

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL LEGAL

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *LEPTOSPIRA INTERROGANS*
SEROVARIEDAD HARDJO CEPA H-89 EN BOVINOS DEL CENTRO DE RECRÍA DE LA
CUENCA LECHERA DE TIZAYUCA HIDALGO

Proyecto Genérico: Tecnología de la Producción Agropecuaria
(Aprobado por Consejo Divisional, sesión 5/91)

Prestadores del Servicio Social:
HERNANDEZ DE LA VEGA JOEL JUAN
97348217

Asesores:
Dr. Torres Barranca Jorge Isaac
Dr. Moles y Cervantes Luis Pedro
Dra. Dolores Gavaldón

Lugar de realización:
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco
Fechas de inicio y terminación:
Del 31 de mayo del 2004 al 31 de noviembre del 2004
Fecha de entrega: 03 de octubre del 2005

Índice

Resumen	1
Introducción	3
Objetivo general	5
Objetivo específico	5
Metas	5
Marco Teórico	6
Leptospirosis bovina	6
Serovariedades más frecuentes en el ganado bovino	8
Leptospirosis en animales jóvenes	9
Respuesta inmune a la leptospirosis bovina	12
Principales medidas de control y prevención contra la leptospira	12
Aglutinación microscópica	13
Metodología	14
Actividades realizadas	21
Objetivos y metas alcanzadas	23
Resultados	24
Discusión	27
Conclusiones y recomendaciones	30
Literatura citada	31

Resumen

La leptospirosis es una enfermedad que afecta a varias especies de animales domésticas y silvestres. En el ganado bovino causa infertilidad tanto en machos como en hembras, abortos, nacimientos de becerros débiles con pocas posibilidades de sobrevivencia y disminución en la producción láctea. La leptospirosis bovina es causada principalmente por *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjo genotipos Hardjobovis y Hardjoprajitno, así mismo pueden ocurrir infecciones por otras serovariedades como Pomona y Grippotyphosa, las cuales también causan pérdidas económicas. El Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca S.A. (CAITSA), está ubicado en la cuenca lechera del mismo nombre en el sur del estado de Hidalgo. Tiene un diámetro de 216 hectáreas y está conformado por 90 socios ganaderos y 126 establos con un hato lechero de 27,000 vacas en producción y 8,000 becerras en recría de éstas sólo el 25% se encuentran en el Centro de Recría de la Cuenca Lechera de Tizayuca (CRCLT). En esta área se concentran cerca de 2000 becerras provenientes de 11 establos. El objetivo principal del CRCLT es criar a las becerras nacidas en la cuenca y después incorporarlas a la producción lechera a partir de los 12 meses sustituyendo a las vacas de desecho.

El presente estudio se realizó con el objeto de determinar el perfil serológico contra *Leptospira interrogans* de 200 becerras del CRCLT, con edades de 6 días a 3 meses (lactancia), 4 a 6 meses (desarrollo1), 7 a 9 meses (desarrollo2) y de 10 a 12 meses (finalización o gestación) por medio de la técnica de aglutinación microscópica (AM). Con una batería de 13 serovariedades de *Leptospira interrogans*, incluido el serogrupo Sejroe, serovariedad Hardjo, cepa H-89 se realizaron las pruebas serológicas, para determinar en que etapa del desarrollo se identifican anticuerpos antileptospira, las serovariedades presentes en el hato, así como el status epidemiológico de la cepa H-89 dentro del CRCLT. Del total de 200 sueros analizados solamente 7.5% (15/200) fueron positivos, contra las siguientes serovariedades: H-89, Grippotyphosa, Wolffii en la etapa de lactancia y H-89 y Pomona en desarrollo1, las restantes etapas resultaron negativas. Los mayores títulos en los sueros muestreados fueron observados en la etapa de lactancia 11/200 (18%) y las serovariedades más frecuentes fueron: H-89 10% (5/50), Grippotyphosa 16% (8/50), Wolffii 6% (3/50). En la etapa de desarrollo1, la prevalencia tan sólo fue del 2%, reaccionando contra las serovariedades H-89 6% (3/50) y Pomona 2% (1/50). Los restantes sueros fueron negativos. El porcentaje de sueros positivos contra la serovariedad H-89 fue del 4 (8/200); 5 en la etapa de lactancia y 3 en la etapa desarrollo1, en las etapas siguientes fueron negativos. Contra las 12 serovariedades, se encontró que sólo el 6% (12/200) fueron positivos a las serovariedades: Grippotyphosa, Wolffii y Pomona. Cabe aclarar que no se detectó sueros positivos contra las demás serovariedades. Sólo 4/15 (0.60%) sueros reaccionaron a más de una serovariedad. En el CRCLT, el serogrupo Sejroe, serovariedad Hardjo, cepa H-89 fue una de las de mayor presencia; sin embargo, las becerras, presentaron una prevalencia baja de animales positivos.

