clínicos: frecuencias cardíaca y respiratoria y temperatura rectal no reflejaron adaptación de los animales al clima tropical. La hematología que incluyó conteo de glóbulos rojos y hematocrito mostro valores moderadamente inferiores a lo normal; el conteo de glóbulos blancos estuvo ligeramente aumentado pero no se atribuyó ni a *Anaplasma marginale* ni a

Babesia spp. Se demostró la transferencia de inmunoglobulinas calostrales a las 24 horas posingestión de calostro, y específicamente con la prueba de ELISA se detectaron anticuerpos contra **A. marginale** en el grupo T+. Por medio de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) se demostraron anticuerpos anti-**Babesia spp.** a los 90 días. En el grupo T- se detectó un caso de babesiosis. Se observó diferencia estadística ($P < 0.05$) en los títulos de anticuerpos anti-**A. marginale** entre el grupo T+ vs los grupos A+, T- y A-. Mediante la prueba de ELISA, a los 180 días seroconvirtieron todos los becerros estudiados; en el mismo tiempo, mediante IFI el 96 % fueron reactores positivos. Se concluye que los anticuerpos no indican protección a la presencia de anaplasmosis y/o babesiosis, y los títulos de anticuerpos aumentan al exponer gradualmente a los becerros a los microorganismos, independientemente de la procedencia de los animales y de los anticuerpos recibidos por vía calostrál.

I.- INTRODUCCION.

A. Presentación del Problema.

Se conoce el hecho de que el nacimiento es un cambio drástico de un estado homeostático tranquilo en el útero a un ambiente hostil; este acontecimiento puede inducir en el recién nacido un síndrome general de alarma con incremento de la actividad pituitaria adrenal (79). Al primer día de nacido el becerro puede estar sujeto a las amplias variaciones de la temperatura ambiental, la disponibilidad de agua y alimento; además de la separación de su madre, al manejo excesivo y la exposición a un gran número de organismos patógenos.

En los becerros neonatos, la principal causa de mortalidad son las enfermedades, las que pueden estar determinadas por diversos factores entre los que destacan: el tamaño del hato, la calidad de alimentación, el grado de conocimiento del encargado de los becerros, el tipo de instalaciones o alojamiento y la época del año en que ocurren las particiones. Uno de los factores que se involucra en la supervivencia y buen desarrollo de los becerros es la ingestión oportuna del calostro, debido a que es la forma por la cual los anticuerpos maternos contra agentes extraños pueden circular en el organismo, y constituir protección específica inmediata y

simultáneamente aportar requerimientos nutricionales adecuados (62, 75).

En nuestro País, las regiones tropicales y subtropicales, ofrecen un gran potencial para la producción ganadera, actualmente se efectúa una continua introducción de ganado de razas puras, altamente especializadas en la producción de leche y carne. Este proceso ha hecho notar el efecto de éstas enfermedades, con la presencia de brotes severos de anaplasmosis y/o babesiosis en el ganado de reciente ingreso a las regiones endémicas. Dentro de la gama de enfermedades que afectan al ganado bovino en condiciones de trópico, son especialmente importantes por su magnitud las causadas por hemoparásitos como *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp., responsables de la anaplasmosis y babesiosis respectivamente. (1).

Actualmente para la prevención y control de estas enfermedades se dispone de la preinoculación, que es una infección inducida; o bien se ha intentado la aplicación de inmunógenos los cuales no han mostrado la eficacia deseada, ni una aplicación práctica en condiciones de campo, debida a los excesivos cuidados que se requieren para su manejo, y la débil protección que confieren (65).

Como una contribución al entendimiento de la relación que existe entre la ingestión de calostro con anticuerpos específicos contra *Anaplasma marginale* y contra *Babesia* spp., se diseñó el presente estudio para conocer la importancia que tiene el calostro de madres inmunes en becerros susceptibles, mantenidos en condiciones que favorecen la presentación de anaplasmosis y/o babesiosis.

B. Revisión de la literatura.

B.1 Sistema inmune del bovino.

B.1.1 Tejidos componentes del sistema inmune.

Los tejidos linfáticos en los mamíferos se agrupan en dos tipos: los órganos linfoides primarios que regulan la producción y diferenciación de linfocitos son la médula ósea y el timo. Su origen son las uniones ectodérmicas, que se desarrollan desde la vida embrionaria y persisten hasta después de la pubertad (83). Los tejidos linfáticos secundarios incluyen a los ganglios linfáticos, el bazo y los ganglios

linfoides en la submucosa de los aparatos respiratorio y gastrointestinal, donde hay un desarrollo linfóide antígeno-dependiente (54, 83).

3.2 Organos linfoides primarios.

3.2.1 Médula ósea.

Es el lugar de origen de precursores de todas las células sanguíneas; en los animales adultos su papel es proporcionar los leucocitos, eritrocitos y trombocitos de la sangre. También sirve como ambiente protector en el cual las células inmunes atraviesan por diferentes etapas de proliferación antígeno-dependiente. Los agregados de la médula ósea en la mayoría de los mamíferos son iguales que los del hígado.

La médula ósea se compone de senos venosos centrales y radiados que separan compartimentos hematopoyéticos. Las células endoteliales del seno tienen numerosas vesículas pinocíticas y pocos lisosomas. La función del endotelio se ha descrito como fagocitosis, y es generalmente ejecutada por macrófagos dentro del intersticio. El complejo endotelio-adventicia se cree que regula los niveles de leucocitos circulantes, ya que sólo las células maduras son

capaces de cruzar esa barrera. El tejido hematopoyético contiene células indiferenciadas, células precursoras, eritrocitos maduros, granulocitos, linfocitos, megacariocitos, monocitos, macrófagos y células cebadas (54).

En el desarrollo morfológico de los sistemas linfoides, los elementos formadores de la sangre aparecen inicialmente en el saco vitelino; posteriormente en el hígado fetal. En el adulto, la principal fuente de células linfoides es la médula ósea, por lo tanto, tiene dos funciones, como órgano formador de células de la sangre que incluye linfocitos y como eliminador de partículas antigénicas en la sangre circulante, debido a la gran cantidad de fagocitos mononucleares que contiene (68, 93).

B.2.2 Timo.

Se desarrolla del endodermo y deriva de la tercera y cuarta bolsas faríngeas.

El timo parece ser el órgano central del desarrollo y función del sistema inmune, aunque no participa directamente en reacciones inmunes; ocupa la región anterior del mediastino, alcanza su tamaño máximo en la pubertad, e involuciona posteriormente. Durante la embriogénesis es el primer órgano que inicia la producción de linfocitos y es donde hay la mayor

tasa de producción celular del cuerpo (7, 22, 54, 83). En la mayoría de las especies de mamíferos está desarrollado casi completamente antes del nacimiento, su maduración precede a la de otros tejidos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos, el bazo y los tejidos linfoides de mucosas (54).

El timo está formado por lóbulos, cada uno posee una capa externa o corteza con gran infiltración de linfocitos, y una interna o médula con menos linfocitos. En esta última existen los corpúsculos tímicos o de Hassall, cuya función se desconoce (7, 54, 83). La irrigación del timo proviene de arterias que atraviesan el tejido conjuntivo como arteriolas y recorren la unión corteza-médula, de éstas nacen los capilares, que tienen una membrana basal y una capa externa de células epiteliales constituye una barrera a los antígenos circulantes, que les impide penetrar al timo (7, 83).

En el animal recién nacido este órgano es la fuente de gran número de linfocitos de la sangre circulante, a los que se les denomina células T. Estos linfocitos proceden de la médula ósea como precursores, se mueven en el flujo sanguíneo a través de las paredes de los vasos dentro del timo, estas células proliferan rápidamente con una actividad mitótica 10 veces superior a la observada en ganglios linfáticos, y se duplica en 24-36 horas. Muchos linfocitos, aproximadamente el 75% mueren

in situ; el 25% restante emigran, para colonizar de células T, los órganos secundarios en donde funcionan como células T inmunocompetentes. Esta diferenciación es independiente de la presencia de antígeno (7, 54, 82).

B.2.3 Bolsa de Fabricio.

Es un órgano linfoepitelial que existe en las aves, es posible que no exista ningún equivalente en los mamíferos y en estos animales las funciones de la bolsa podrían efectuarse por la médula ósea. No obstante, durante algún tiempo se mencionó al tejido linfóide presente en el intestino, en particular la Placas de Peyer, como su equivalente (83).

B.3 Organos linfoides secundarios.

Se originan en el mesodermo, del que se forman al final de la etapa fetal y persisten durante toda la vida; responden a la presencia de antígenos. La extirpación de estos, no afecta fundamentalmente a la capacidad inmunitaria de un animal. Esta clase de órganos comprende el bazo, los ganglios linfáticos y

nódulos linfoides del tubo digestivo, vías respiratorias y aparato genitourinario (7, 54, 83).

Dentro de algunos órganos como el bazo, los ganglios linfáticos y ocasionalmente el timo, se efectúa la mayor parte de la captación y modificación de los antígenos, que son sustancias que pueden desencadenar una respuesta inmune. Las células que dan origen a la respuesta son los linfocitos, cuya principal función es la producción de anticuerpos, o la especialización en células efectoras en presencia de antígeno (7, 58, 83). Las variaciones en la estructura y localización de estos tejidos linfáticos organizados, parecen representar adaptaciones específicas del hospedador para la movilización de respuestas inmunes en sitios distantes por el flujo sanguíneo y en las membranas mucosas (54).

3.3.1 Ganglios linfáticos.

Son filtros que interrumpen la corriente aferente de linfa que drena regiones específicas del cuerpo, y la fuerzan a filtrarse a través de un retículo que contiene células linfoides, antes de pasar a los canales eferentes. Los ganglios se dividen en corteza y médula, por la densidad de linfocitos.

Las células de la corteza son principalmente linfocitos de tipo B, pero existen de tipo T; mientras no haya exposición a los antígenos se les llama folículos primarios, cuando hay estimulación las células de esos folículos originan formaciones que se llaman centros germinativos y se convierten en folículos secundarios. En el área paracortical los linfocitos T están dispuestos en nódulos mal delimitados que se denominan folículos terciarios, y se considera como dependiente del timo, porque al ser extirpado al nacimiento o por falta congénita, la zona carece de células. En las células de la médula se incluyen linfocitos B, macrófagos, células reticulares y células plasmáticas (7).

De las células que entran al parénquima a través de la pared por vénulas especializadas de la corteza, son generalmente en la proporción de un 75% de células T y un 25% de células B. Una estimulación antigénica o tratamiento con adyuvante aumenta el tráfico de esas células a la sangre o al sitio de inyección (54).

La respuesta de los ganglios linfáticos a los antígenos, puede ser por dos tipos de fijación o de captación; en el primero recurren a macrófagos presentes en la médula del ganglio, ya que estas células pueden actuar en ausencia de

anticuerpos. El otro sistema lo componen las células dendríticas, que se localizan en la corteza y sobre todo en los folículos secundarios. Forman una red que depende de la presencia de anticuerpos para que el antígeno quede adherido a las prolongaciones celulares; los macrófagos cargados de antígeno emigran a los folículos corticales, ahí existen células sensibles a los antígenos, cuya descendencia producirá anticuerpos. Después de iniciada la producción de anticuerpos en la médula, aparecen los centros germinativos en la corteza (54, 56, 63).

3.3.2 El bazo.

Es el órgano linfóide más grande, actúa como filtro del flujo sanguíneo lo que le permite eliminar partículas antigénicas y células sanguíneas maduras (7).

Se divide en dos compartimentos, uno de almacenamiento de eritrocitos, captación de antígenos y eritropoyesis que se denomina pulpa roja, y otro donde se efectúan respuestas inmunes o pulpa blanca (7, 54, 63).

Cuando se aplican antígenos por vía endovenosa, en gran parte son captados por el bazo y fagocitados por los macrófagos de la zona marginal en los sinusoides de la pulpa roja. Estas

células transportan los antígenos a la pulpa blanca, en donde se presenta la migración de células productoras de anticuerpos. Cuando los antígenos entran al bazo o ganglios linfáticos, se inicia la captación de linfocitos, esto permite concentrar células sensibles a los antígenos cerca de los focos de acumulación de antígenos y se aumenta la eficacia de la respuesta inmune (54, 63).

B.3.3 Sistema inmune de las mucosas.

Está formado por nódulos linfoides no encapsulados y de infiltrados linfocíticos, esparcidos en la submucosa de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario. Estas estructuras son un sitio inicial de ataque al antígeno para la síntesis local y el transporte selectivo de anticuerpos secretores, tipo IgA, a las secreciones externas. Promoviendo así la inmunidad local de patógenos y proteínas extrañas (7). La acción de este sistema inmune se combina con procesos normales como secreción de moco, movimiento ciliar, descamación celular y motilidad intestinal; de manera que se evita la colonización bacteriana en pulmón y en intestino (54).

B.4 Respuesta inmune específica.

La respuesta inmune corresponde al reconocimiento de extrañeza en una alta capacidad discriminatoria; los resultados de la subsecuente reacción entre el hospedador y la configuración ajena denominada como antígeno; dependen de las propiedades de la sustancia como tamaño, estructura, cantidad y de propiedades del hospedador como edad, constitución genética, etc.

Existen dos mecanismos efectores que median la respuesta inmune específica, uno es por intermediación de linfocitos sensibilizados específicamente, conocido como inmunidad celular o hipersensibilidad retardada, y el otro es por intermedio de un producto celular de los tejidos linfoides identificados como anticuerpos y conocido como inmunidad humoral (7).

B.4.1 Inmunidad celular.

Este mecanismo parece estar controlado por el timo y mediado por los tejidos linforeticulares o timo-dependientes (7, 83).

Un encuentro inicial con un inmunógeno encabeza eventos que comprenden la captura y el procesamiento, seguidos por una transferencia de información, proliferación y diferenciación celular (7).

Los sitios anatómicos donde se realizan esos procesos, son los ganglios linfáticos y el bazo. En la región paracortical del ganglio linfático se presentan, la proliferación y diferenciación de los linfocitos involucrados en la respuesta celular (58).

En la interacción del inmunógeno con linfocitos sensibilizados ocurre la formación de productos celulares o linfoquinas. Estos productos incluyen al factor de inhibición de la migración (MIF), citotoxinas, interferón y otros mediadores de la inmunidad celular (7).

El reconocimiento del antígeno por un receptor de la superficie celular del linfocito-T, es el inicio de la respuesta celular; estas células sensibles a los antígenos, responden dividiéndose repetidas veces y originan una población de células de memoria y una de células efectoras. Las últimas, son mayores en tamaño que los linfocitos sin estimular; pueden efectuar la síntesis y secreción de varias proteínas activas no específicas del antígeno, que son las linfoquinas. También pueden dar origen a factores específicos del antígeno, diferentes de las inmunoglobulinas que se conocen como factores de transferencia y pueden intervenir en las reacciones citotóxicas directas al

entrar en contacto con células alogénicas (54, 83).

Las linfocininas son proteínas provenientes de las células T y de las células B activadas; en general, no fijan al antígeno, ni son específicas de antígeno. Actúan sobre poblaciones celulares e inducen cambios funcionales sobre ellas. La activación de las células T para producir linfocininas requiere la presencia de pocos macrófagos viables que presenten el antígeno; en contraste con las B que son activadas para producir linfocininas por mitógenos de células B, tales como endotoxinas lipopolisacáridos, moléculas de polisacáridos grandes polivalentes. Las linfocininas producidas por células T o B aparentemente son idénticas (54).

La función de cada linfocinina es reclutar y activar a las células blanco y con esto aumentar las reacciones inflamatorias y de defensa del hospedador a organismos invasivos, cuerpos extraños, aloinjertos de tejidos, neoplasias inmunestimulantes y a antígenos de órganos específicos en respuestas autoinmunes (43, 54, 83).

Ejemplos de linfocininas son: el factor de inhibición de la migración (MIF) el cual inhibe la migración de los macrófagos (58). El factor de la activación de macrófagos (MAF) promueve la

polimerización de la tubulina, activa metabólicamente a los macrófagos a que sean bactericidas y tumorocidas. (54). El factor de inhibición de la migración de los leucocitos (LIF) inhibe la movilidad de los neutrófilos. Los factores quimiotácticos (CTX) atraen leucocitos. El factor de linfoquinas (LF) tiene efecto citostático y citolítico para células blanco no leucocitos (54, 83). El factor de permeabilidad vascular (VPF) incrementa la formación de edema extravascular, el factor de activación de los osteoclastos (OAF) incrementa la reabsorción de osteoclastos del hueso (54). Entre los factores que pueden inhibir las respuestas inmunes se encuentran los efectos supresores y el interferón, este último que es una proteína antiviral y tiene una influencia moduladora sobre las respuestas inmunes (58).

B.4.2 Inmunidad humoral.

Este proceso inmunológico es efectuado esencialmente por los anticuerpos que son proteínas sintetizadas dentro de células especializadas de tejidos reticulares, los producen las células plasmáticas, aunque también los linfocitos son capaces de sintetizarlos (7).

Existen diferentes clases de anticuerpos o inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, cada una con sus propias

características (7, 54, 58, 83).

Cuando se presentan las condiciones adecuadas el antígeno se fija a la inmunoglobulina receptora de la superficie de la célula B, desencadena procesos que terminan con la aparición de células productoras de anticuerpos y de células de memoria. Luego de varias generaciones la célula inicial se separa en dos poblaciones morfológica y fisiológicamente distintas. Una desarrolla retículo endoplásmico, son capaces de sintetizar inmunoglobulinas y se denominan células plasmáticas (83). Este tipo de células puede sintetizar hasta 300 moléculas de anticuerpos cada segundo; estos anticuerpos tienen la misma especificidad que el receptor de antígeno inicial de la célula B progenitora. Estas células duran 3-6 días (7, 58, 83). La otra la constituyen las células de memoria, poseen receptores que son inmunoglobulinas con la misma especificidad de las células B progenitoras. La mayor parte de las células B sin estimular tienen en su superficie IgM; en una respuesta inmune estas células empiezan a producir primero IgM y mas tarde IgG, IgA o IgE, lo cual es regulado por las células T, en ausencia de estas últimas no se produce cambio (7, 54, 58, 83).

B.4.2.1 Anticuerpos o inmunoglobulinas.

Son glicoproteínas compuestas de 82-96% de polipéptidos y 4-18% de glúcidos; son producidos por las células plasmáticas como resultado de la interacción entre los antígenos específicos y los linfocitos B sensibles a los mismos. Comprenden aproximadamente al 20% de las proteínas totales del plasma (34).

Los anticuerpos son moléculas bifuncionales; por un lado se unen específicamente con un antígeno y por el otro inician varios fenómenos secundarios, como la fijación del complemento o la liberación de histamina por las células cebadas, esta última función es independiente de su especificidad para el antígeno (54).

Las moléculas de los anticuerpos se pueden clasificar por su solubilidad en soluciones salinas concentradas, peso molecular, carga electrostática y por su estructura antigénica. Las principales clases de inmunoglobulinas con estos métodos son: A, D, E, G y M (Cuadro No. 1). En los rumiantes no se conoce la IgD. La función de los anticuerpos se efectúa en una de 3 formas: 1) actuando directamente sobre el antígeno, causándole aglutinación, precipitación, neutralización; 2) por activación del sistema de complemento, que son enzimas inactivas en el plasma que a la unión antígeno-anticuerpo se activan, y pueden

causar aglutinación, neutralización, lisis o bien opsonización, esto último debido a que alteran la superficie del antígeno para facilitar la fagocitosis, o por su función quimiotáctica; 3) por la activación del mecanismo anafiláctico por las inmunoglobulinas de la clase IgE y algunas de la clase IgG en mamíferos (24, 31).

CUADRO 1
CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LAS PRINCIPALES CLASES DE
INMUNOGLOBULINAS EN LOS MAMIFEROS.

	Clases de Inmunoglobulinas				
	IgM	IgG	IgA	IgE	IgD
Coefficiente de Sedimentación (S)	19	7	11	8	8
Peso Molecular	900,000	180,000	360,000	200,000	180,000
Movilidad Electroforética	beta	gamma	beta gamma	beta gamma	

Tomado de Goodman, 1980 (34) y Tizard, 1983 (83).

La inmunoglobulina G o IgG, es la clase predominante en el suero sanguíneo (Cuadro No. 2), por su tamaño puede atravesar varias barreras vasculares e interviene en la defensa de espacios tisulares y superficies corporales. El anticuerpo solo, no es capaz de controlar las infecciones porque la unión del

anticuerpo a un microorganismo, no afecta en sí la viabilidad de este (34, 54). La IgG puede opsonizar, aglutinar y precipitar a los antígenos, puede activar al sistema de complemento, si hay en la superficie del antígeno un número suficiente de moléculas en disposición correcta. Algunas subclases de IgG pueden fijarse a las células cebadas, induciendo la liberación de histamina. El tiempo medio en el plasma es de 20-21 días (7, 14, 33, 54, 83, 87).

Cuadro No. 2
CONCENTRACIONES DE INMUNOGLOBULINAS EN EL SUERO DE
ANIMALES DOMESTICOS (g/l).

.....

Clases de inmunoglobulinas

ESPECIE	IgG	IgM	IgA	IgE
Equino	5-20	0.8-2.0	0.6-3.5	--
Bovino	17-27	2.5-4.0	0.1-0.5	--
Ovino	17-20	1.5-2.5	0.1-0.5	--
Suino	17-29	1.0-5.0	0.5-5.0	--
Canino	5-17	0.7-2.7	0.2-1.2	0.023-.42
Humano	8-14	0.5-2.0	1.5-4.0	0.00002-0.0005

.....

Tizard, 1983 (83)

La inmunoglobulina A, o IgA es la principal en las secreciones externas del cuerpo, a diferencia de la IgG e IgM, que son secretadas en los nódulos linfoides y bazo y liberadas a la circulación, las moléculas de IgA son secretadas cerca de las

células epiteliales, donde son prontamente excretadas a través de éstas células al ambiente externo. La IgA es fundamental en la protección del tubo digestivo, vías respiratorias, aparato genitourinario, ubre y ojos, contra la invasión microbiana; aunque no activa al complemento, ni actúa como opsonina, puede aglutinar partículas antigenicas y neutralizar virus (7, 34, 54, 83). Además, es una Ig modificada, que consiste de 2 moléculas de IgA unidas por una cadena J y contiene un componente secretor enrollado en las porciones Fc (7).

La inmunoglobulina E, o IgE se encuentra en concentraciones muy bajas en el suero de algunas especies, interviene en reacciones de tipo alérgico y anafilaxia, y esta relacionada con la respuesta inmune en infestaciones causadas por helmintos. Estas pueden fijarse a las células cebadas y a los basófilos, ahí en unión del antígeno inducen la liberación de sustancias vasomotoras (7, 14).

Las inmunoglobulinas con base en sus características antigenicas y movilidad electroforética se pueden subdividir en subclases o isotipos. La importancia se debe al hecho de que tienen actividades biológicas diferentes. De la IgG en bovinos, hay 2 subclases; IgG1 e IgG2. La IgG1 se desplaza más rápido que

la IgG2 en la electroforesis, pero la IgG2 aglutina mejor los antígenos que la IgG1 (24, 83). Se ha establecido la heterogenicidad entre las subclases de IgG de los rumiantes, así como la homología de IgG1 e IgG2 entre bovinos, ovinos y caprinos (27, 41, 53).

En rumiantes se ha podido clasificar una tercera subclase de IgG por criterio físico-químico; ésta posee una posición intermedia en la elución de IgG1 e IgG2, durante la cromatografía de intercambio iónico, y se le conoce como IgG 2b (15).

3.4.2.2 Complemento.

Es el sistema humoral primario mediador de las reacciones antígeno-anticuerpo; consiste de al menos 20 proteínas séricas química e inmunológicamente distintas. La secuela biológica de la activación de este sistema puede ser la lisis de grado variable, en diferentes tipos de células. Individualmente estas proteínas, están presentes en la circulación, como precursores inactivos, juntas comprenden el 15% de las globulinas del plasma (17).

3.5 Cambios en el sistema inmune de la madre.

3.5.1 Placentación.

La placenta puede ser considerada como un homoinjerto, está íntimamente unida con el tejido materno y no es rechazada sino hasta el parto, teóricamente debiera ser rechazada a las dos o tres semanas (35).

Para el control del rechazo inmune del feto se han sugerido varios mecanismos; primero se pensó que las células epiteliales de la placenta constituían una barrera física para el paso de antígenos fetales y que poseía una superficie inmunológicamente inerte. Pero se mostró que las células del amnios no poseían antígenos de histocompatibilidad, y eran inmunológicamente inertes a la madre (35, 58). Se pensó que las fetoproteínas, resultado del desarrollo del hígado fetal protegían al feto de los linfocitos maternos que le podrían ser dañinos. Empleando la transformación de linfocitos in vitro algunos autores han propuesto que los linfocitos fetales podrían tener una población de células supresoras que inhiben la mitosis de los linfocitos maternos. En el bovino se ha evidenciado la reducida respuesta de linfocitos maternos a mitógenos como la fitohemaglutinina, al término de la gestación y en el periodo inmediato al parto.

También los corticosteroides del plasma se incrementan al momento del parto y esto tiene un efecto inhibitorio sobre la estimulación de linfocitos (58).

Para el mantenimiento de la preñez y para el proceso del nacimiento son necesarias hormonas. Durante la preñez las hormonas exceden sus niveles por largos periodos, la progesterona, cortisona y sus derivados son inmunosupresores (31, 35). Niveles elevados de estrógenos en el sistema materno se han asociado con disminución en el sistema de la properdina (9). Niveles altos de estrógenos en el sistema materno, facilitan el transporte selectivo de inmunoglobulinas de tipo IgG y de complemento en las secreciones calostrales (57, 61).

La placenta tiene como función general el intercambio fisiológico, en el bovino incluye a 3 membranas, el córion, alantoides y amnios y un vestigio de saco vitelino. La relación de los vasos sanguíneos del feto y de la madre dependen de la especie animal y del tipo de placenta. En los bovinos hay porciones de la placenta fetal llamados cotiledones los cuales, se unen a proyecciones de la mucosa uterina a las que se denomina carúnculas, las dos forman los placentomas. En la vaca varían en cantidad de 70-120 placentomas (35). Microscópicamente las placentas se clasifican por el número de capas que separan a la circulación fetal de la materna, nombrándose en orden materno

y luego fetal. En la vaca es epitelio-corial, de modo que el epitelio del útero de la madre esta en contacto directo con el del corion del feto (31, 35). Las funciones de la placenta son de multiórgano, puesto que sustituye al tracto gastrointestinal, pulmón, riñón, hígado y glándulas endocrinas, manteniendo separado al feto de la madre (31).

La sangre del feto y de la madre nunca están en contacto directo, pero existe una cercanía suficiente del corion y del endometrio, que permite al oxígeno y los nutrientes el paso de la sangre materna a la sangre fetal y los desechos en dirección opuesta. De los glúcidos, la fructosa comprende del 70-80% de los azúcares en la sangre fetal, mientras que la glucosa predomina en la sangre materna. La placenta es permeable a los ácidos grasos y glicerol; las vitaminas A, D, y E son impedidas para pasar por la placenta, sin embargo hay permeabilidad a las hormonas (35).

Las proteínas no son transferidas como tales, sino como aminoácidos y pasan contra un gradiente de concentración; en el caso de las inmunoglobulinas, en el humano es posible el paso al feto, de las de la clase IgG, porque hay contacto directo de la sangre materna con el corion del feto, la placentación es de tipo hemo-corial. Pero no es posible el paso de las de las clases IgM, IgA ni IgE. En los rumiantes, es imposible el paso de

cualquier inmunoglobulina a través de la placenta, los becerros deben recibir los anticuerpos maternos por el calostro (35, 33).

B.5.2 Glándula mamaria de la vaca durante la preñez.

En este periodo ocurre una extensión del sistema de conductos y una aparición de los alveolos. Al 4o.-5o. mes, los lobulillos glandulares están bien formados e incrementan su tamaño con la formación de nuevos alveolos o por hipertrofia de los existentes, hay distensión de los alveolos con el inicio de la actividad secretora. Durante el quinto mes la secreción presenta lóbulos de grasa (18).

Las hormonas ováricas son grandemente responsables del crecimiento mamario, los estrógenos se asocian con el desarrollo del sistema de conductos en cada periodo estral y a través de la preñez. La progesterona actúa con los estrógenos para el crecimiento completo de los alveolos (31).

Durante la preñez los niveles de prolactina son variables pero en general bajos. Al posparto los niveles cambian, el estradiol y la progesterona aparecen en bajas concentraciones, los esteroides adrenales bajan poco, pero la prolactina está en altas concentraciones (18, 31).

Al tiempo del parto la glándula mamaria cambia del crecimiento activo de sus tejidos al inicio de una lactación copiosa; primero la secreción es calostro, el cual representa las secreciones acumuladas en las últimas semanas de gestación. El calostro se caracteriza porque posee niveles altos de grasa, proteínas, inmunoglobulinas y es bajo en lactosa. Estas concentraciones varían con lo que se encuentran en la leche (Cuadro No. 3). A los 4 días de lactación la composición de la secreción cambia de calostro a leche normal, hasta que se presenta el secado, aproximadamente a las cuarenta semanas posteriores al parto (35).

Cuadro 3
COMPONENTES DEL CALOSTRO Y DE LA LECHE
DE BOVINO (g/l).

COMPONENTES	CALOSTRO	LECHE

AGUA	733	873
LÍPIDOS	51	37
LACTOSA	22	48
PROTEÍNA	176	33
MINERALES	10	--

Hafez, 1974 (35); Frandsom, 1981 (31).

B.6 Desarrollo del sistema inmune en el becerro neonato.

B.6.1 Duración de la gestación.

La gestación se extiende desde la fertilización hasta el nacimiento, está calculado como el intervalo del servicio fértil al parto. La duración está genéticamente determinada, aunque puede modificarse por factores maternos, fetales o ambientales; de los maternos se puede señalar la edad de la vaca. Las vacas jóvenes conciben en un periodo ligeramente más corto que las vacas viejas. Los factores fetales incluyen entre otros el tamaño del feto, fetos múltiples, el sexo del feto, se menciona que en los machos tardan 1-2 días más que las hembras. Los factores ambientales se menciona que la época del año puede afectar indirectamente con un retraso, por el tipo de alimento de mala calidad en épocas de sequía. El periodo de gestación de las vacas Holstein Friesian es de 262-359 días, con una media de 279 días (35).

B.4.2 Ontogenia del sistema inmune.

Organogénesis. La primera formación de la mayoría de los órganos y partes del cuerpo ocurre entre la 2a-6a semana, durante este periodo el tracto digestivo, pulmones, hígado y páncreas se desarrollan a partir del intestino primitivo. Los sistemas muscular, esquelético, nervioso y urogenital también ya están establecidos; al día 21 el corazón comienza a latir y se inicia la circulación (23, 35, 56).

Los órganos linfoides primarios y secundarios del becerro se encuentran bien desarrollados antes del nacimiento; el timo, bazo, ganglios linfáticos y las placas de Peyer a los 42, 55, 60 y 75 días respectivamente (83).

Los elementos formadores de sangre aparecen primero en el saco vitelino, luego en el embrión y en el periodo fetal temprano en el hígado (61).

Los linfocitos se han observado en fetos de bovinos a los 45 días, en general los fetos de bovinos no muestran IgG ni IgA (58, 83).

En la etapa fetal existe la capacidad de respuesta a la estimulación antigénica, aunque no todos los antígenos tienen

Igual capacidad de estimular la respuesta en el feto, además la respuesta de ciertos antígenos es anterior a otros. El patrón secuencial de respuesta conocido en fetos de bovinos, indica que a los 132 días responde a la presencia de *Leptospira saxkoeling*, a los 140 días a *Anaplasma marginale*, aproximadamente a los 150 días al virus de Parainfluenza-3, aproximadamente a los 205 días al virus de la diarrea viral bovina, y aproximadamente de 240-260 días a *Campylobacter fetus*, *Chlamydia* y *Escherichia coli* (58, 83). Sin embargo, algunos microorganismos solo estimulan la respuesta inmune hasta el nacimiento como son los casos en becerros, con el virus de lengua azul y con la bacteria *Brucella abortus* (58).

En el becerro fetal se observa que la actividad del complemento hemolítico está presente desde el día 90 de gestación (32), pero otros investigadores indican su presencia hasta los 120 días (83). La actividad hemolítica del complemento en el feto de bovino a los 90, 150 y 270 días tiene 20, 50 y 84% de la actividad de suero de un adulto. Los valores del adulto se consideran a los observados después de los 6 meses de edad (32).

A los 70-80 días de gestación se ha encontrado evidencia de que el suero fetal posee cierta actividad bactericida contra *Escherichia coli*, aunque el grado de eficiencia en el feto se desconoce (6). En los fetos las más de la veces la respuesta

celular está compuesta principalmente de monocitos y macrófagos, mientras que en el adulto la respuesta inducida es primordialmente una reacción de leucocitos polimorfonucleares. Se ha hipotetizado que esto representa el mecanismo más temprano y primitivo de defensa y es una respuesta inespecífica a la lesión del tejido (25).

3.7 El bovino recién nacido.

3.7.1 Nacimiento del becerro.

El estudio de la inmunidad en los rumiantes ha tenido sucesos y observaciones trascendentes, entre las que destacan los estudios de Smith y Little en 1922, en los cuales se mostró que todos los becerros privados de calostro morían por infección bacteriana, de esto no existía duda para los ganaderos desde mucho tiempo atrás. Pero en esa época fué primordial porque se sabía que niños privados de calostro, no morían y podían crecer sin problemas alimentados con leche de vaca o sustitutos de leche (79).

En la actualidad se sabe que los rumiante al nacer son agammaglobulinémicos y llegan a un ambiente donde abundan los antígenos, luego de haberse desarrollado dentro del útero que es prácticamente estéril (70). Las crías al nacer son capaces de presentar respuesta inmune, que se caracteriza por ser una respuesta primaria con baja concentración de anticuerpos, por lo que es necesaria una ayuda inmunológica que se consigue por el paso de anticuerpos de la madre mediante la ingestión de calostro (83).

La importancia del calostro ha sido repetidamente demostrada; se ha sugerido que los becerros deben consumir inmunoglobulinas calostrales rápidamente después del nacimiento, para prevenir la hipogammaglobulinemia (46, 47). Se ha estimado que del 10-40% de los becerros puede fallar en adquirir cantidades adecuadas, lo cual está asociado con mortalidad neonatal (72).