Las otras serovariedades importantes detectadas en dicho centro de crianza fueron, Grippotyphosa, Wolffii y Pomona en ese orden y solamente en las dos primeras etapas de desarrollo. En las demás etapas de desarrollo analizadas, se encontraron animales negativos contra las 13 serovariedades, estos resultados sugieren que las becerras del CRCLT se encuentran libres de leptospirosis, hasta el momento de realizar esta investigación. Proponiendo que se tome en cuenta este trabajo para estudios futuros contra esta enfermedad.

Introducción

La leptospirosis es una zoonosis que afecta a varias especies de animales domésticas y silvestres, las cuales pueden servir como reservorios para las leptospiras. Es una enfermedad que desde comienzos del siglo XX ha impactado al mundo por su alta difusión, su importancia social y económica en países con producción pecuaria. En la década de los sesenta en los Estados Unidos de Norteamérica desplazó a la brucelosis como enfermedad por el creciente perjuicio económico que producía en la ganadería de ese país (Cacchione, 2001).

Es una importante enfermedad que afecta a animales de granja y en particular al ganado bovino causando abortos, retención placentaria, infertilidad, nacimientos de becerros débiles y disminución en la producción de leche. Algunos de los aspectos de la leptospirosis aun no han sido bien comprendidos debido a la dificultad del diagnóstico, la complejidad de la relación hospedero-leptospira y los cambios en los patrones de infección (Torres y Sánchez, 1999; Flannery y cols., 2001).

La leptospirosis en humanos fue descrita por Weil desde 1886, la cual ocasionaba un síndrome al que le denominó síndrome icterohemorrágico con insuficiencia renal y clasificó al agente etiológico como bacteria patógena. En 1915 esta bacteria fue aislada por Inada e Ido en Japón. Noguchi en 1917 estableció finalmente el género leptospira al aislar al microorganismo por primera vez de un ratón (Effler y cols., 2000; Soares y cols., 2000).

Es una afección de distribución mundial, que se manifiesta con carácter endémico o epidémico. La enfermedad aparece en todas las estaciones del año, con predominio en verano y otoño cuando las épocas de lluvias son frecuentes y provocan que aparezcan inundaciones en donde las leptospiras pueden persistir hasta por 183 días. Inclusive en lugares en donde el clima es húmedo y persisten aguas estancadas o existen ríos de poca afluencia con pH neutro o ligeramente alcalino (ya que un pH menor a 6 ó mayor a 8 inhiben la supervivencia de éstas) y temperatura ambiental propicia de 25 a 30C promedio (rango de 10 a 36C) también se desarrolla esta bacteria (Bolin y Alt, 1998; Cacchione, 2001).

Diferentes serovariedades de leptospira prevalecen en regiones específicas y se asocian a uno o más hospederos, que pueden estar eliminando la bacteria por largos periodos y la incidencia de la infección entre los hospederos naturales es relativamente alta y eficiente. Por otro lado, los hospederos incidentales no son un importante reservorio para la infección y la incidencia de transmisión es relativamente baja (Torres y Sánchez, 1999; Cacchione, 2001).

Es común que los animales silvestres sean portadores de la bacteria, entre estos se encuentran los roedores: ratas, ratones, conejos, liebres; así como nutrias, mangostas, marsupiales, zorros, zorrillos, comadreja, sapos ranas, ofidios y animales marinos entre otros. Todos estos constituyen un peligroso

reservorio y propician la diseminación de la enfermedad en el ambiente (Fernández y cols., 1993; Soares y cols., 2000).

Entre los animales domésticos, las especies bovina, porcina y canina son las más susceptibles en adquirir la infección. Es menos frecuente en la especie equina en cuanto a su apariencia patológica, sin embargo, una afección ocular cuya etiología ha suscitado y suscita controversias ha sido observada en esta especie cuando ha tenido contacto con las leptospiras (Cacchione, 2001).

En pequeños rumiantes debe tomarse en cuenta por su aparición esporádica con grave cuadro patológico que ocasiona principalmente abortos (Fernández y cols., 1993; Rebhun, 1995; Cacchione, 2001).

La leptospirosis bovina es causada principalmente por *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjo genotipos Hardjobovis y Hardjoprajitno, así mismo pueden ocurrir infecciones por otras serovariedades como Pomona y Grippotyphosa, las cuales también causan pérdidas económicas (Fernández y cols., 1993; Guitián y cols., 2001).

La infección se transmite por vía directa e indirecta. La primera se produce por lo general por el contacto con orina contaminada de animales enfermos con leptospiras patógenas, animales convalecientes y reservorios naturales. Inclusive se transmite por contacto de la bacteria con piel dañada, lacerada, con heridas o simplemente reblandecida por el agua. La transmisión indirecta se establece por la contaminación del agua potable, de aguas estancadas o de corriente lenta, arroyos, lagos, lagunas, pantanos, lodazales, tierra, suelos, pasturas y alimentos contaminados por las deyecciones de los animales reservorios o enfermos (Bolin y Alt, 1998; Effler y cols., 2000; Cacchione, 2001).

La vía de penetración de las leptospiras es muy versátil. La más frecuente es la cutánea por la facultad que tienen éstas para penetrar la piel lacerada por heridas. A través de las mucosas ocular, nasal, bucal, faríngea y del tracto reproductivo. La vía gástrica al parecer no tiene tanta relevancia (Bolin y Alt, 1998; Soares y cols., 2000; Cacchione, 2001).

Los signos de la enfermedad son múltiples, facultativos y no son exclusivos de la misma, variando de una especie a otra. El común a todas es la elevación brusca de temperatura corporal, malestar general, anorexia, mialgia, adinamia, temblores, cefaleas, raquialgias. En los hospederos de mantenimiento, la leptospirosis generalmente se caracteriza por una baja respuesta serológica y la presencia de signos clínicos agudos relativamente leves y una prolongada eliminación de las leptospiras por medio de la orina. Después de la infección el microorganismo se localiza en el riñón y tracto reproductivo, donde persiste por un largo periodo al alojarse en los túbulos contorneados distales por periodos de dos o más meses y se eliminan hasta 1×10^6 bacterias por ml y esto se puede asociar con enfermedad renal crónica (Fernández y cols., 1993; Torres y Sánchez, 1999; Cacchione, 2001).

Objetivo general

Determinar en los bovinos del Centro de Recría de la Cuenca Lechera de Tizayuca en que fase de su desarrollo se presentan anticuerpos contra *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjo genotipo Hardjoprajitno, cepa H-89.

Objetivo específico

Comparar la presencia y títulos de anticuerpos de la cepa H-89 con otras serovariedades de *Leptospira interrogans* en el sitio de trabajo.

Determinar cuales son las serovariedades de *Leptospira interrogans* que se presentan con mayor frecuencia en los bovinos del Centro de Recría de la Cuenca Lechera de Tizayuca.

Metas

Determinar en que fase del desarrollo de los becerros que se encuentran en el Centro de Recría de la Cuenca Lechera de Tizayuca se inicia la infección y probable colonización de los tejidos, por *Leptospira interrogans*, particularmente con la serovariedad Hardjo, genotipo Hardjoprajitno, cepa H-89, ya que al infectarse los bovinos, estos son capaces de desarrollar anticuerpos específicos contra las leptospiros, los cuales pueden ser determinados por la prueba de aglutinación microscópica.