9.7.2 Absorción de calostro.

En los animales recién nacidos que empiezan a alimentarse con calostro, la actividad proteolítica del tubo digestivo es escasa y disminuye más porque en el calostro existen inhibidores de la tripsina, de tal manera que las proteínas del calostro no se desdoblan, sino que llegan sin alteración al intestino delgado (83).

En el intestino delgado de los mamíferos neonatales, el sistema retículo endotelial tiene la capacidad de ingerir macromoléculas por un mecanismo endocítico. Estudios sobre la ultraestructura del epitelio intestinal de becerros recién nacidos, han mostrado que las células de los vellos del yeyuno son columnares con bordes bien desarrollados y con microvellosidades; el núcleo de esas células generalmente es

oval y tiene una localización apical en el citoplasma. Además presenta una cubierta pelúcida o glicocálix esparcida sobre las membranas microvellosas del yeyuno; abajo hay un complejo de tubulos apicales o complejo endocítico. Estos se aumentan de tamaño por invaginaciones. Las siguientes estructuras son vacuolas que se conectan directamente con los tubulos. Las células del ileon muestran muchas similitudes con las del yeyuno, los microvellos de puntas más cortas y el glicocálix que no es evidente, son las únicas diferencias (77).

Con el empleo de marcadores como la ferritina, la hemocianina y enzimas como la peroxidasa de rábano picante han permitido sugerir que en los becerros hay una cierta selectividad en la absorción basada en el tipo de proteína más que en el peso molecular, además se ha sugerido que los receptores están en el yeyuno. Todo esto ha sido resultado de la administración de anti-IgG humana en conejo conjugada a la ferritina, y de ferritina suspendida en suero de calostro; ambas en porciones del yeyuno e ileon ligadas. Al ser revisadas en microscopio electrónico, mostraron que las células del yeyuno no toman ferritina, pero si hubo ferritina conjugada a la IgG en el complejo tubular (77).

B.7.3 Eventos celulares en la absorción del calostro.

Las células intestinales de los rumiantes recién nacidos absorben las proteínas del calostro inalteradas en las primeras horas de vida, ésta ocurre en las células absorbentes del intestino delgado y es transferida a los linfáticos y capilares sanguíneos de las vellosidades. El proceso involucra primero la unión de la inmunoglobulina en el borde de las microvellosidades, pero va seguido por endocitosis del sitio receptor y de la inmunoglobulina. Posteriormente hay un agrandamiento de la membrana endocitada y se forma una vacuola, que es transportada a las células de la membrana basal. Al tener contacto con estas, el contenido de la vacuola entra a la circulación portal o bien a los linfáticos (14, 76).

La selectividad y duración de la etapa de permeabilidad celular tiene diferencias en los animales domésticos: la tasa y patrón de absorción de inmunoglobulinas calostrales basada en la concentración en suero (mg/ml), se ha determinado de la inclusión de tres factores: 1) edad al inicio de la alimentación con calostro, 2) cantidad de calostro, y 3) tiempo después de la alimentación. Todas las clases de inmunoglobulinas, muestran características similares de absorción en las primeras cuatro horas después de la alimentación. Se ha observado que 2 lts de calostro son suficientes, es decir de 80-100 g de

inmunoglobulinas para bovinos Holstein Friesian, pueden ser óptimos para la actividad pinocítica de las células (78).

Generalmente se ha encontrado que en rumiantes no existe permeabilidad selectiva, pero se sabe que las inmunoglobulinas de la clase IgA se vuelve a excretar, esto no ocurre en otras especies como los cerdos, puesto que poseen gran cantidad del componente secretor libre en el tubo digestivo. Debido a esto al IgA calostroal y en menor grado la IgM pueden unirse a este componente, inhibiéndose así la absorción (83). Sin embargo, la eficiencia de absorción de las diferentes clases de inmunoglobulinas no es clara, se ha encontrado que el 44% de las de la clase IgG ingeridas han aparecido en el flujo sanguíneo, al proporcionar el calostro entre las 2-7 hrs después del nacimiento (13). En otro estudio se ha mostrado que la eficiencia de absorción de la IgG calostroal fue de 66%, en las primeras 24 hrs después del nacimiento (13).

No hay acuerdo entre investigadores respecto a la duración del periodo de absorción, se ha encontrado variación entre especies animales; específicamente en becerros se ha determinado que la IgG puede ser absorbida hasta las 27 hrs, la IgA hasta las 21 hrs y la IgM hasta las 16 hrs después del nacimiento (59).

Algunos investigadores mencionan que la IgM es menos eficiente que la IgG por su gran tamaño, y por el corto periodo de absorción que puede tener. Sin embargo, se ha demostrado que la IgM incrementa su absorción cuando la cantidad ingerida es escasa; notándose una eficiencia de 90% con una cantidad ingerida de 1-5 g de IgM. Mientras que las de tipo IgG no cambian su comportamiento, esto también ha permitido proponer que las IgM son las inmunoglobulinas primarias en los primeros días de vida (11).

En vacas que han amamantado al becerro en las primeras horas, la concentración de inmunoglobulinas existente en el suero al momento del parto, decrece hasta en 50% entre las 9-24 hrs postparto (43).

3.7.4 Unión y transporte de inmunoglobulinas.

La unión de las inmunoglobulinas a los receptores sobre la superficie de las células intestinales infiere selectividad y especificidad, esta ya ha sido probado al reconocer la existencia de receptores en las células absorbentes intestinales de roedores lactantes, los cuales son específicos para IgG no para otras inmunoglobulinas. La adhesión de la IgG a los receptores fué pH-dependiente, ocurrió en un rango de 6.0-6.5 pero no a pH de 7.4-8.0. De esta manera se ha sugerido que la

IgG se une a los receptores y es liberada a la superficie celular al exponerse a un pH cercano a 7.4 (39).

Al tiempo en que ocurre la absorción intestinal, los rumiantes presentan una intensa proteinuria que se debe fundamentalmente a la absorción de otras proteínas como la lactoalbúmina B y algunos polipeptidos que son pequeños y pueden excretarse por el riñón (83).

Cuando en la absorción de calostro se presenta algún defecto, los becerros pueden tener poca o ninguna cantidad de inmunoglobulinas en el suero, esto puede determinar la mayor susceptibilidad a la presentación de la septicemia por *Escherichia coli* (10, 19, 28), o a neumonías (83). Una evaluación de la significancia de la protección de anticuerpos contra el nematodo *Cooperia oncophora*, transferidos por el calostro, no indicó influencia en el curso de la enfermedad al ser confrontados con larvas del mismo parásito (42).

3.8 Anaplasmosis y babesiosis en bovinos recién nacidos.

Es bien conocido que la anaplasmosis y la babesiosis son enfermedades causadas por parásitos intraeritrocíticos como son: *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp., que pueden ser transmitidos por artrópodos y poseen una amplia distribución especialmente en las regiones tropicales y subtropicales (1, 52, 65).

En la mayoría de los casos estas enfermedades se asocian con anemia hemolítica progresiva, menos severa en animales jóvenes que en adultos (52, 64). La severidad de la infección generalmente se mide por el número de eritrocitos parasitados, observados al microscopio en frotis teñidos.

En relación a la anaplasmosis cuando se han inoculado vacas antes del día 190 de la gestación se ha encontrado la forma clínica al nacimiento, lo que ha sugerido la transmisión transplacentaria (30).

En lo referente a babesiasis, existe una observación que podría indicar la infección prenatal con *Babesia bigemina*, con presentación clínica a los 9 días de edad, en el cual se notó una parasitemia del 8% (5).

En un intento por reconocer el efecto de la edad en la resistencia del ganado a *Babesia bovis*, se encontró en vacas adultas una mayor susceptibilidad a infecciones experimentales que en becerros (84).

Se han logrado observaciones interesantes como ha sido el secuestro de eritrocitos parasitados, en las adrenales en becerros Holstein Friesian inculados experimentalmente con *Babesia bovis* (26).

La transmisión in utero de babesia no se ha logrado inducir, se ha intentado inculando *Babesia argentina* (sinonim. *B. bovis*) a vacas preñadas; sin embargo, en ese estudio se notó que los becerros de madres no inculadas fueron severamente afectados al ser mantenidos en áreas endémicas. Esto demuestra el papel relevante de la inmunidad (36).

C. HIPOTESIS.

El suministro de calostro con anticuerpos específicos contra *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. en becerros recién nacidos, induce una protección efectiva durante los primeros meses de edad.

D. OBJETIVOS.

1- Determinar la relación existente entre la ingestión de calostro con anticuerpos anti-*Anaplasma marginale*, anti-*Babesia* spp., y la procedencia de los becerros con la presentación de casos de anaplasmosis y/o babesiosis, en una explotación localizada en el trópico.

2- Estudiar el comportamiento de los títulos de anticuerpos, anti-*Anaplasma marginale* y anti-*Babesia* spp. en becerros durante los primeros seis meses de vida.

II. MATERIAL Y METODOS.

El desarrollo de algunas pruebas de laboratorio se llevó a cabo en las instalaciones del Proyecto de Hemoprotozoarios del Centro de Investigaciones Veterinarias del antiguo Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP) de la SARH; dicho centro está ubicado en el km 15.5 de la carretera México-Toluca, en Cuajimalpa, D.F., con una altura de 2240 msnm, con una temperatura promedio de 16 C, en un clima templado (80). También se efectuaron otras pruebas en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Virología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., en México, D.F.

Los ensayos con animales experimentales en condiciones de campo, se hicieron en el Campo Experimental (CE) "La Posta" de Paso del Toro, Veracruz, también perteneciente al INIP.

A. Determinación de indicadores epidemiológicos.

A.1 C.E. La Posta.

A.1.1 Localización.

La situación geográfica es: 15 50' latitud norte y 96 10' longitud Oeste, la altura es de 12 msnm. El clima de la región según Köppen es tropical subhúmedo, tipo Aw con temperatura media de 26.1 C, humedad relativa de 80.7 % y precipitación anual de 1321 mm (80).

A.1.2 Composición del hato.

El hato del CE La Posta está conformado por 267 bovinos de las razas: Holstein Friesian, Suizo Pardo y las cruces Holstein Friesian X Cebu y Suizo Pardo X Cebu. Todos estos al agruparse por edades eran: 6 menores de 3 meses, 8 de 3-6 meses, 87 de 6-12 meses y 167 mayores de 12 meses de edad.

A.1.3 Manejo.

El manejo de los animales en el campo comprende: Al nacimiento la desinfección del ombligo con solución yodada al 5%. El alojamiento es en corraletas individuales de 1.15 mts.

cuadrados de superficie, previamente desinfectadas con un lechado de Hidróxido de Calcio (cal apagada). La corraleta está provista de una cama de aserrín y equipada con comedero para concentrado y con bebedero.

Cada becerro fue alimentado diariamente con 4 lts de leche entera de vaca, divididos en 2 tomas, una por la mañana y otra por la tarde mediante el uso de un biberón o de una cubeta. A partir de la primera semana se les ofreció concentrado iniciador, y heno de pasto.

A la tercera semana se les identificó con tatuaje y con arete, al mismo tiempo se hizo el descornado aplicando una pomada que contiene hidróxido de sodio.

El destete o suspensión del suministro de leche, se hizo a los 60 días de edad; en este momento se cambiaron a corrales colectivos, agrupados en número máximo de 10 animales de peso semejante. En estos grupo se alimentaban con 2 kg de concentrado con 18% de proteína cruda en base seca, que incluyó 0.5% de sal mineralizada y forraje verde de corte a libertad.

Al cumplir los 5 meses de edad se llevaron a un potrero de zacate Estrella de Africa (*Cynodon plectostachius*) que se complementó con 2kg de concentrado diariamente.

A.2 Pruebas serológicas.

A.2.1 *Anaplasma marginale*. Se efectuó la prueba de fijación de complemento (FC) para la detección de anticuerpos anti-*A. marginale* (Apéndice 1) utilizando la técnica de microplaca descrita por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (85). El antígeno empleado fue proporcionado por el USDA, Servicios Nacionales Veterinarios de Ames, Iowa, EE.UU.A., a una dilución de 1:40. El complemento se obtuvo de suero normal de cuye, diluido de acuerdo a su previa titulación. La hemolisina fue de tipo comercial (Cappel Lab. Cochranville, PA. E.U.A.). Los eritrocitos de carnero fueron extraídos de un donador específico y se estandarizaron al 2% por espectrofotometría. Los sueros estándar positivos y negativos se obtuvieron del banco de sueros del Proyecto Hemoprotozoarios. En este estudio se consideró como suero positivo aquel que producía 25% de hemólisis.

A.2.2 *Babesia* spp. Se realizó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (Apéndice 2), el procedimiento seguido fue una modificación al descrito por Goldman, Pipano y Rosenberg (1972) (33). En este, el antígeno se obtuvo en el Proyecto Hemoprotozoarios del INIP, a partir del cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* con un porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) de 10%. El cultivo se desarrolló de acuerdo con las condiciones descritas por Figueroa et al (29), y Vega et al (86).

A.3 Prevalencia.

Se colectaron sueros correspondientes al total de la población de bovinos existentes en el C.E., para ello se extrajeron 10 ml de sangre de la vena caudal a cada uno de los animales, lo cual se hizo asépticamente empleando equipo Vacutainer (Becton y Dickinson de México). El suero obtenido fue mantenido a -20 C hasta su uso. Se determinaron las prevalencias de anticuerpos anti-Anaplasma marginale mediante la prueba de Fijación de Complemento (FC), y mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) se determinaron los reactores positivos a anticuerpos anti-Babesia spp.; estos indicadores se obtuvieron de la expresión:

Prevalencia= No. de reactores positivos en una población, en un punto de tiempo entre el No. de animales de esa población en el mismo punto de tiempo (71).

A.4 Probabilidad diaria de infección.

El muestreo serológico y la recopilación de información sobre el ganado existente en el CEP La Posta, permitió determinar la probabilidad diaria de infección para *Babesia spp* según Mahoney y Ross (1972) (52). Para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$I = 1 - e^{-ht}$$

En donde:

I = Porcentaje de animales infectados.

e = Base del logaritmo natural.

h = Tasa de inoculación o probabilidad diaria.

t = Edad de los animales (expresado en días).

Por lo que al despejar, se obtuvo:

$$h = -\log_e (1 - I) / t$$

B. Identificación de Hembras Donadoras de Calostro.

B.1 Localización.

La identificación de las vacas donadoras de calostro se hizo en dos establos lecheros, uno localizado en Paso del Toro, Edo. de Veracruz por lo que se identificó como trópico; el otro se localizo en Tizayuca, Edo. de Hidalgo y se designó como altiplano.

B.1.1 Altiplano. Las vacas de esta región eran de raza pura, Holstein Friesian, con edad promedio de 4 años. El manejo de estos animales incluyo estabulación permanente y ordeño mecánico.

B.1.2 Trópico. Las vacas de esta región eran de las cruces Holstein Friesian X Cebu y Suizo Pardo X Cebu; la edad promedio fue de 3.5 años. El manejo al que se encontraban sometidas fue pastoreo rotacional, con suplementación y con ordeño mecánico de tipo portátil.

B.2 Esquema de muestreo y selección de donadoras.

B.2.1 Altiplano. Para reconocer a las vacas que podrían ser donadoras de calostro sin anticuerpos específicos contra *Anaplasma marginale* ni contra *Babesia* spp., se ejecutó un muestreo que comprendió la selección de 30 vacas con un mes antes de la fecha probable de parto. A cada una se le extrajeron 10 ml de sangre de la vena caudal, para obtener suero y ejecutar las pruebas de FC e IFI (Apéndices 1, 2).

B.2.2 Trópico. De esta región se hizo una selección a partir de los registros de las vacas próximas al parto, pero que fueran rectoras serológicas positivas a la presencia de anticuerpos anti-*A. marginale* y anti-*Babesia* spp. mediante las pruebas de FC e IFI (Apéndices 1, 2).

B.3 Recolección de calostros.

Al posparto las vacas seleccionadas fueron ordeñadas manualmente, colectando únicamente el primer calostro. Se formaron dos mezclas, una con calostro de las vacas posiblemente negativas localizadas en Tizayuca, Hgo. (-) y la otra con calostro positivo (+) de las vacas localizadas en Paso del Toro, Ver.. El calostro mezclado se dividió en alícuotas, se

identificó como (+) y (-), y fué mantenido en congelación a -20 C hasta su uso.

C. Ensayos sobre la caracterización inmunológica del calostro.

C.1 Pruebas Generales.

Estos incluyeron Electroforesis y Turbidez con Sulfato de Zinc. La primera de estas, se realizó con el objeto de conocer la proporción de las proteínas del suero en el calostro; es decir, albúmina, alfa, beta y gammaglobulinas. El esquema fué de acuerdo con el procedimiento descrito por Arriaga y Ruiz (3) (Apéndice 3). La prueba de turbidez con Sulfato de Zinc tuvo como objeto determinar la concentración de gammaglobulinas en el suero del calostro; el procedimiento realizado fué el descrito por Arvea, 1973 (4) (Apéndice 4). La concentración de proteína se efectuó como lo describe Ruiz (66) (Apéndice 5). El calostro con anticuerpos anti-*A. marginale* y anti-*Babesia* spp. se designó como (+), y aquel sin ese tipo de anticuerpos se designó como (-).

C.2 Pruebas específicas.

Estos ensayos se efectuaron para determinar la ausencia o presencia de anticuerpos anti-A. marginale y anti-Babesia spp. en las 2 mezclas de calostro previamente procesadas. Las pruebas fueron el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) y la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) .

La prueba ELISA se utilizó para determinar la presencia de anticuerpos anti-A. marginale. El procedimiento fue como lo describe Tello et al (81), (Apendice 6) modificación de la técnica instrumentada por Saunders (67).

La técnica de IFI fue seleccionada debido a que posee grados de sensibilidad y especificidad superiores al 90% (33), el procedimiento fue el descrito en el apéndice 2.

D. Caracterización de perfiles e indicadores biológicos en becerros

D.1 Diseño.

D.1.1 Obtención de becerros.

Los becerros se seleccionaron de la zona tropical y del

altiplano; eran de raza Holstein Friesian y fueron obtenidos al momento del nacimiento.

Cada grupo se identificó dependiendo de la procedencia de los becerros y del tipo de calostro que se les suministró: Procedencia Veracruz, Veracruz (Trópico) se designó como T, y de Tizayuca, Hidalgo (Altiplano) se designó como A.

De esta manera los becerros conseguidos se integraron en 4 grupos:

P R O C E D E N C I A C A L O S T R O C O N
G R U P O T r ó p i c o (T) A l t i p l a n o (A) A N T I C U E R P O S *

I	T	+
II	A	+
III	T	-
IV	A	-

* Anticuerpos: anti-Anaplasma marginale y -
 y anti-Babesia spp.

D.1.2 Diseño experimental.

En este trabajo se aplicó un diseño en bloques aleatorizados, cada bloque correspondió a los diferentes tiempos en que se registraban las observaciones y los tratamientos constituyeron un acomodamiento factorial de 2×2 , siendo los factores la procedencia y tipo de calostro con 2 niveles cada uno de ellos, A, T y +, - respectivamente. Los procedimientos se hicieron según los lineamientos de Sokal (74).

D.1.3 Distribución en grupos.

La asignación de los becerros a los diferentes tratamientos se hizo al azar. El calostro que correspondía a cada becerro, fué descongelado a temperatura ambiente y se suministraron 250 ml en una sola ocasión, en un periodo no mayor de 15 hrs posnacimiento. Inmediatamente fueron trasladados al Campo Experimental, excepto un becerro que fué llevado a los 7 días de edad. Una vez ingresados al campo, se sometieron al programa de producción propio de la crianza de becerros que ahí se efectúa (1, 60).

D.2 Indicadores clínicos.

Estos comprendieron los registros diarios de temperatura rectal, frecuencias cardíaca y respiratoria. Los registros se hicieron de las 24 hrs a los 180 días de edad con intervalos de 30 días; el estudio estadístico de estas observaciones fue mediante un análisis de varianza, según los lineamientos de Sokal (1979) (74).

D.3 Indicadores hematológicos.

Para determinar estos parámetros, se efectuó un muestreo que consistió en la extracción de 10 ml de sangre con heparina como anticoagulante; las pruebas de hematología se realizaron semanalmente. Cuando se observaron alteraciones que sugirieran la presentación clínica de anaplasmosis y/o babesiosis entonces las pruebas se efectuaron diariamente.

La hematología incluyó; conteo de glóbulos rojos (10^6 /ul), conteo de glóbulos blancos (10^6 /ul) y microhematocrito (%). Las técnicas fueron ejecutadas conforme a lo descrito por Bentinck-Smith (8). La revisión de fróntis sanguíneos y la determinación del porcentaje de parasitemia (PEP), se realizaron diariamente cuando hubo signos clínicos alterados, sugestivos de anaplasmosis y/o babesiosis en alguno de los becerros.

D.4 Indicadores serológicos.

Para realizar los ensayos requeridos a cada becerro se le extrajeron 10 ml de sangre sin anticoagulante, este procedimiento fue previo al suministro de calostro. El muestreo se repitió a las 24 hrs posingestión del calostro y más adelante cada 30 días. Las pruebas serológicas que se efectuaron dependieron de la edad de los becerros:

D.4.1 De 0-24 hrs.

De los becerros de esta edad se obtuvieron dos muestras de suero una preingestión de calostro y el segundo posingestión a las 24 hrs. Se realizaron las técnicas de electroforesis (Apéndice 3); precipitación de las inmunoglobulinas con Sulfato de Zinc (Apéndice 4), ésta fue para reconocer el nivel de inmunoglobulinas en el suero de los becerros una vez que habían ingerido calostro.

También se efectuaron pruebas específicas para determinar la presencia de anticuerpos contra *A. marginale* para lo cual se ejecutaron las siguientes pruebas: Aglutinación en Tarjeta (PATA) (Apéndice 5) según procedimiento descrito por Amerault y Roby (1968) (2), modificado por Ramos et al (63), esta prueba se incluyó como adicional conociendo su alta concordancia con la

prueba de ELISA en zonas de alta prevalencia, cercana al 90% (63). Además se desarrollaron la prueba de Fijación de Complemento (Apéndice 1), y la prueba de ELISA (Apéndice 4), el esquema de esta última se hizo de acuerdo a lo descrito por Tello et al (81), modificación del procedimiento previamente descrito por Saunders (67).

Por otra parte para la detección de anticuerpos contra *Babesia spp.* se realizó la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (Apéndice 2).

D.4.2 De 1-180 días de edad.

Para conformar la curva de anticuerpos y detectar seroconversión que indicara la exposición con intervalos de 30 días. Con los sueros de los becerros de esta edad, primero se hizo un escrutinio para seleccionar a los reactores positivos en las diferentes pruebas, y posteriormente se titularon mediante diluciones seriadas. Las diluciones iniciales de las pruebas serológicas fueron: en la prueba de PATA el suero se empleo sin diluir; en la prueba de FC se trabajó con la dilución 1:5; en las pruebas de ELISA e IFI las diluciones iniciales fueron 1:60.

III. RESULTADOS.

A. Indicadores epidemiológicos en el C.E. La Posta.

A.1 Prevalencia en el C.E.

Del muestreo realizado en esta explotación se determinaron las prevalencias de anaplasmosis y babesiosis, este indicador se determinó en el mes de abril.

La prevalencia de bovinos reactivos a la presencia de anticuerpos anti-A. marginale fué de 81.1%.

La prevalencia de reactivos positivos a la presencia de anticuerpos anti-Babesia spp. fué 82.0%; en ambos casos se consideró a la población total de bovinos existentes en el campo, lo que incluyó todas las etapas reproductivas.

A.2 Tasa o probabilidad diaria de infección (PDI).

Este indicador se determinó para la población completa y para los becerros de hasta 9 meses de edad, obteniéndose 0.0100 y 0.019 respectivamente.

B. Vacas donadoras de calostro en Hidalgo y en Veracruz.

Del establo lechero localizado en Tizayuca, Hgo. fueron seleccionadas 4 vacas, las cuales mostraron ausencia de anticuerpos específicos contra *A. marginale* y contra *Babesia* spp.

Del C.E.P. La Posta de Paso del Toro, Edo. de Ver. fueron seleccionadas 6 vacas, en las cuales se demostró la presencia de anticuerpos contra *A. marginale* y contra *Babesia* spp. Los títulos detectados fueron a la dilución 1:80 mediante las pruebas de FC para anaplasma; notándose respuesta a la misma dilución mediante IFI para babesia. La distribución de las vacas donadoras de calostro se resume en el cuadro 4.

C. Caracterización del calostro.

C.1 Pruebas generales

Al realizar la electroforesis en la mezcla de calostros (+) que contenía anticuerpos contra *A. marginale* y contra *Babesia* spp., el total de proteínas séricas fue de 4.82 g/100 ml. En la mezcla de calostro que no contenía esos tipos de anticuerpos, el total de proteínas séricas fue de 4.58 g/100 ml. La cantidad o proporción mayor de globulinas se obtuvo en el calostro de las

vacas de Veracruz (Cuadro 5).

Mediante la prueba de Turbidez con Sulfato de Zinc se encontraron 25.7 unidades de turbidez (UTSZ) en el calostro del altiplano; mientras que en el calostro del trópico fueron 26.9 UTSZ (Cuadro 5).

C.2 Pruebas específicas.

C.2.1 Anaplasma marginale.

Para identificar la presencia de anticuerpos anti-A. marginale se ejecutó la prueba de ELISA. En la mezcla de calostro de las vacas localizadas en Veracruz (+) se encontró reacción positiva en la dilución 1:320. Se corroboró la ausencia de los mismos en la mezcla de calostros de las vacas de Hidalgo.

C.2.2 Babesia spp.

Se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. El calostro de las vacas del altiplano fué negativo a la presencia de anticuerpos anti-Babesia spp.; sin embargo en el calostro de las vacas del trópico hubo reacción positiva a la dilución 1:80.

D. Indicadores biológicos en los becerros experimentales.

D.1 Distribución de los becerros. Se utilizaron en total 15 becerros de la raza Holstein Friesian, 10 de los cuales procedían de una explotación lechera localizada en Veracruz, Ver.; los 5 becerros restantes procedían de un establo localizado en Tizayuca, Hgo. La asignación a los diferentes grupos quedó de la siguiente manera:

Distribución de los becerros en los grupos o tratamientos.

Calostro	Procedencia de los Becerros		Total
	Tropico (T)	Altiplano (A)	
(+)	6	2	8
(-)	4	3	7
Total	10	5	15

Calostro con (+) o sin (-) anticuerpos anti-A. marginal y anti-Babesia spp.

D.2 Indicadores clínicos.

Las observaciones correspondientes a los registros de frecuencias cardíacas mostraron una diferencia moderada entre

los grupos de becerros. Las medias fueron para el grupo T+ 81 latidos/min., para el A+ 105, para el T- 88 y para el A- fueron 100 latidos/min. (Cuadro No. 6).

De la misma manera las medias de las frecuencias respiratorias tampoco mostraron cambios importantes, los valores medios fueron 47, 53, 50 y 51 respiraciones/min. para los grupos T+, A+, T- y A- respectivamente (Cuadro No. 7).

En relación a la temperatura rectal, se observaron valores similares en los becerros de los 4 tratamientos. Las medias fueron 39.0 C para los de los grupos T+ y A+. En los grupos restantes T- y A- las medias fueron 38.9 y 39.2 C respectivamente (Cuadro No. 8).

D.3 Hematología.

Los conteos de glóbulos rojos (GR) promediados por cada 30 días de estudio, permitieron notar inicialmente un mayor número de GR/ul en los animales que procedían del altiplano en comparación los del trópico. En el primer día, el número mínimo correspondió al grupo T+ con 4.627 millones de GR/ul, y el mayor conteo se encontró en el grupo A+ con 8.750 millones de GR/ul. En el periodo de 90-120 días, los conteos fueron similares entre los 4 grupos; encontrándose a los 120 días el conteo más alto en el grupo A- y el menor en el grupo T- con 7.150 y 5.01 millones de GR/ul respectivamente. Al finalizar el estudio el conteo más alto fué del grupo A- y el más bajo del grupo T+ con 6.647 y 4.223 millones de GR/ul. Las medias de cada grupo fueron: T+ 5.023; A+ 7.470; T- 6.057, y el A- 7.461 millones de GR/ul. (Cuadro 9).

En el hematocrito (Ht) se observó una situación análoga a la anterior; el valor medio inicial fué mayor en un grupo procedente del altiplano, correspondió al grupo A+ (38%) y los menores fueron de los grupos T+ y A- ambos con 28%; el grupo T- tuvo un valor intermedio de 30%. En los 4 grupos los valores

del Ht disminuyeron a lo largo del estudio; finalmente a los 180 días se igualaron los porcentajes entre los grupos T+ y A- con 22%, y entre los grupos A+, T- con 19%. Las medias generales mostraron mayores porcentajes entre los becerros de altiplano (A+ 33%, A- 28%), que los de los del trópico (T+ 26%, T- 24%) (Cuadro No. 10).

Del total de animales experimentales únicamente un becerro presentó la forma clínica de enfermedad. Esto ocurrió al día 114 de edad en un becerro cuya procedencia fué el trópico, el cual había ingerido calostro sin anticuerpos (T -). El animal presentó decremento en el hematocrito a un mínimo de 13%, la temperatura rectal tuvo un valor máximo de 40.5 C, a la auscultación hubo atonía ruminal, constipación y palidez de las mucosas ocular y bucal. El diagnóstico confirmativo del agente causal fué mediante la elaboración de frotis de sangre periférica, teñido con Geimsa; esto permitió la identificación de *Babesia bigemina*, la parasitemia alcanzada fue de 0.5%. El tratamiento aplicado fue Diaceturato de 4,4-diazoaminodibenzamidina (Squibb de México), del cual se administraron .250 g por vía intramuscular como dosis única.

En los conteos de glóbulos blancos (GB) se encontró que durante los primeros 30 días se rebasaron los 10 mil GB/uI en los grupos A+ y A-. En el periodo de 90 días hubo un incremento

en los grupos T+, A+ y T- en cuentas superiores a los 12 mil GB/ul, el grupo A- se mantuvo con un conteo medio de 7750 GB/ul. A los 120 días el único grupo que aumentó fue el T-, alcanzando 14631 GB/ul; en el periodo de los 150-180 días se homogeneizaron los 4 grupos. La media general fue de 10714 para el T+, 10136 para el A+, 11356 para el T- y de 9243 para el A- (Cuadro 11). Las medias generales se notaron mayores en los grupos T que en los grupos A.

D.4 Serología.

D.4.1 Becerros de 0-24 hrs de edad.

Considerando a los 4 grupos formados antes de la ingestión de calostro se observaron, mediante la prueba de turbidez con Sulfato de Zinc, 3.8, 4.3, 4.1 y 3.5 UTSZ para los grupos T+, A+, T- y A- respectivamente. Mientras que a las 24 hrs posingestión del calostro las UTSZ fueron 23.1, 19.9, 17.2 y 19.8 UTSZ en el mismo orden de modo que los valores fueron mayores en los grupos (+) que en los grupos (-) (Cuadro 12).

Con ninguna de las diferentes pruebas empleadas para la detección de anticuerpos anti-Anaplasma marginale y anti-Babesia spp. (PATA, FC, ELISA, IFI) hubo reactores positivos antes de recibir calostro.

A las 24 hrs postingestión del calostro se detectaron anticuerpos anti-A. marginales mediante las pruebas de PATA y ELISA; esto ocurrió en los becerros del grupo T+; es decir, en los que procedían del trópico y que habían recibido calostro con anticuerpos, en los grupos A+, T- y A- la respuesta fue negativa (Cuadro No.13).

Por otro lado, con la prueba de IFI no se observó ningún reactor positivo a las 24 hrs postingestión del calostro (Cuadro 14).

D.4.2 Becerros de 1-180 días.

ELISA.

Los becerros del grupo T+ en los primeros 30 días fueron positivos, el título mínimo fué de 1:320 y el máximo de 1:5120. La media aritmética general de este grupo fué de 1:999, la geométrica fué de 2.636 (Cuadro 15).

En el grupo A+ hasta el lapso de 60-90 días en uno de los becerros se detectaron anticuerpos anti-A. marginales a la dilución 1:80; posteriormente en el periodo de los 150-180 días se observaron resultados positivos en los dos animales. La media aritmética fué de 1:257 y la geométrica de 1.299 (Cuadro 16).

Un becerro del grupo T- en el periodo de 30-60 días apareció positivo, en los siguientes 30 días apareció otro reactor positivo; al siguiente periodo de 30 días hubo otro reactor positivo. El cuarto animal identificado como 3-4 murió, el diagnóstico clínico e histopatológico fué neumonía. Las medias generales de este grupo fueron 1:342 y 1.703, aritmética y geométrica respectivamente (Cuadro 17).

Entre los becerros del grupo A- hubo un reactor positivo hasta los 90-120 días; mostrándose positivos los 3 animales de este grupo entre los 150-180 días del estudio. Las medias generales fueron 1:706 y 1.49 (Cuadro 18).

Conjuntando las medias geométricas de los 4 grupos, los valores mas altos correspondieron al grupo T+ desde el inicio del estudio; alcanzando en el periodo de 150-180 días un título de 3.092 (antilog 1:1230). En los grupos T- y A- las medias consideradas positivas se encontraron a los 90-120 días. Mientras que en el grupo A+ la media positiva se observó a los 180 días (Cuadro 19).

Al revisar los títulos en sus valores medios absolutos, esto es sin transformar; desde las 24 hrs posingestión de calostro hasta los 60 días, únicamente en el grupo T+ hubo reactores positivos alcanzando la dilución 1:1333. Hasta los 180 días la totalidad de los grupos se presentaron como reactores positivos (Cuadro No. 20).

Prueba de Aglutinación en Tarjeta (PATA).

Mediante esta prueba se notó que solo en el grupo T+ hubo reactores positivos en el lapso comprendido de 0-90 días. El grupo A+ se mantuvo con respuesta negativa del nacimiento a los

120 días de edad de los becerros. En el lapso de los 120-150 días en los 4 grupos se detectaron reactores positivos. Finalmente no se detectó como positivos a la totalidad de los animales de los diferentes grupos; de tal manera que permanecieron seronegativos 2 becerros uno en el grupo A+ y otro en el grupo T- (Cuadro No.21).

Prueba de fijación de complemento (FC).