Definir en que fase de desarrollo es conveniente iniciar un programa de vacunación, para prevenir la leptospirosis bovina en el Centro de Recría de la Cuenca Lechera de Tizayuca.

Marco Teórico

Leptospirosis bovina

Esta enfermedad es causada por una espiroqueta del género *Leptospira*, la cual afecta a la mayoría de los mamíferos en todo el mundo. En los bovinos la serovariedad más frecuente es *L. Hardjo* que corresponde a los genotipos *Hardjo-bovis* y *Hardjoprajitno* los cuales pueden infectar en forma accidental a otras especies animales. Sin embargo, los bovinos pueden infectarse con serovariedades no específicas de la especie como *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Grippityphosa* (Rebhun, 1995; Torres y cols., 1998; Radostits y cols., 2000).

En los bovinos la transmisión por *Hardjo* se da por vía directa e involucra el contacto con orina y leche contaminada, además la infección puede ser transmitida por vía venérea o transplacentaria. Con respecto a otras serovariedades suele ser de tipo indirecto, debido al contacto con áreas contaminadas con orina de otros huéspedes considerados como "naturales". Las condiciones ambientales son muy importantes para determinar la frecuencia de la transmisión indirecta, así como la sobrevivencia de las leptospiras en el medio externo (Torres y cols., 1998; Radostits y cols., 2000).

Después de depositarse en mucosas o piel dañada, las leptospiras transportadas por la sangre invaden distintos órganos. Durante el periodo de incubación, que varía de 3 a 10 días, las leptospiras circulan en el torrente sanguíneo (periodo septicémico), para depositarse en el hígado, donde se multiplican y se distribuyen a bazo, pulmones, riñones (leptospiuria) donde pueden ser eliminadas por periodos de 36 días (10-118 días) con altos niveles de excreción en la primera mitad de ese periodo (Rebhun, 1995; Bolin y Alt, 1998; Torres y cols., 1998; Radostits y cols., 2000).

La leptospirosis se presenta en forma aguda, subaguda o clínicamente inaparente. La presentación crónica de la enfermedad es menos común y se manifiesta con la aparición de problemas reproductivos. Las infecciones subagudas o crónicas son más frecuentes en las vacas adultas lecheras y a no ser que aparezca fiebre, hemoglobinuria, o ictericia, pueden pasar inadvertidas sin ser diagnosticadas hasta que aparecen los abortos epidémicos. La presentación de la enfermedad depende de la serovariedad infectante, ya que la variación entre los serotipos también afecta la naturaleza de los signos que aparecen. Los signos clínicos por lo general desaparecen de 12 a 14 días después de la enfermedad (Fernández y cols., 1993; Torres y cols., 1998).

En animales lactantes, la enfermedad aguda causada por la serovariedad *Pomona* se caracteriza por fiebre de corta duración, con una marcada caída en la producción de leche, en donde ésta adquiere una consistencia tipo calostro con presencia de coágulos de una coloración roja amarilla y con un elevado número de células somáticas. La ubre se encuentra flácida y suave (mastitis fría), debido a los cambios vasculares en la ubre. La agalactia dura de

2 a 10 días y es posible detectar leptospiras en la leche a partir del noveno día post-infección, recuperándose posteriormente la producción láctea, con excepción de aquellas vacas que se encuentran en la última fase de lactación. Otros signos que se manifiestan son: septicemia, toxemia, hemorragias, hepatitis, nefritis, anemia hemolítica y meningitis principalmente en animales jóvenes. Esta condición ocurre comúnmente con la serovariedad Hardjo tipo Hardjoprajitno, sin embargo, la infección puede ser causada por otras serovariedades. En la mayoría de los casos involucra a más de la mitad del hato y por periodos mayores de uno ó dos meses. Las infecciones de tipo endémica afectan vacas principalmente en su primera o segunda lactación (Torres y Sánchez, 1999).