A los 30 días de edad por medio de la prueba de FC se detectaron solo 3 becerros positivos a anticuerpos anti-A. marginales, 1 del grupo A+ y 2 del grupo T+. Hasta los 120 días, en los 4 grupos, al menos un becerro fue reactor positivo. A los 150 días todos los becerros fueron seropositivos excepto uno en el grupo T+. A los 180 días todos fueron seropositivos (Cuadro 22).

Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Con el uso de esta prueba se demostró la presencia de anticuerpos anti-Babesia spp. hasta los 90 días en 2 becerros, 1 del grupo T+ y otro del A+. A los 150 días había reactores positivos en los 4 grupos, y a los 180 fueron seropositivos los becerros de los grupos T+ y A+, no seroconvirtiendo 2 becerros uno del grupo T- y otro del A- (Cuadro 23).

IV. DISCUSION.

En este estudio se pudieron observar diferencias en el comportamiento inmunológico de becerros con diferentes procedencias (Altiplano y Trópico), que recibieron calostro con o sin anticuerpos anti-*A. marginale* y anti-*Babesia* spp. Las primeras observaciones fueron las elevadas prevalencias de reactores positivos a la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* y contra *Babesia* spp, con 81.1 y 82.0% respectivamente; lo cual coincide con estudios efectuados en explotaciones localizadas en regiones tropicales y subtropicales, en donde se han registrado prevalencias de anticuerpos anti-*A. marginale* hasta de 85% como ha ocurrido en Vega de Alatorre, Veracruz y hasta de 96.15% de reactores positivos a la presencia de anticuerpos anti-*Babesia* spp en regiones como San Jose Acateno, Puebla (1). Las tasas indicadas coinciden también con lo observado por Ramos et al (63), quienes encontraron una prevalencia de reactores a la presencia de anticuerpos anti-*Anaplasma marginale* de 86.7% en Paso del Toro, Veracruz.

La probabilidad diaria de infección con *Babesia* spp., tanto para la población completa como para el parámetro ajustado a los 9 meses de edad, ubicaban al hato del Campo Experimental La

Posta, fuera de la zona de máximo riesgo de brote; basado en las tasas de inoculación comprendidas entre 0.0005-0.005 (Gráfica I), según Mahoney, 1972 (52). Bajo condiciones de trópico se ha considerado ese ajuste porque se considera que entre el 12-75% de los becerros aparecen infectados antes de los 9 meses de edad; debiendo considerar a la tasa de inoculación, como una expresión de la probabilidad diaria de que un animal sea mordido por una garrapata infectada (51). De manera que en el ambiente endémico, la *Babesia* persiste porque siempre hay garrapatas que reemplazan a cada generación de organismos infectados, con la sucesión de al menos uno del mismo tamaño (52). Con estas observaciones se puede inferir que existe una estabilidad en el Campo Experimental; Hall en 1960 (36), mencionó que los becerros reciben una infección inicial en el periodo de alta resistencia a la enfermedad clínica, que perdura hasta los 9 meses de edad. Si consideramos que los animales de 180 días estaban positivos el 85% (Cuadro 23), esto resulta indicativo de exposición al agente y coincide con una zona de bajo riesgo de brote. Sin embargo, es necesario reconocer si este proceso presenta variaciones estacionales para la posible predicción de brotes.

De acuerdo con lo anterior en este estudio, se encontró que durante los primeros 60 días los becerros experimentales al ser considerados como hato, mostraron tasas de inoculación con valores inferiores a .0005 lo que los ubicaban fuera de la zona

de máximo riesgo de brote, mientras que en los dos siguiente periodos del estudio (90-120 días) las tasas de inoculación aumentaron a .002 y .003 respectivamente; lo cual significó epidemiológicamente una posible condición de brote en el mes de octubre, y coincidió con la presentación del único caso clínico de babesiosis en un becerro del grupo T- al día 114. Esto último pudo ser una respuesta individual de susceptibilidad al agente. A partir del periodo de los 150 días de estudio las tasas fueron de .007 y .01 con lo que el hato de becerros se definió como fuera de la zona de máximo riesgo de brote de acuerdo con la gráfica de predicción propuesta por Mahoney en 1972 (52). De todo esto lo interesante fue el hecho de encontrar que las tasas de inoculación que ubican al hato fuera de la zona de máximo riesgo, se alcanzaron desde los 5 meses (Gráfica 1), lo cual sugiere que en zonas endémicas de babesiosis de México, no es necesario ajustar la predicción a los 7 meses de edad, porque la mayor proporción de becerros seropositivos se encontró antes de los 9 meses, presentandose 1 caso clínico de la enfermedad en dicho periodo

De acuerdo con los resultados obtenidos, los valores de proteínas en los sueros de calostros de Hidalgo (-) y de Veracruz (+), comparados con los valores normales de proteínas totales del suero de vaca normal fueron aceptables (4.58 y 4.82 vs 6.91 g/100ml). Las diferencias fueron más notorias en las

concentraciones relativas, debido a que la albúmina presentó valores menores en los calostros que en el suero de la vaca normal (12.2 y 3.7 vs 46.5%). Entre las globulinas destacaron las concentraciones relativas más elevadas de gammaglobulinas en los 2 tipos de calostro que en el suero de vaca normal (46.7 y 47.5 vs 26.4%) (69) (Cuadro 24). Está bien establecido que cuando los niveles de gammaglobulinas son los apropiados en el calostro, lo importante para los becerros la ingestión de este a tiempo y en cantidades adecuados (12, 61). El nivel aceptable de gammaglobulinas pudo notarse con la observación clínica de los becerros, los cuales no mostraron enfermedades de tipo neumo-enterico severas durante los primeros días de vida. Queda entendido que tanto en Hidalgo como en Veracruz, la proporción de gammaglobulinas es igual.

Al realizar la prueba de turbidez con Sulfato de Zinc, los resultados en los calostros de Hidalgo (-) y de Veracruz (+) (25.7 y 26.9 UTSZ) respectivamente, mostrando una variación moderada en relación con las 30 UTSZ señaladas como parámetro óptimo (4). Sobre lo cual se ha sugerido que altos valores de UTSZ están asociados con la resistencia a enfermedades, por ejemplo en la prevención de septicemia por *Escherichia coli* en donde se ha demostrado tal efecto (28, 46). En el caso de *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. se desconoce tal relación y en este estudio se sugiere profundizar en el tema, debido a que

las observaciones se registraron en solamente dos tipos de calostros, y limitan inferir sobre los niveles de inmunoglobulinas expresadas en UTSZ y la resistencia a anaplasmosis y babesiosis bovina.

En los becerros experimentales las medias de las frecuencias cardiacas para los 4 tratamientos se ubicaron dentro de lo normal que es de 103 latidos por minuto (23). Excepto el grupo A+ que mostró una media ligeramente mayor (108 latidos) (Cuadro 6). La homogeneidad de este parámetro entre los becerros empleados, no mostró un periodo de adaptación aparente, especialmente en los procedentes del altiplano (Gráfica 2); los cuales ingresaron a un ambiente en el que normalmente no se mantiene a este tipo de ganado.

Las medias de las frecuencias respiratorias de los 4 grupos se encontraron entre 47-53 respiraciones por minuto, resultados similares se obtuvieron en estudios realizados con ganado Holstein Friesian criado en el trópico en el que se registró como normales 53 respiraciones por minuto (20, 55); en otro estudio empleando el mismo tipo de ganado, pero introducido al trópico se observaron registros de 53-60 respiraciones por minuto (40); aunque también se ha mencionado como normal un rango de 85-103 respiraciones por minuto (23).

Los registros menores, tanto de la frecuencia cardiaca como respiratoria, pueden deberse a la altitud en que se localiza el CE La Posta que es de apenas 12 msnm; mientras que el rango señalado corresponde a estudios en bovinos localizados en regiones templadas o frías generalmente localizadas en altitudes mayores. Considerando que el estudio duró varios meses, los valores obtenidos se clasificaron dentro de los valores normales. De modo que estos parámetros no evidenciaron la presentación clínica de anaplasmosis y/o babesiosis en los becerros

La temperatura rectal fué un parámetro que tampoco mostró cambios aparentes entre grupos durante el desarrollo del estudio (Gráfica 3), los registros medios tuvieron un mínimo de 38.9 y un máximo de 39.2 C; lo cual coincide con el rango aceptado como normal de 38.0-39.5 C (23). Notándose en los valores registrados una tendencia a acercarse al límite superior del rango normal; esto se relaciona con la temperatura ambiental y humedad relativa del clima tropical subhúmedo. Esto último se ha demostrado con ganado Holstein Friesian criado e introducido al trópico, con lo cual se obtuvieron registros de 38.5-39.2 C (20, 40, 55).

En los parámetros antes mencionados se incluye al becerro del grupo T-, que clínicamente mostró babesiosis, confirmada

por la identificación del agente en frótis teñido con Giemsa. De estas observaciones, se deduce que los becerros no tuvieron un periodo de adaptación aparente a las condiciones climatológicas; esto se desprende del hecho de que entre los registros iniciales y subsecuentes hubo una moderada tendencia a su disminución, pero sin mostrar diferencias entre grupos.

El haber detectado un caso clínico con *Babesia bigemina*, el cual cedió con un solo tratamiento puede indicar la menor severidad que tiene la babesiosis en los animales jóvenes (36, 37, 48). Aunque es sabido que no es fácil separar el efecto de factores inmunológicos específicos, y no específicos (45). En este estudio aparentemente fué la susceptibilidad individual el factor más importante, que determinó la afección sintomática con *Babesia bigemina*; por otro lado, vale la pena notar que el animal pertenecía al grupo T-, teóricamente no había recibido anticuerpos, circunstancia que se asocia a la presentación de la enfermedad.

En las pruebas de hematología realizadas, los conteos promedio de glóbulos rojos se localizaron entre $5.023-7.470 \times 10^6$ GR/ul, lo que indica que de acuerdo con el rango de $6-8 \times 10^6$ GR/ul indica que son normales (69); aunque durante el estudio los grupos de becerros procedentes del altiplano mostraron los conteos más elevados (Gráfica 4). Algunos promedios mensuales

fueron inferiores al rango normal, esto puede deberse a que los estudios sobre parámetros sanguíneos, generalmente, se han efectuado en bovino de explotaciones localizadas en regiones templadas con mayor altura snm y con ganado adulto.

En el hematocrito los valores medios observados se notaron entre 24-33%, de modo que únicamente el grupo A+ se ubicó dentro del rango normal, los demás fueron ligeramente inferiores (Gráfica 5). El rango normal se considera de 30-36% (69), esa disminución observada no necesariamente indica infección subclínica de Anaplasma o Babesia; sino que puede ser debida a influencia de la altitud, puesto que en regiones elevadas se estimula la eritropoyesis, que incluye aumento en el número de eritrocitos y del hematocrito (69). Mientras que los valores normales corresponden a animales mantenidos en regiones templadas o frías, por lo cual los parámetros se muestran más elevados que los registrados en este trabajo. Es importante tener presente que no se puede determinar si los valores obtenidos de animales adultos sean significativamente diferentes a los de los becerros.

En cuanto a los conteos de glóbulos blancos (GB), hubo un incremento notorio en el periodo comprendió de los 60-90 días (Gráfica 6); que además fué el tiempo en que los conteos fueron

superiores, en relación con el rango normal de $7-10 \times 10^8$ GB/ul (69). Excepto en el grupo A-, esto generalmente se atribuiría a infecciones subclínicas de tipo neumoentérico, que son comunes en becerros jóvenes. En este estudio se presentó la muerte de un becerro del grupo T-, a los 114 días, al cual se le diagnosticó neumonía.

De las pruebas de tipo general que se realizaron a los becerros; con la prueba de turbidez con sulfato de zinc se encontró que antes de la ingestión de calostro la media fué de 3.565 unidades de turbidez, y el mismo procedimiento a las 24 hrs posingestión de calostro mostró un incremento a 20.0 UTSZ; notándose los niveles más altos en los grupos T+ y A+. Los valores de los becerros observados en este trabajo quedaron entre 17.2-23.1 UTSZ, los cuales de acuerdo con Petrie, (1984) (61) fueron niveles bajos, debido a que en 100 becerros asistidos en la ingestión de calostro observó una concentración media de 27.17 UTSZ, y una correlación positiva ($r=.75$), entre las concentraciones de inmunoglobulinas del suero de calostro y las inmunoglobulinas absorbidas por los becerros.

Este parámetro permitió verificar la transferencia de anticuerpos calostrales a los becerros. Aunque esto no significó diferencia estadística entre grupos ($p > .05$), biológicamente el grupo T+ fué el único aceptable en su nivel.

El suministro de calostro efectuado antes de las 15 hrs posnacimiento se debió a que de acuerdo con Krusse (1970) (44), en ese tiempo existe la máxima concentración de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo; aunque la habilidad para absorber inmunoglobulinas calostrales perdura hasta las 24 hrs según Stott et al (78), y hasta 36 hrs según Devery (21). Mc Coy et al (1970) (49) observaron la posible falta de habilidad fisiológica para absorber inmunoglobulinas calostrales por estados de estrés durante o poco después del nacimiento.

En las pruebas específicas realizadas (PATA, FC, ELISA, IFI), la respuesta negativa de todos los becerros a la presencia de anticuerpos anti-A. marginale y/o anti-Babesia spp. antes de la ingestión de calostro, se debió a que los bovinos al nacer son agammaglobulinémicos, porque no es posible la transferencia de inmunoglobulinas a través de la placenta (14, 15). Como era de esperarse también se comprobó la ausencia de anticuerpos naturales en becerros de raza Holstein Friesian; así como la ausencia de posibles infecciones intrauterinas (89).

Transcurridas 24 hrs posingestión de calostro, los becerros del grupo T+ se encontraron como reactores positivos a la presencia de anticuerpos anti-A. marginale en la prueba de

ELISA, notándose que el título observado en el calostro fue mayor al observado en los becerros posingestión de calostro (1:320 vs 1:80); no obstante esto demuestra el fenómeno de absorción intestinal de las inmunoglobulinas vía de los enterocitos a la circulación (13). La correlación negativa de las pruebas de ELISA y FC a las 24 hrs posingestión de calostro, puede atribuirse a la capacidad de ELISA para detectar inmunoglobulinas de tipo IgG, debido a que el conjugado empleado contenía esa especificidad anti-IgG; a diferencia de FC en la que las IgM son más eficientes en la fijación del complemento por sus características fisico-químicas (17). Además de los altos grados de sensibilidad y especificidad de ELISA (81). Cabe aclarar que posiblemente las IgM no sean tan fácilmente absorbidas por el becerro neonato, como algunos autores lo señalan (13).

Por otra parte, la respuesta de los becerros del grupo A+ contra lo esperado no fué análoga a los del grupo T+, ya que a las 24 hrs de haber ingerido calostro con anticuerpos, no se demostró su presencia mediante las pruebas utilizadas. Esta situación pudo deberse a diferentes factores: la cantidad suministrada de calostro, los 250 ml fueron insuficientes, Stott et al (1979) (78) consideran necesaria la ingestión de 2000 ml de calostro para bovinos Holstein Friesian; aunado a esto el tipo de amamantamiento, Selman et al (1971) (72) determinaron

que becerros alimentados manualmente presentaban menor concentración de globulinas en el suero. Debiendo agregar a todo esto el efecto del traslado de los becerros de su lugar de nacimiento al sitio en que se mantuvieron los 180 días del estudio de campo. Los becerros nacidos en la región tropical tuvieron un traslado con duración menor a 1 hr, mientras que los nacidos en el altiplano sufrieron un traslado prolongado que duró cerca de 10 hrs, el mismo día de su nacimiento. Por otro lado sería muy difícil inferir que pocas cantidades de anticuerpos en el calostro, sean absorbidas más eficientemente.

En general la presencia de anticuerpos contra *A. marginale* mostró una tendencia al incremento de los títulos y de las proporciones de reactores positivos, especialmente en los periodos comprendidos entre 60-90 y 120-150 días. Estos lapsos coincidieron con importantes cambios en el manejo de los becerros que incluyeron: Cesación del suministro de leche a los 60 días; cambio de alojamiento, los becerros de la corraleta individual fueron movidos a una corraleta colectiva (a los 60 días), posteriormente a un potrero a los 150 días, en donde pastoreaban libremente. De tal manera que los becerros a partir del destete, estuvieron plenamente expuestos a los agentes infecciosos existentes o a sus vectores en el campo experimental.

Al realizar en análisis de varianza con las observaciones obtenidas mediante la prueba de ELISA, hubo diferencia significativa ($p < .05$) entre tratamientos o grupos (Apéndice 8). Notándose diferencia del grupo T+ vs los grupos T-, A+ y A- (2.638 vs 1.703, 1.299 y 1.49). Aparentemente no hubo efecto biológico determinante para la presentación de anaplasmosis; por el contrario el único caso clínico fué de babesiosis, y correspondió a un becerro del grupo T-, así la significancia de la procedencia resultó no importante en la presentación de estas enfermedades. Esto puede sugerir una resistencia innata en los primeros meses de vida, Levy, Clabaugh y Ristic (1982) (45) mostraron, empleando como modelo el cultivo in vitro de *Babesia bovis* que la sangre de animales jóvenes contiene factores responsables de su resistencia a babesiosis severa, esto independiente de anticuerpos presentes en el suero; puesto que notaron la inhibición en la multiplicación del parásito. Por su parte, Trueman y Blight (1978) (84) observaron el efecto de la edad sobre la mayor resistencia del ganado joven a la enfermedad clínica por *B. bovis*.