En la forma subaguda por Pomona la presentación de la enfermedad los signos clínicos son similares; aparece fiebre (39-40.5C), depresión, anorexia, disnea, hemoglobinuria y puede o no haber ictericia.

El aborto puede ocurrir tres ó cuatro semanas después. Una de las principales características es la marcada disminución en la producción de leche (agalactia) y la aparición de gotitas de sangre así como un color amarillo-anaranjado en la leche con cambios en los cuatro cuartos de la ubre, ocasionalmente ocurre en forma moderada nefritis, hepatitis y meningitis (Torres y Sánchez, 1999; Radostits y cols., 2000).

La leptospirosis en su forma crónica ha sido estudiada principalmente cuando se asocia a L. Hardjo en el ganado vacuno, ya que el microorganismo tiene predilección por el útero grávido y glándula mamaria lactante. En general los signos clínicos son fiebre, anorexia, inmovilidad y agalactia, sin embargo, la única manifestación clínica de la enfermedad puede ser principalmente una infección fetal, que se manifiesta por aborto en cualquier etapa de la gestación causada principalmente por Hardjo, además, hay mortinatos, nacimientos prematuros y débiles, con becerros aparentemente sanos pero infectados que terminan muriendo a los pocos días del nacimiento. En ocasiones la mayor parte de los abortos reportados parecen ocurrir durante el tercer tercio de la gestación, por otra parte, hay reportes de abortos durante el segundo trimestre de la gestación y durante todos los estados de la preñez debido a la serovariedad Hardjo. También puede ocurrir retención de membranas placentarias, inclusive, Hardjo se aloja en el tracto reproductor tanto de la hembra como del macho. Se ha demostrado que la infección puede mantenerse durante 142 días en el útero de vacas gestantes y hasta 97 días en animales lactantes, siendo eliminadas éstas a través de descargas uterinas durante ocho días posteriores al parto (Radostits y cols., 2000; Flannery y cols., 2001).

El semen de toros infectados puede contener leptospiras y transmitir la infección por monta natural e inclusive por inseminación artificial, lo cual es menos común que ocurra. En los toros se han aislado leptospiras a partir del semen entre los 18 y 38 días posteriores a la infección (Torres y Sánchez, 1999; Radostits y cols., 2000).

Serovariedades más frecuentes en ganado bovino

Debido a la patogenicidad de estos microorganismos han sido clasificadas como *Leptospira interrogans* con más de 200 serovariedades y 23 serogrupos. Más recientemente por su estructura genómica se han reorganizado en 7 especies de *leptospira* (Bolin y Alt; 1998; Guitián y cols., 2001).

Las serovariedades que se encuentran con mayor frecuencia son: *L. Hardjo*, (genotipos *Hardjo-bovis* y *Hardjoprajitno*), *L. Pomona*, *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Canicola*, *L. Grippotyphosa* (Bolin y Alt; 1998).

Las serovariedades de mayor importancia en Norteamérica, Sudamérica y Nueva Zelanda que afectan el ganado vacuno son: *Pomona* y *Hardjo* genotipo *Hardjo-bovis*. En Europa sólo *Hardjo* genotipo *Hardjoprajitno*. En los Estados Unidos de Norteamérica la seroprevalencia (títulos ≥ 100), se estima para la serovariedad *Hardjo* en 29%, *Pomona* en 23%, *Icterohaemorrhagiae* 19% y *Canicola* 11%. En años recientes la infección por *Hardjo* se ha incrementado reconociendo que *Pomona* ha disminuido en cuanto a la prevalencia ya que los abortos debido a *Pomona* han disminuido en importancia en las últimas décadas, probablemente debido a la vacunación, mientras que los abortos y los nacimientos débiles se han incrementado por la presencia de *Hardjo*. En Irlanda del Norte se ha reconocido que el genotipo *Hardjoprajitno* es responsable de cerca de la mitad de los abortos, en un estudio realizado en ese país ésta fue aislada de la mayoría de los fetos abortados, mientras que *Hardjo-bovis* fue aislada principalmente de riñón y tracto genital de vacas portadoras. En contraste en el Reino Unido la presencia de *Pomona* en los últimos años ha sido descubierta (Rebhun, 1995; Bolin y Alt, 1998).

Bolin y Alt, (1998), mencionan, que *Hardjoprajitno* es más virulenta que *Hardjo-bovis*. Por otro lado, en un largo estudio llevado a cabo en Canadá, donde *Hardjo-bovis* prevalece, provocó cerca de un 6% de abortos y no se identificaron abortos causados por la serovariedad *Pomona*, sin embargo, en Ontario identificaron que *Hardjo-bovis* es más frecuente en ganado productor de carne, mientras que *Pomona* fue detectada en ganado lechero (Bolin y Alt, 1998).

Las serovariedades aisladas en Australia y que más frecuentemente causan problemas en el ganado bovino son: *Hardjo*, *Pomona* y *Tarassovi*. En Queensland y Nueva Gales del Sur, las serovariedades aisladas incluyen *Australis*, *Zanoni*, *Celledoni* y *Grippotyphosa*. En Israel la serovariedad predominante es *L. Szwajizak* (Radostits y cols., 2000; Black, y cols., 2001).

En África las muestras serológicas demuestran que hay evidencia de un gran número de serovariedades prevalentes. Por ejemplo en África Occidental, las muestras de hatos de bovinos lecheros revelan hasta un 45% de seropositividad a una o más serovariedades y probablemente se deba a que en dicho lugar no se practica la vacunación en el ganado (Radostits y cols., 2000).

En Brasil se han detectado anticuerpos antileptospira de serovariedades de *Leptospira interrogans*, en sueros de animales silvestres, los cuales han sido capturados y muestreados. Las serovariedades que han sido detectadas son: Tarassovi, Wolffi y Bataviae en zarigüeyas; Javanica, Ballum, Tarassovi y Grippotyphosa en monos; Pomona y Grippotyphosa en serpientes; y Bataviae, Castellonis y Grippotyphosa en roedores, la importancia de este estudio radica en que a estos animales se les ha observado rondando cerca de las granjas de cerdos y bovinos (Lilenbaum, y cols., 2002).

En México se han realizado numerosos estudios sobre leptospirosis desde diciembre de 1919, la fundación Rockefeller de Nueva York recibió la notificación de que existían casos de fiebre amarilla en Yucatán y envió al Dr. Hideyo Noguchi para estudiar la causa. El 14 de enero de 1920, el Dr. Noguchi dio una conferencia en el laboratorio de la Facultad de Medicina del estado de Yucatán ante médicos y estudiantes de medicina para dar a conocer los resultados de sus investigaciones, mostrando cultivos y preparaciones de leptospira, siendo estos los primeros reportes de leptospirosis en México y que podían ser confundidos con fiebre amarilla. En 1954, corresponde al Dr. Varela, llevar a cabo las primeras encuestas seroepidemiológicas en los estados de Veracruz, Tamaulipas y México y posteriormente en otros estados de la República. En tanto que en 1984 en los estados de Chiapas y Yucatán hizo lo propio el Dr. Zavala. Por otra parte, el Dr. Caballero, como investigador del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), participó en numerosos estudios y encuestas de prevalencia a leptospirosis en la población abierta acerca de casos clínicos y de grupos de riesgo en varios estados de la República Mexicana con la colaboración de los Dres. Avendaño, Castillo y Colín (Torres y Sánchez, 1999).

Segura y Solís del Cir-Sureste del INIFAP determinaron la seroprevalencia de leptospirosis bovina en unidades de producción en el estado de Yucatán. La seroprevalencia de leptospirosis bovina más alta fue determinada en orden de frecuencia, en la región oriente (69.3%), región sur (61.7%) y región centro (56.2%). Las principales serovariedades diagnosticadas fueron: oriente Hardjo (59.7%), Tarassovi (59.2) y Wolffi (58.0%); centro, Hardjo (46.4%), Tarassovi (44.2%) y Wolffi (43.8%); sur, Tarassovi (50.5%), Hardjo (47.7%) y Wolffi (41.1%), concluyendo que la leptospirosis se encuentra ampliamente difundida en el ganado bovino del estado de Yucatán (Torres y Sánchez, 1999).