Por su parte Weissman et al (1974) (88) observaron que becerros mantenidos en una zona de baja endemicidad y procedentes de vacas positivas mediante IFI a *Babesia bigemina*, permanecieron negativos hasta los 30 días.

En el presente estudio la asociación entre títulos de anticuerpos y la capacidad protectora de los becerros a la presencia de anaplasmosis y/o babesiosis pareció depender de un buen manejo pero sobre todo de una exposición paulatina a los agentes *A. marginale* y *Babesia* spp.. Previamente Mahoney (1967) (50) no encontró correlación entre protección y títulos de anticuerpos mediante la prueba de FC en *Babesia bovis*.

En suma, con este trabajo se sugiere que la presencia de los agentes causales de la anaplasmosis y babesiosis bovina, pueden mantenerse en explotaciones del trópico y no mostrar sus efectos patógenos en becerros hasta los 6 meses de edad, siempre que los procedimientos de manejo como son la nutrición, alojamiento y las medidas sanitarias sean apropiadas, para que conjuntamente proporcionen la inmunidad específica a los becerros que gradualmente son expuestos a esos agentes.

V. LITERATURA CITADA

- 1 - Alvarez, J.A.: Generalidades sobre manejo de programas en salud animal bajo condiciones de clima tropical. V Simposium sobre ganadería tropical. 2o. Ciclo de conferencias sobre bovinos de doble propósito. Centro de Investigaciones Pecuarias Golfo-Centro, INIFAP-SARH, Veracruz, Ver. (1986).
- 2 - Amerault, T.E. and Roby, T.O.: A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 159: 1828-1834 (1968).
- 3 - Arriaga, de M.C. y Ruiz, N.A.: Técnicas de electroforesis. En: Manual de Inmunología, Ed. por A. Morilla y C.R. Bautista, Ed. Diana. 1a. Ed., Mexico, D.F., pp. 63-71 (1986).
- 4 - Arvea, C.S.: Determinación de los niveles de inmunoglobulinas por el método de sulfato de zinc, en becerros recién nacidos como elemento para formar un criterio en la selección de animales destinados a la crianza. Tesis Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zootec. UNAM, Mexico, D.F. (1973).
- 5 - Atwell, R.B.: Prenatal Babesia bigemina infection in a calf. *Aust. Vet. J.*, 51: 5319 (1975).
- 6 - Barta, O., Barta, V., Ingram, D. and Hubbert, W.: Bactericidal activity of bovine fetal serum against smooth and rough strain of *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.*, 33: 731-740 (1972).
- 7 - Bellanti, J.A.: Immunology. W.B. Saunders Co., Washington, D.C., (1974).
- 8 - Bentinck-Smith, J.: Hematología. En: Patología clínica veterinaria, Ed. por Medway, W., Prier, J.E. y Wilkinson, J.S., UTEHA, México, D.F., pp. 208-251 (1969).
- 9 - Bienvenu, R.J., Hyde, J.M., Young, J.M., Gibson, V.F. and Peery, D.E.: Role of magnesium in brucellicidal activity of bovine serum. *Am. J. Vet. Res.*, 24: 313-316 (1963).
- 10 - Boyd, J.W.: Neonatal diarrhea in calves. *Vet. Rec.*, 95: 310-315 (1974).
- 11 - Brandon, M.R. and Lascelles, A.K.: Relative efficiency of absorption of IgG1, IgG2, IgA and IgM in the newborn calf. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 49: 629-633 (1971).

- 12 - Broom, D.M.: Cow - calf and sow-piglet behaviour in relation to colostrum ingestion. *Ann.Rech.Vet.*, 14(4): 342-348 (1983).
- 13 - Bush, L.J., Mungle, M.B., Corley, L.D. and Adams, G.D.: Factor effecting absorption of immunoglobulins by newborn calves. *J.Dairy Sci.*, 56: 512-517 (1973).
- 14 - Bush, L.J. and Staley, T.E.: Absorption of colostral immunoglobulins in newborn calves. *J.Dairy Sci.*, 63: 672-680 (1980).
- 15 - Butler, J.E.: A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. *The ruminant immune system. Advances in Experimental Medicine and Biology.*, (Plenum Press, New York 1981).
- 16 - Caldwell, J.L.: Antigen-antibody reactions. In: *Basic and Clinical Immunology*, Ed. by Hugh Fudenberg, et al, 3th ed. Lange Medical Publications, Los Altos California, pp. 53-63 (1980).
- 17 - Cooper, R.N.: The complement system. In: *Basic and clinical Immunology*, Ed. by Hugh Fudenberg, et al. , Lange Medical Publications, 3rd ed. Los Altos, California, pp. 83-95 (1980).
- 18 - Cowie, A.T. and Buttle, H.L.: Lactation. In: *Reproduction in Farm Animals*, Ed. by Hafez, E.S.E., 3th ed., Lea & Febiger, pp. 203-221 (1974).
- 19 - Dam, A.: Studies on the gammaglobulin levels in sera of calves from herds with coliseptisemia as a problem and some investigations on the content of specific antibodies in colostrum. *Nord.Vet.Med.*, 20: 449-457 (1968).
- 20 - De Alba, P.E.: Contribución al estudio de las constantes hemáticas en el trópico y en la altiplanicie, del ganado Holstein. Tesis Fac. Med. Vet. y Zootec. Universidad Veracruzana, Ver. (1977).
- 21 - Devery, J.E., Davis, C.L. and Janson, B.L.: Endogenous production of immunoglobulins IgG1 in newborn calves. *J.Dairy Sci.*, 62: 1814-1817 (1979).
- 22 - Douglas, D.J.: Cells involved in immune responses. In: *Basic and Clinical Immunology*. Ed. by Hugh Fudenberg, et al. 3rd ed. Lange Medical Publications, Los Altos California, pp. 96-114 (1980).

- 23 - Dukes, H.H. y Swenson, M.J.: Fisiología de los animales domésticos, Vol. I. Aguilar s.a. edic., Madrid, Esp., (1981).
- 24 - Duncan, J.R., Wilkie, B.N., Fierfand, F. and Winter, A.J.: The serum and secretory immunoglobulins of cattle: characterization and quantitation. *J.Immunol.*, 108(4): 965-976 (1972).
- 25 - Enright, F.M. and Osburn, B.I.: Ontogeny of fetal ruminant inflammatory responses. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 137, Ed. by John, E.B., Plenum Press, NY, USA, pp. 740 (1980).
- 26 - Everitt, J.I., Shaddock, J.A., Steinkamp, C. and Ciabaugh, G.: Experimental *Babesia bovis* infection in Holstein calves. *Vet. Pathol.*, 23: 556-562 (1986).
- 27 - Feinstein, A. and Hobart, M.J.: Structural relationship and complement fixing activity of sheep and others ruminants immunoglobulin G subclasses. *Nature*, 223: 950-952 (1969).
- 28 - Fey, H.: Immunology of the newborn calf: Its relationship to coliseptisemia. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 176: 49-53 (1971).
- 29 - Figueroa, M.J., Cantó, A.J., Juárez, F.J. y Ruiz, L.F.: Cultivo in vitro de *Babesia bovis*: Establecimiento y condiciones óptimas de multiplicación. *Tec.Pec.Mex.*, (46): 46-52 (1984).
- 30 - Fowler, D. and Brinton, L.S.: Abortion in cows inoculated with *Anaplasma marginale*. *Theriogenology*, 4(2-3): 59-67 (1975).
- 31 - Frandson, R.D.: *Anatomy and Physiology of farm animals*, 3rd ed., Lea & Febiger, Philadelphia, USA, (1981).
- 32 - Gewurz, H., Pickering, R.J. and Good, R.A.: Complement activities in diseases associated with repeated infections and malignancies. *Int.Arch.Allergy.*, 33: 368-388 (1968).
- 33 - Goldman, M., Pipano, E. and Rosenberg, A.S.: Fluorescent antibody test for *Babesia bigemina* and *Babesia berbera*. *Res.Vet.Sci.*, 13: 77-81 (1972).
- 34 - Goodman, J.W. and Wang, A.: Immunoglobulins: Structure, diversity and genetics. In: *Basic and Clinical Immunology*, Hugh Fudenberg, et al Eds., 3th ed., Lange Medical Publications, Los Altos, California, pp. 28-43 (1980).

35 - Hafez, E.S.E. and Jainudeen, M.R.: Gestation, prenatal physiology and parturition. In: Reproduction in Farm Animals, Ed. by Hafez, E.S.E., 3th Ed., Lea & Febiger, pp. 166-202 (1974).

36 - Hall, W.T.K.: The immunity of calves to *Babesia argentina* infection. *Aust.Vet.J.*: 361-366 (1960).

37 - Hall, W.T.K., Tammemagi, L. and Johnston, L.A.Y.: Bovine babesiosis. The immunity of calves against *Babesia argentina* with special reference to the role of complement fixing antibodies. *Exp.Parasitol.*, 20: 119-124 (1967).

38 - Husband, A.J., Brandom, M.R. and Lascelles, A.K.: Absorption and endogeneous production of immunoglobulins in calves. *Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci.*, 50: 491-498 (1972).

39 - Jones, A. and Waldman, T.A.: The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *J.Clin.Invest.*, 51: 2926-2921 (1972).

40 - Juárez, L.F.I. y Román, P.H.: Respuestas fisiológicas de vacas holstein nacidas y recién introducidas al trópico. *Tec.Pec.Mex.*, 25(2): 168-177 (1987).

41 - Kickhofen, B., Hammer, D.K. and Scheel, D.: Isolation and characterization of G-type immunoglobulins from bovine serum and colostrum. *Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem.*, 349: 1755-1773 (1968).

42 - Klosterman, A., Benedictus, J. and Hosdel, A.: Colostral transfer of anti-nematode antibodies in cattle and its significance for protection. *Vet.Parasitol.*, 7: 133-142 (1980).

43 - Krusse, V. : Yield of colostrum and immunoglobulin in cattle of the first milking after parturition. *Anim.Prod.*, 12: 619-626 (1970).(a)

44 - Krusse, V. : Absorption of immunoglobulin from colostrum in newborn calves. *Anim.Prod.*, 12: 627-638 (1970).(b)

45 - Levy, G.M., Clabaugh, G. and Ristic, M.: Age resistance in bovine babesiosis: Role of blood factors in resistance to *Babesia bovi*, *Infec.Immun.*, 37(3): 1127-1131 (1982).

46 - Logan, E.F.: Colostral immunity colibacillosis in neonatal calf. *Br.Vet.J.*, 130: 405-410 (1974).

- 47 - Logan, E.F. and Gibson, T.: Serum immunoglobulins levels in suckled beef herds. *Vet.Rec.*, 97: 229-230 (1975).
- 48 - Mahoney, D.F., Wright, I.G. and Mirre, G.B.: Bovine babesiosis. The persistence of immunity to *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* in calves *Bos Taurus* after naturally acquired infection. *Annl.Trop.Med.Parasitol.*, 67(2): 197-203 (1973).
- 49 - McCoy, G.C., Reneau, J.K., Hunter, A.G. and Williams, J.B.: Effect of diet and time on blood serum proteins in the newborn calf. *J.Dairy Sci.*, 53: 358-363 (1970).
- 50 - Mahoney, D.F.: Bovine babesiosis: the passive immunization of calves against *Babesia argentina* with special reference to the role of complement antibodies. *Exp.Parasitol.*, 20: 119-124 (1967).
- 51 - Mahoney, D.F.: Bovine babesiosis: A study of factors concerned in transmission. *Annls.Trop.Med.Parasit.*, 63: 1-14 (1969).
- 52 - Mahoney, D.F. and Ross, D.R.: Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust.Vet.J.*, 48: 292-298 (1972).
- 53 - Milstein, C.P. and Feinstein, A.: Comparative studies of two types of bovine immunoglobulin heavy chains. *Biochem.J.* 107: 559-564 (1968).
- 64 - Oppenheim, J.J., Rosenstreich, D.L. and Potter, M.: Cellular functions in immunity and inflammation., Elsevier/North Holland, N.Y., E.U.A. (1981).
- 55 - Ortiz, G.O.: Constantes fisiológicas en ganado bovino lechero en clima tropical. Tesis Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Veracruzana, Ver., (1973).
- 56 - Osburn, B.I.: The ontogeny of the ruminant immune system and its significance in the understanding of maternal-fetal-neonatal relationships. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol 137, Ed. by John, E.B., Plenum Press, NY, USA, pp. 91-103 (1980).
- 57 - Osburn, B.I., Stabenfelt, G.H., Ardanss, A.A., Trees, C. and Sawyer, M.: Perinatal immunity in calves. *J.Am.Vet.Med.A.*, 164: 295-298 (1974).
- 58 - Outteridge, P.M.: *Veterinary Immunology*, Academic Press, London, Eng., (1985).

59 - Penhale, W.J., Logan, E.F., Selman, I.E., Fisher, E.W. and McEwan, A.D.: Observations on the absorption of colostral immunoglobulins by the neonatal calf and their significance in colibacillosis. *Ann.Rech.Vet.*, 4: 223-233 (1973).

60 - Pérez, L.O. y Ortiz, O.G.: I. Crianza de becerros. XII Día del ganadero del Campo Experimental Pecuario La Posta. Zona Golfo, Veracruz, Ver. (1984).

61 - Petrie, L.: Maximizing the absorption of colostral immunoglobulins in the newborn dairy calf. *Vet.Rec.*, 114: 157-163 (1984).

62 - Radostits, O.M. and Acres, S.D.: Herd management. In *Bovine Medicine and Surgery*, 2nd edition,, Vol. I, Ed. by Amstutz, H.E., American Vet. Publications, Inc., Santa Barbara, California, pp. 21-61 (1980).

63 - Ramos, A.J., Alvarez, M.J., Cantó, A.J. y Vega, M.C.: Comparación de dos pruebas serológicas para la detección de anticuerpos específicos en la anaplasmosis bovina, *Rev.Mex.Parasitol.*, 1(1): 7-10 (1988).

64 - Ribeiro, N.A., Ribeiro, I.F.: Sobre as variações dos índices de hemoglobina, proteína total do plasma e do valor hematocrito no decurso da premonição com os agentes das plasmoses bovinas. *Rev.Fac.Med.Vet.S.Paulo*, 5(3): 317-324 (1955).

65 - Ristic, M.: Anaplasmosis. In *Bovine Medicine and Surgery*. Ed. by H.E. Amstutz, Am. Veterinary Publications, Inc. 2nd Ed., Vol I, Santa Barbara, California, pp 324-348 (1980).

66 - Ruiz, N.A.: Métodos de determinación de proteína. En: *Manual de Inmunología*, Ed. por A. Morilla y C.R. Bautista, Ed. Diana, México, D.F., pp. 388-393 (1986).

67 - Saunders, G.C.: Development and evaluation of an enzyme-labeled antibody test for the detection of hog cholera antibodies. *Am.J.Vet.Res.*, 38:21 (1977).

68 - Sawyer, M., Moe, J.B. and Osburn, B.I.: Ontogeny of immunity and leukocytes in the ovine fetus and elevation of immunoglobulins related to congenital infection. *Am.J.Vet.Res.* 36: 643-648 (1973).

69 - Schalm, O.W., Jain, N.C. and Carroll, E.J.: *Veterinary Hematology*, 3rd ed., Lea & Febiger, Philadelphia, USA (1975).

- 70 - Schultz, R.D.: The role of cell-mediated immunity in infection diseases of cattle. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 137, Ed. by John, E.B., Plenum Press, NY, USA, pp. 57-90 (1980).
- 71 - Schawbe, C.W., Rieman, H.P. and Franti, CH.E.: *Epidemiology in Veterinary Practice*, Lea & Febiger, Philadelphia, USA (1977).
- 72 - Selman, I.E., Fuente de la G. and Fisher, E.W.: The serum immunoglobulin concentration of newborn dairy heifer calves. A farm survey. *Vet.Rec.*, 88: 460-464 (1971).
- 73 - Smith, T. and Little, R.B.: The significance of colostrum to the newborn calf. *J.Exp.Med.*, 36: 181-198 (1922).
- 74 - Sokal, R.R. y James, R.F.: *Biometria. Principios y metodos estadisticos en el investigacion biologica*. H. Blume ed., Madrid, Espana. (1979).
- 75 - Speicher, J.A. and Heep, R.E.: Factors associated with calf mortality in michigan dairy herds. *J.Am.Vet.As.*, 162: 463-466 (1973).
- 76 - Staley, T.E. and Bush, L.J.: Receptor mechanisms of the neonatal intestine and their relationship to immunoglobulin absorption and disease. *J.Dairy Sci.*, 68: 184-205 (1985).
- 77 - Staley, T.E., Corley, D.L., Bush, L.J. and Jones, E.W.: The ultrastructure of neonatal calf, Intestine and absorption of heterologous proteins. *Anat.Rec.*, 172: 559-580 (1972).
- 78 - Stott, G.H., Marx, D.B., Nenefee, B.E. and Nightengale, G.T.: Colostral immunoglobulin transfer in calves. II. The rate of absorption. *J.Dairy Sci.*, 62: 1766-1773 (1979).
- 79 - Stott, G.J. and Reinhard, E.J.: Adrenal function and passive immunity in the dystocial calf. *J.Dairy Sci.*, 61: 1457-1461 (1978).
- 80 - Tamayo, J.L.: *Geografia General de Mexico*, 2a. ed., Instituto de Investigaciones Económicas, México, D.F., (1962).
- 81 - Tello, R.M., Alvarez, M.J.A., Ramos, A.J., Aboytes, T.R. y Cantó, A.J.: La prueba de ELISA en el diagnóstico de la anaplasmosis. *Tec.Pec.Mex.*, 52: 45-50 (1986).
- 82 - Tizard, R.I.: Serologic assays. *J.Am.Vet.Med.Ass.*, 51(10): 1162-1165 (1982).