Leptospirosis en animales jóvenes

La leptospirosis aguda con *L. Pomona* es más frecuente en los terneros de un mes de edad o mayor y son más susceptibles que las vacas en producción. Los terneros tienen un comienzo agudo de fiebre de (40.5-41.6C), septicemia, anemia hemolítica, hemoglobinuria, inapetencia, frecuencia cardíaca y respiratoria elevada y abatimiento. También son posibles hemorragias petequiales e ictericia. La morbilidad y mortalidad es elevada en los terneros de menos de dos meses de edad y en caso que ocurra recuperación del becerro,

la recuperación es prolongada (Rebhun, 1995; Torres, 1995; Bolin y Alt, 1998; Torres y cols., 1998; Radostits y cols., 2000).

En el caso de la infección por *Hardjo*, Radostits (2000), menciona que ésta aparece sólo en vacas gestantes o lactantes y no en animales jóvenes. Debido a que posiblemente las leptospiras colonizan el tejido uterino preñado, así como las glándulas mamarias, adhiriéndose el patógeno a receptores de superficie específicos del tejido y repeliendo cualquier mecanismo de defensa específico o inespecífico del hospedador, por lo que las leptospiras pueden crecer en dichos tejidos y producir una infección. Para que se de este crecimiento y colonización debe encontrar en el hospedero los nutrientes y las condiciones adecuadas, así como otros factores de crecimiento, que se necesitan en un aporte adecuado en todos los tejidos, un claro ejemplo es *Brucella abortus*, la cual crece lentamente en la mayor parte de los tejidos de vacas infectadas, si bien, en la placenta es en donde el crecimiento es muy rápido provocando el aborto. La causa de esta especificidad radica en que la placenta presenta una elevada concentración de eritritol, un nutriente que es un potente estimulante del crecimiento de *B. abortus*. En el caso de las leptospiras aún no se ha encontrado un factor similar al de *B. abortus* para que se de esa especificidad por el útero grávido o las glándulas mamarias lactantes (Madigan y cols., 2001).

El becerro nace relativamente desprovisto de inmunoglobulinas circulantes y depende en la mayor parte de los casos de los anticuerpos adquiridos en el calostro para protegerlo de los patógenos de su medio ambiente. La inmunoglobulina calostrual predominante es IgG1 (hasta 65 a 90% del total de Igs), debido a que la permeabilidad del intestino no es selectiva, se absorben todos los isotipos de inmunoglobulinas, en cambio la IgA del calostro y en menor grado IgM, se unen a un componente secretor libre del intestino, para inhibir su absorción. La transferencia de IgG al calostro inicia aproximadamente 4 a 6 semanas antes del parto y resulta en concentraciones calostruales de esta inmunoglobulina en el calostro de primer ordeño de 2 a 10 veces mayores que las del suero materno (Olguín, 1999).

Otra clase de inmunoglobulinas (IgG2, IgA e IgM) están presentes en el calostro pero en concentraciones considerablemente menores que IgG1. Otras inmunoglobulinas son secretadas por procesos no selectivos tanto de la circulación como de síntesis local. Toda la IgG1, la mayor parte de la IgM y cerca de la mitad de la IgA presentes en el calostro de los bovinos derivan del suero, en tanto que sólo el 30% de la IgG2, el 10% de la IgA provienen de la leche, y el resto se produce localmente en la ubre (Olguín, 1999).

Debido a que la concentración de IgG en el suero esta estrechamente relacionada con la resistencia global del becerro a los agentes infecciosos, se ha usado como una medida de protección proporcionada por la madre, dado que la cantidad de Igs en el calostro depende de un gran número de factores, incluyendo la historia de enfermedades de la vaca, así como la profilaxis por medio de la vacunación. Se debe tomar en cuenta que los niveles de inmunoglobulinas pueden variar por factores como la carga de patógenos en el ambiente, estrés, instalaciones, alimentación, entre otros, un nivel de 10 g/L, se

ha sugerido como una cantidad razonable para IgG en el suero de becerros al cabo de 24 horas de edad. Una concentración menor se denomina falla de transferencia pasiva (FTP) y se asocia con alta morbilidad y mortalidad (Tizard, 1989; Olguín, 1999).