- 83 - Tizard, R.I.: *Inmunologia Veterinaria*. Ed. Interam., México, D.F., pp. 34-183 (1983).
- 84 - Trueman, K.F. and Blight, G.W.: The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. *Aus.Vet.J.*, 54: 301-305 (1978).
- 85 - U.S.D.A.: A microtiter technique for the complement test for anaplasmosis. U.S. Department of Agriculture. Beltsville, Maryland, USA. (s/a).
- 86 - Vega, C.A., Buening, G.M., Green, T.J. and Carson, C.A.: *in vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am.J.Vet.Res.*, 46(2): 416 (1985).
- 87 - Vivian, W.J.: Immunoglobulins: Biosynthesis and metabolism. In: *Basic and Clinical Immunology*, Ed. by Hugh Fudenberg, et al 3th ed., Lange Medical Publications, Los Altos, California, pp. 64-78, (1980).
- 88 - Weisman, J., Goldman, M., Mayer, E. and Pipano, E.: Passive transfer to newborn calves of maternal antibodies against *Babesia bigemina* and *Babesia berberis*. *Refuah.Vet.*, 31(3): 108-113 (1974).
- 89 - Zaugg, J.L. and Kuttler, K.L.: Bovine anaplasmosis. *In utero* transmission and the immunologic significance of ingested colostrum antibodies. *Am.J.Vet.Res.*, 45(3): 440-443 (1984).

VI. APENDICE.

Apéndice 1.

Prueba de Fijación de Complemento (85). Diagnóstico de anticuerpos anti-Anaplasma marginale.

Para el desarrollo de ésta técnica primero se requiere estandarizar cada uno de los componentes, para conocer su potencial de reacción dentro de la prueba.

Para la prueba diagnostica el suero se debe diluir 1:5 e inactivar a 56C durante 30 min. en baño María. Posteriormente se agregan los demás componentes componentes en microplacas de polivinil, Nunc (Intermed, Denmark).

Se retiran las microplacas del Baño María después de una segunda incubación y se colocan en refrigeración a 4C toda la noche. El esquema de la agregación de los componentes es el siguiente:

Reactivos	Pozo 1	Pozo 2*	Incubación
Suero Problema	.025 ml	.025	1 hr. 37 C
Antígeno	.025 ml	----	
Complemento	.025 ml	.025	
Sol. Amortigua- dora de Veronal	----	.025	

Sistema Hemolítico	.050	.050	45 min. 37 C

* Control del suero.

Para la interpretación, en los pozos de control del suero que no reciben antígeno debe notarse una hemólisis completa; si alguno de esta muestra glóbulos rojos sedimentados, se considerara anticomplementario.

En los pozos en los que se coloca el suero problema más antígeno, se pueden observar varios grados de reacción, desde hemólisis completa (negativos), hasta la ausencia de hemólisis o fijación completa (positivos).

Apéndice 2

Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta para el diagnóstico de *Babesia* spp. (33).

Desarrollo de la prueba.

1. Las laminillas o frótis se desecan introduciéndolas en un matraz que contenga Cloruro de Calcio, conectado a una bomba de vacío durante 1 hora.

2. Se fija el antígeno en acetona durante 30 min. y se dejan secar al aire inmediatamente.

3. Con lápiz grueso se marcan círculos y se colocan los sueros diluidos (1:80) en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2

4. Incubar en cámara húmeda a 37 C durante 30 min., posteriormente se efectúan 2 lavados con PBS y 1 vez con agua destilada, y se dejan secar la laminillas.

5. El conjugado una anti-IgG bovina en conejo con Isotiocianato de fluoresceína (Cappel Lab. Cochranville, PA. EUA), diluída 1:40 con PBS, se aplica en cada uno de los círculos trazados, y se incuba a 37 C durante 30 min. en cámara húmeda. Luego se lavan las laminillas con PBS.

6. Se agrega una gota de glicerina fosfatada en cada círculo y se coloca un cubreobjetos, este se fija con barniz para unas.

7. Observación en microscopio de luz ultravioleta.

8. Interpretación. Esta se basa en la observación de los cuerpos babesiales fluorescentes en el suero control positivo, su ausencia en los negativos.

Apéndice 3
Electroforesis (3).

Procedimiento

1- Se sumergen tiras de Cellogel en una solución amortiguadora de veronal sódico.

2- Las tiras se extienden sobre el puente de la cámara de electroforesis, y se colocan las muestras (1.5 ul) con el aplicador a 2 cm del borde del electrodo (-).

3- Se conecta la fuente aplicando una corriente de 200 voltios durante 30 min.

4- Las tiras se bañan con colorante de Ponceau por 5 min. Se pasan 3 veces por un baño con ácido acético al 5%.

5- El transparentado de las tiras se efectúa sumergiéndolas en metanol puro por 30 seg., luego se colocan en una mezcla de metanol (85 ml), ac. acético glacial (14 ml) y glicerina (1ml) durante 1 min. Se colocan sobre una platina caliente, lo necesario para su transparentización.

6- La lectura se realiza en un densitómetro.

Apéndice 4

Prueba de Turbidez con Sulfato de Zinc (4).

Esquema de la prueba:

1- Se coloca 0.1 ml de suero de calostro u sanguíneo en un tubo de ensayo y se agregan 6 ml de un solución de sulfato de zinc.

2- Mantener en incubación a temperatura ambiente durante 1 hora.

3- El espectrofotometro se calibra a cero, el control es el tubo que contiene el reactivo de sulfato de zinc, a una longitud de onda de 660 nm y se mide la densidad optica.

4- La lectura indica el grado de turbidez, el resultado se multiplica por 10 y se expresa como el número de unidades de turbidez del sulfato de zinc (UTS2).

Apéndice 5
Determinación de Proteínas (66).

El reactivo se prepara disolviendo 1.5 g de sulfato de cobre pentahidratado y 6.0 g de tartrato de sodio y potasio en 500 ml de agua. Se agregan 300 ml de hidróxido de sodio al 10% libre de carbonatos, y se afora a 1000 ml.

Para el estándar de proteína se disuelven 100 mg de proteína (albúmina sérica bovina, V), en 10 ml de agua destilada. Posteriormente en tubos se colocan las siguientes cantidades:

ml solución estándar	ml agua destilada	mg/ml proteína
0.1	0.9	1
0.3	0.7	3
0.5	0.5	5
0.7	0.3	7
0.9	0.1	9
1.0	0.0	10
Blanco 0.0	1.0	0

Las muestras problema se diluyen de modo que contengan de 1-10 mg/ml. De esta dilución se transfiere 1 ml a un tubo.

A los tubos que contienen el blanco, estándares y problemas se les agregan 4 ml del reactivo de Biuret y se mezclan. Pasados 30 min. se lee la absorbancia a 560 nm en espectrofotómetro. LSe traza la curva con los estándares y se interpola la densidad óptica de las muestras problema para conocer su concentración.

Apéndice 6

Prueba de ELISA para el diagnóstico de anaplasmosis (81).

El antígeno (Ag) es particulado, donado por el USDA; el conjugado es anti-IgG bovina en conejo con peroxida de rábano picante (Cappel Lab. Cochranville, PA. EUA). El sustrato es peróxido de hidrógeno al 30% (Merck Darmstandt, F.R., Germany) adicionado con O-phenilendiamine-dihydrochloride (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.). Las lecturas se realizan en un lector específico a una longitud de onda de 405 nm.

Esquema de la prueba:

1- El antígeno diluido 1:400 en una solución de carbonatos, se mantiene toda la noche a 4 C, para que efectue la adsorción. Esto se ejecuta en placas de polivinil Nunc (Intermed, Denmark).

2- Lavado de las placas con un buffer de fosfatos adicionado con twee-20 (PBST).

3- Bloqueo. Se efectua agragando a cada pozo 100 ul de albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.) al 4% en PBST . Se incuba a 37 C por 15 min. y se repite el paso 2.

4- Los sueros diluidos 1:80 se colocan en los pozos, y se incuban a 37 C por 15 min., repitiendose nuevamente el paso 2.

5- El conjugado a la dilución 1:1500 en PBST, se coloca en los pozos, se incuba y se efectuan los lavados.

6- A cada pozo se le agregan 100 ul del sustrato y se incuba a 37 C por 10 min.

7- El paro de reacción se logra agregando la solución de ácido fluorhídrico al .1 m.

8- Lectura. La coloración final de la reacción es amarilla debida al tipo de sustrato y cromógeno empleados. La lectura se realiza calibrando el espectofotometro con una placa limpia.

9- La clasificación entre reactores positivos y negativos es de acuerdo a las lecturas en absorbancia; determinando dos desviaciones estándar de los sueros controles positivos y negativos.

Apendice 7

**Prueba de Aglutinación en Tarjeta (69).
Diagnóstico de anaplasmosis.**

Desarrollo de la prueba:

1- En una placa de vidrio se colocan 20 ul de suero se le agregan 20 ul de antígeno y 20 ul de factor serico bovino.

2- La mezcla se homogeniza con un palillo de madera y la placa se rota suavemente por 6-7 min., a una temperatura entre 20-30 C.

3- La lectura se efectua comparando los sueros controles positivos y negativos, considerando la positividad por la aparición de agregados , la negatividad por ausencia de los mismos.

Apéndice B
Análisis de Varianza.
Prueba de ELISA.

Títulos de anticuerpos anti-Amplasa marginal en becerros mantenidos en el trópico.

=====

Fuente Variación	Grados Libertad	Suma Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Ft (.05)

Bloques	5	13.26	2.652		
Tratamientos	3	6.62	2.207	5.89	3.29*
Factor A	1	3.96	3.96	10.56	4.54*
Factor B	1	.9997	.9997	2.67	4.54
Interacción AB	1	1.6603	1.6603	4.43	4.54
Error	15	5.62	.375		
Total-	23	25.5			

Factor A: Procedencia de los becerros 1= altiplano; 2= trópico.
Factor B: Tipo de calostro 1= Con anticuerpos anti-A, marginales;
2= Sin anticuerpos anti-A, marginales.

Apéndice 9

SOLUCIONES DE TRABAJO.

Solución de Carbonatos:

Na₂CO₃.....1.59 g
NaHCO₃.....2.93 g
Aforar a 1 lt con agua destilada
Ajustar a pH 9.6

Solución de PBS-T:

NaCl.....8.0 g
KH₂PO₄.....0.2 g
Na₂HPO₄.12 H₂O.2.9 g
KCl.....0.2 g
Tween 20.....0.5 ml
Aforar a 1 lt con agua destilada.
Ajustar a pH 7.4

Solución de Sustrato/cromógeno:

1. Acido cítrico 19.2 g
cbp 1 lt de agua destilada
2. Na₂HPO₄.....2 8.4 g.
cbp 1 lt de agua destilada
3. Solución de Trabajo:
Sol. 124.3 ml.
Sol. 225.7 ml.
Agua destilada ..25.0 ml
Ajustar pH 5.0

A cada 100 ml de solución de trabajo agregar:
Orthophenildiamida .. 40.0 mg
H₂O₂ al 30 %..... 40.0 ul

Solución de paro de reacción:

1. Acido fuorhídrico.....3.45 ml
cbp 1 lt
2. EDTA.....38.0 g
cbp 1 lt

Sol. 110.0 ml
Sol. 2 0.1 ml
Ajustar a pH 3.3

Solución Bufer de Fosfatos (PBS).

KH₂PO₄.....7.65 g.
NaHPO₄.....23.94 g.
NaCl.....12.75 g.

Aforar a 3 lts. con agua destilada.

Glicerina fosfatada:

9 partes de glicerina por una de PBS.

Azul de Evans.....25.0 mg

cbp 100 ml agua destilada.

Cuadro 4.
DISTRIBUCION DE VACAS DONADORAS DE CALOSTRO.

LOCALIZACION (Estado)	NUMERO VACAS	ANTICUERPOS ANTI:		VOLUMEN TOTAL CALOSTRO (lts)
		A. marginale	Babesia spp	
HIDALGO	4	(-)	(-)	19.0
VERACRUZ	6	(+)	(+)	5.5

Cuadro 5
Electroforesis y Prueba de Turbidez con sulfato de zinc
VALORES DE PROTEINAS PLASMATICAS EN CALOSTROS.

Calostro:#	Prot. Total (g/100 ml)	Concentraciones relativas (%)				UTSZ
		Albumina				
Negativo	4.58	12.2	23.8	8.3	46.7	25.7
Positivo	4.82	3.7	34.4	12.9	47.5	26.9

* Positivo o negativo a anticuerpos anti-A. marginale y - anti-Babesia spp.

UTSZ= Unidades de Turbidez de Sulfato de Zinc.

Cuadro 6
Frecuencia Cardiaca en Becerras Mantenidos en el Trópico.*

Grupos	D i a s							Med.
	1	30	60	90	120	150	180	
T +	98	94	77	79	75	64	77	81
A +	118	110	120	103	109	89	83	105
T -	101	95	86	83	70	83	96	88
A -	98	100	116	100	99	96	92	100

* Número de latidos por min.
 Procedencia: T- trópico; A- altiplano
 Calostro: + Con anticuerpos; - Sin anticuerpos.

Cuadro 7
Frecuencia Respiratoria en Becerras Mantenidos en el Trópico*

Grupos	D i a s							Med.
	1	30	60	90	120	150	180	
T +	56	48	49	38	48	47	41	47
A +	55	58	60	44	67	46	42	53
T -	60	48	44	41	53	45	56	50
A -	50	48	52	63	53	50	39	51

* Número de respiraciones por min.
 Procedencia: T- trópico, A- altiplano
 Calostro: (+) con anticuerpos; (-) sin anticuerpos
 anti-A.marginale y anti-Babesia spp.

Cuadro 8
Temperatura Rectal en Becerros Mantenidos en el Trópico.

.....

G r u p o s	D i a s							Media
	1	30	60	90	120	150	180	
T +	39.4	39.2	39.1	38.8	39.3	38.9	38.6	39.0
A +	39.1	39.0	39.0	39.2	39.6	38.5	38.6	39.0
T -	39.0	39.0	38.9	38.7	39.1	38.6	38.8	38.9
A -	39.5	39.5	39.3	39.2	38.9	38.7	39.2	39.2

Procedencia: T- trópico; A- altiplano
 Calostro: (+) con anticuerpos, (-) sin anticuerpos anti-A.
 marginale y anti-Babesia spp.

Cuadro 9
Medias Mensuales de los Conteos de Glóbulos Rojos en
Becerros Mantenidos en el Trópico.

.....

G R U P O S	D I A S							M E D I A
	1	30	60	90	120	150	180	
	(millones/ul)							
T +	4.627	5.170	4.717	5.983	5.01	4.732	4.223	5.023
A +	8.750	8.500	8.400	8.310	6.600	7.110	4.622	7.470
T -	4.985	6.400	7.407	6.134	5.538	6.770	5.163	6.057
A -	8.000	8.940	6.770	6.620	7.150	8.103	6.647	7.461

Procedencia: T- trópico; A- altiplano
 Calostro: (+) con anticuerpos; (-) sin anticuerpos
 anti-A. marginale y anti-Babesia spp.

Cuadro 10
Registros del Hematocrito de Becerros Mantenidos en el Trópico.
 =====

GRUPOS	D I A S							Media
	1	30	60	90	120	150	180	

	(%)							
T +	28	29	30	32	21	22	22	26
A +	38	38	37	38	33	30	19	33
T -	30	31	30	25	24	25	19	24
A -	28	29	30	30	33	28	22	28

 Procedencia: T- trópico; A- altiplano
 Calostro: (+) con anticuerpos; (-) sin anticuerpos anti-
 A. marginale y Babesia spp.

Cuadro 11
Conteos de Glóbulos Blancos (GB) en Becerros Mantenidos en el Trópico.
 =====

GRUPOS	D I A S							Media
	1	30	60	90	120	150	180	

	(GB/ul)							
T +	7908	8454	9658	13665	8430	13219	13662	10714
A +	9750	11000	12000	13500	6650	7400	10650	10136
T -	10225	8333	9813	12438	14631	11352	12700	11356
A -	10000	10300	7850	7750	7150	10033	11617	9243

 Procedencia: T- trópico; A- altiplano
 Calostro: (+) con anticuerpos; (-) sin anticuerpos
 anti-A. marginale y anti-Babesia spp.

Cuadro 12
Prueba de Turbidez con Sulfato de Zinc.
Preingestión y Posingestión de Calostro

	GRUPOS			
	T+	A+	T-	A-

		UTSZ		
Preingestión.	3.8	4.3	4.1	3.5
Posingestión	23.1	19.9	17.2	19.0

UTSZ= Unidades Turbidez con Sulfato de Zinc.
Procedencia: A= altiplano; T= trópico
(+) o (-) anticuerpos anti-A. marginale y
anti-Babesia spp.

Cuadro 13
Detección de Anticuerpos anti-A. marginale a las 24 hrs
Posingestión de Calostro.

GRUPO	PRUEBAS SEROLOGICAS*		
	PATA	FC	ELISA

T+	3/6	0/6	6/6
A+	0/2	0/2	0/2
T-	0/4	0/4	0/4
A-	0/3	0/3	0/3

A= Altiplano; T= Trópico.
Calostro (+) con anticuerpos; (-) sin anticuerpos anti-A.
marginale y anti-Babesia spp.
* No. de positivos/ No. de examinados.

Cuadro 14
Detección de anticuerpos anti-Babesia spp. en Becerras a 24 hrs
pos ingestión de Calostro.
Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta.
.....

GRUPOS	REACTORES
T+	0/6
A+	0/2
T-	0/4
A-	0/3

-
Procedencia: T= trópico; A= altiplano.
Calostro: (+) con anticuerpos; (-) sin anticuerpos.

Cuadro 15
Titulos de anticuerpos anti-A. marginales determinados por ELISA
y su valor logaritmico en becerros del grupo T+

BECERRO N	D I A S						
	30	60	90	120	150	180	
	Títulos Logaritmico						
1-1	1:640 2.806	1:320 2.505	1:360 2.204	1:1232 3.091	1:640 2.806	1:640 2.806	
1-2	1:640 2.806	1:80 1.903	1:80 1.903	1:1424 3.154	1:320 2.505	1:2000 3.301	
1-3	1:320 2.505	1:320 2.505	1:320 2.505	1:336 2.526	1:320 2.505	1:320 2.505	
1-4	1:640 2.806	1:640 2.806	1:80 1.903	1:40 1.602	1:640 2.806	1:2400 3.320	
1-5	1:5120 3.709	1:5120 3.709	1:640 2.806	1:80 1.903	1:320 2.505	1:1600 3.204	
1-6	1:640 2.806	1:80 1.903	1:5120 3.709	1:40 1.602	1:40 1.602	1:2610 3.417	
Media Arit.	1:1333	1:1093	1:1067	1:525	1:380	1:1595	
Media Geom.	2.906	2.555	2.505	2.313	2.455	3.092	2.630

Cuadro 14
Títulos de anticuerpos anti-A. marginales determinados por ELISA
y su valor logarítmico en Becerras del Grupo A+
.....

BECERRO	D I A S					
	30	60	90	120	150	180

	Títulos					
	Logarítmo					
2-1	1:2 0.301	1:2 0.301	1:80 1.903	1:40 1.602	1:40 1.602	1:2610 3.417
2-2	1:2 0.301	1:2 0.301	1:2 0.301	1:40 1.602	1:40 1.602	1:227 2.356

Med Arit.	1:2	1:2	1:41	1:40	1:40	1:1419
Med Geomét	0.301	0.301	1.102	1.602	1.602	2.887

Cuadro 17
Comportamiento de los Titulos de Anticuerpos anti-A. marginales
determinados por ELISA en Becerras del Grupo T-

BECERRO N	D I A S					
	30	40	90	120	150	180

	Titulos Logaritmo					
3-1	1:2 0.301	1:80 1.903	1:80 1.903	1:200 2.301	1:320 2.505	1:805 2.906
3-2	1:2 0.301	1:2 0.301	1:800 2.903	1:400 2.602	1:320 2.505	1:2089 3.320
3-3	1:2 0.301	1:2 0.301	1:2 0.301	1:80 1.903	1:440 2.606	1:560 2.748
3-4	1:2 0.301	1:2 0.301	1:2 0.301	RIP -	-	-

Med Aritmet.	1:2	1:22	1:221	1:227	1:427	1:1151
Med Geomet.	0.301	0.702	1.352	2.27	2.605	2.99

RIP- Becerra muerto, diagnóstico clínico e histopatológico neumonía.

Cuadro 18
Titulos de anticuerpos anti-A. marginales determinados por ELISA
y sus valores logaritmicos, en Becerro del Grupo A-

	D I A S					
BECERRO	30	60	90	120	150	180

	Titulos Logaritmo					
4-1	1:2 0.301	1:2 0.301	1:2 0.301	1:40 1.602	1:5117 3.709	1:5117 3.709
4-2	1:2 0.301	1:2 0.301	1:2 0.301	1:40 1.602	1:40 1.602	1:570 2.756
4-3	1:2 0.301	1:2 0.301	1:2 0.301	1:1279 3.107	1:320 2.505	1:170 2.230

Med Arit	1:2	1:2	1:2	1:453	1:1826	1:1952
Med Geom.	0.301	0.301	0.301	2.10	2.61	2.90

Cuadro 19

Prueba de ELISA.

Medias Geométricas de los Títulos de anticuerpos anti-A. marginales determinados por ELISA en Becerros Mantenidos en una Región Tropical

GPOS.	D I A S								
	0	1	30	60	90	120	150	180	MEDIA
T+	0.301	1.903	2.906	2.555	2.505	2.313	2.455	3.092	2.638
A+	0.301	0.301	0.301	0.301	1.102	1.602	1.602	2.887	1.299
T-	0.301	0.301	0.301	0.702	1.352	2.27	2.605	2.99	1.703
A-	0.301	0.301	0.301	0.301	0.301	2.10	2.61	2.90	1.49

A. Altiplano (Tizayuca, Hgo.)

T. Trópico (Veracruz, Ver.)

(+) Calostro con anticuerpos anti-A. marginales

(-) Calostro sin " " "

Cuadro 20

Título de Anticuerpos anti-A. marginales determinados por ELISA en Becerros Mantenidos en una Región Tropical.

GRUPOS	D I A S						
	30	60	90	120	150	180	MEDIA
T+	1:1333	1:1093	1:1067	1:525	1:380	1:1595	1:999
A+	1:2	1:2	1:41	1:40	1:40	1:1419	1:257
T-	1:2	1:22	1:221	1:227	1:427	1:1151	1:342
A-	1:2	1:2	1:2	1:453	1:1826	1:1952	1:706

T- Trópico, Veracruz, Ver.; A- Altiplano, Tizayuca, Hgo.

(+) Calostro con anticuerpos anti-A. marginales; (-) Sin anticuerpos

Cuadro 21

Becerras Reactores Positivos a la Presencia de Anticuerpos contra A. marginale determinados por la Prueba de Aglutinación en Tarjeta (PATA)

GRUPOS	D I A S							
	0	1	30	60	90	120	150	180
T+	0/6*	3/6	3/6	3/6	4/6	5/6	6/6	6/6
A+	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	1/2
T-	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/3	1/3	2/3
A-	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	2/3	3/3

* No. de positivos/No. de examinados.

Cuadro 22

Becerras reactores positivos a presencia de anticuerpos anti-A. marginale determinados por la prueba de Fijación de Complemento (FC)

GRUPOS	D I A S							
	0	1	30	60	90	120	150	180
T+	0/6 *	0/6	2/6	2/6	3/6	5/6	5/6	6/6
A+	0/2	0/2	1/2	1/2	1/2	1/2	2/2	2/2
T-	0/4	0/4	0/4	1/4	1/4	2/3	3/3	3/3
A-	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3	3/3

A. Altiplano (Tizayuca, Hgo.)

T. Trópico (Veracruz, Ver.)

(+) Calostro con anticuerpos anti-A. marginale

(-) " " sin " " " "

No. de positivos/ No. de examinados.

Cuadro 23

Becerras Reactores Positivos Babesia spp. mantenidos en el Trópico determinados por la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

.....

GRUPOS	D I A S							
	0	1	30	60	90	120	150	180
T+	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	3/6	6/6	6/6
A+	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	1/2	1/2	2/2
T-	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/3	1/3	2/3
A-	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	2/3

.....

A. Altiplano.

T. Trópico.

(+) Calostro con anticuerpos anti-Babesia spp.

(-) " sin " " " " "

* No. de positivos/ No. de examinados.

Cuadro 24.

Prueba de Lowry y Electroforesis.

Valores de Proteínas Plasmáticas en Calostro.

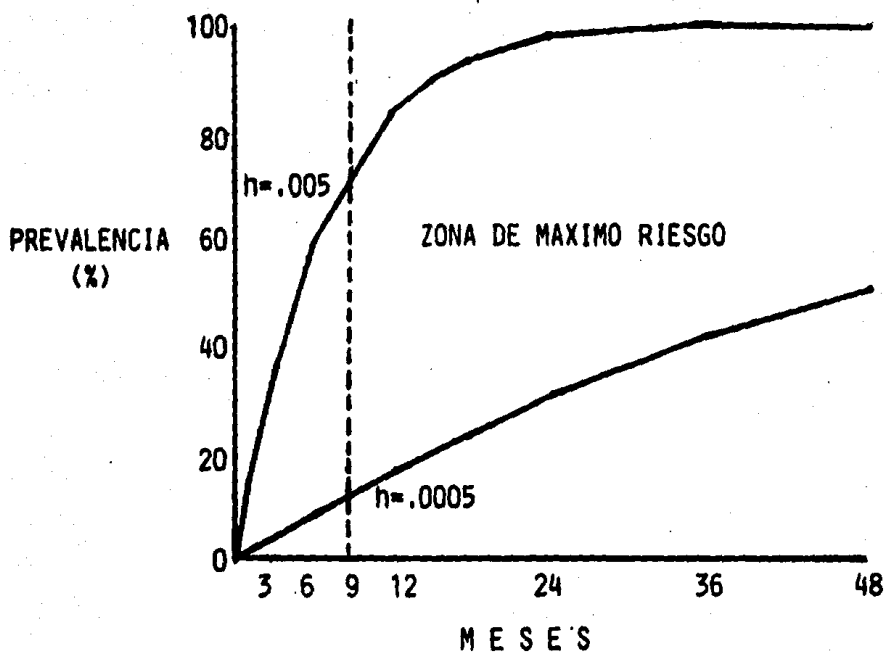
.....

Procedencia del Calostro:	Prot. Total g/100 ml	Concent. Relativ. Albúmina	Ref. Gammaglob.
Vaca Normal	6.91	46.5	26.4 (69)
Altiplano*	4.58	12.2	46.7 presente estudio
Trópico**	4.82	3.7	47.5 " "

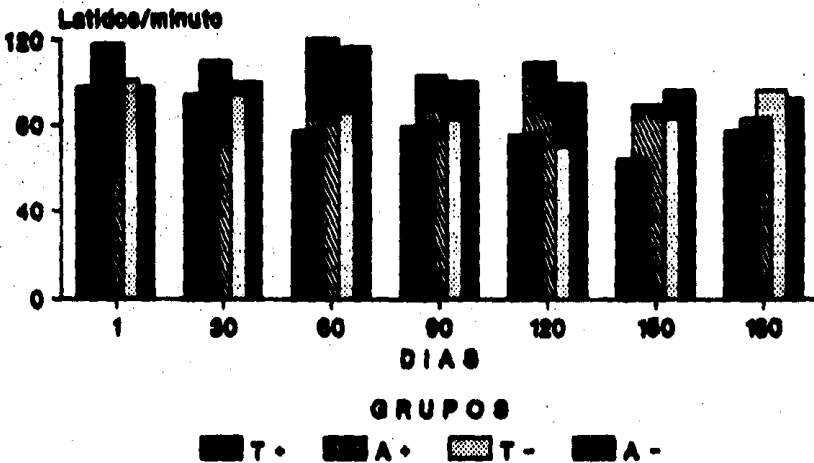
* Altiplano= Tizayuca, Hgo.

**Trópico= Veracruz, Ver.

GRAFICA 1.
TASA DE INOCULACION (h) AJUSTADA A LOS
9 MESES DE EDAD EN BOVINOS DEL CAMPO
EXPERIMENTAL PECUARIO "LA POSTA".

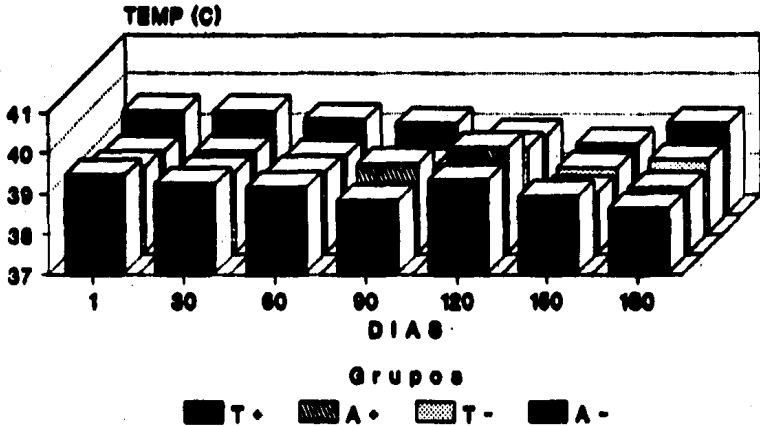


Grafica 2
FRECUENCIA CARDIACA EN BECERROS
MANTENIDOS EN EL TROPICO



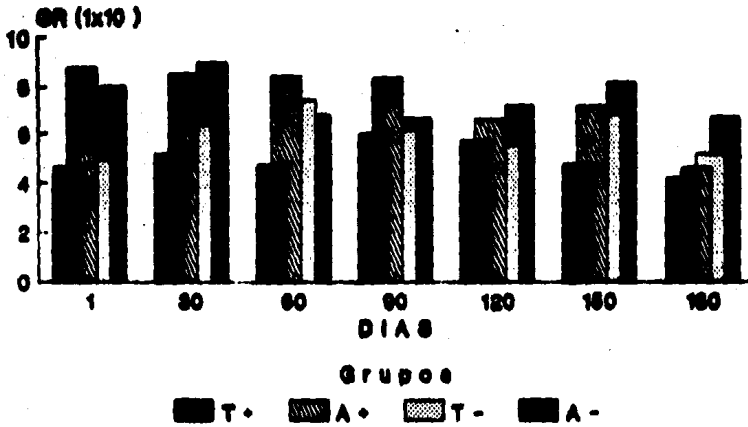
T = Tropico A = Altiplano
• = Calostro con Aca.
- = Calostro sin Aca

Grafico 3
TEMPERATURA RECTAL EN BECERROS
MANTENIDOS EN EL TROPICO



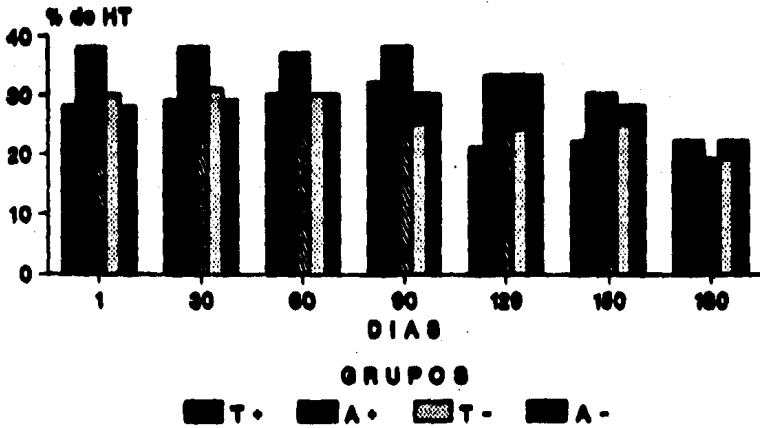
T = Tropico A = Altipiano
+ = Calostro con Ace
- = Calostro sin Ace

Grafica 4
CONTEOS DE GLOBULOS ROJOS EN BECERROS
MANTENIDOS EN EL TROPICO.



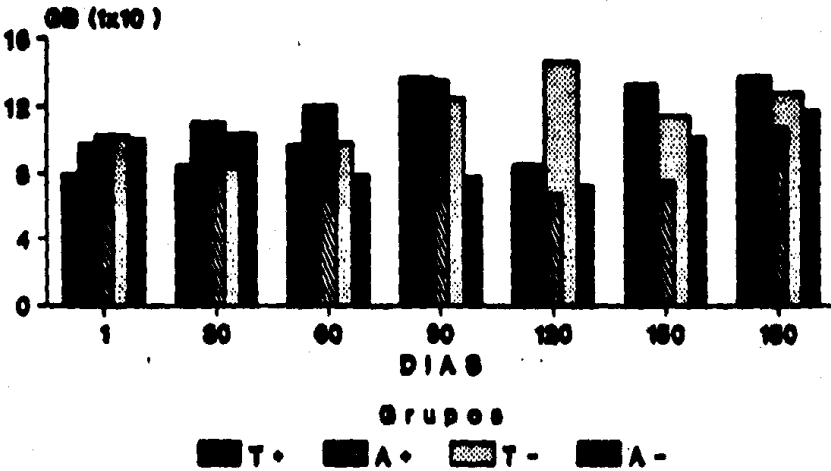
T = Tropico A = Altiplano
• = Calostro con Aca.
- = Calostro sin Aca

Grafico 5
VALORES DE HEMATOCRITO EN BECERROS
MANTENIDOS EN TROPICO



T = Tropico A = Altiplano
• = Galactose on Ase
- = Galactose sin Ase

Grafica 6
CONTEOS DE GLOBULOS BLANCOS EN BECERROS
MANTENIDOS EN EL TROPICO



T = Tropico **A = Altiplano**
+ = Calostro con Asc
- = Calostro sin Asc