Del calostro ingerido por los becerros en las primeras horas de vida, una proporción significativa de las inmunoglobulinas son transferidas a través de las células epiteliales del intestino del becerro y transportadas vía linfática a la sangre para posteriormente ser distribuidas a los líquidos extravasculares y secreciones corporales. La absorción de las inmunoglobulinas ocurre por un proceso llamado pinocitosis, el cual mueve a las Igs (y otras moléculas de gran tamaño) a través del epitelio intestinal y comienza justo después del nacimiento. Una porción de las Igs del calostro ingerido por los becerros van a cubrir el tracto digestivo y van a dificultar la adhesión de bacterias a la pared intestinal (Tizard, 1989; Olguín, 1999).

La especificidad de las Igs es crítica para la resistencia a la enfermedad. La relación entre la concentración de IgG y la salud del becerro es altamente significativa. Sin embargo, la susceptibilidad del becerro a la enfermedad es una respuesta no sólo al grado de protección provista por la inmunidad celular y humoral, sino también a la exposición a los patógenos del ambiente y al estado fisiológico del animal (Olguín, 1999).

Los terneros deben ser vacunados después de que los anticuerpos maternos han disminuido a los 3 meses de edad, siendo esenciales dos dosis de vacuna para crear la inmunidad primaria. Después de la primera vacunación, las dosis de refuerzo se administran cada 6 meses. El error más frecuente que impide la inmunización eficaz consiste en administrar una sola dosis de vacuna a las novillas y después no administrarles inyecciones de refuerzo hasta 6 a 12 meses más tarde (Rebhun, 1995).

En un estudio se determinó la presencia de anticuerpos antileptospira en becerros recién nacidos, provenientes de vacas inmunizadas con una bacterina experimental (contiene *Icterohaemorrhagiae* y Hardjo), utilizando la prueba leptospiricida y la prueba de aglutinación microscópica. Utilizaron 15 vacas Holstein-Friesian con 8 meses de gestación y a sus crías al nacer. Los sueros colectados de las vacas inoculadas se corrieron contra 2 cepas de referencia (*Icterohaemorrhagiae* y Hardjo), y éstas reaccionaron contra las serovariedades antes mencionadas produciendo anticuerpos antileptospira contra las dos serovariedades. Los sueros de los becerros de las vacas inmunizadas, fueron obtenidos entre las 3 y 10 horas de haber nacido y después de comprobar que habían ingerido calostro, se les detectaron anticuerpos contra las serovariedades *Icterohaemorrhagiae* y Hardjo. Se observó un ligero incremento en el título de anticuerpos en el segundo muestreo realizado 24 horas después. Con lo que se concluye que aunque los títulos de anticuerpos transferidos de las vacas a los becerros por medio del calostro no son muy altos sí son capaces de conferirles protección durante los primeros meses de vida (de la Colina y cols., 1987).

Respuesta inmune a la leptospirosis en bovinos

En un hato infectado, el número de animales enfermos es variable. Esto se debe principalmente a la susceptibilidad del individuo y la capacidad de la serovariedad infectante para adaptarse al huésped. En un hato susceptible, la infección subclínica puede llegar a presentarse en más del 50% de los animales, mientras que en las zonas exóticas, la enfermedad se presenta en forma esporádica, afectando principalmente a animales de primer y segundo parto (Torres y cols., 1998).

Seguido de la penetración de las leptospiras, los anticuerpos específicos son inducidos para opsonizar las leptospiras, facilitando con esto la eliminación de éstas. Sin embargo, las leptospiras que se alojan en los túbulos proximales renales, tracto genital y glándula mamaria se protegen de los anticuerpos circulantes. Entonces estos microorganismos persisten y se multiplican en esos sitios y pueden ser excretados y transmitidos a animales susceptibles por el contacto con orina, fluidos o leche. La respuesta serológica primaria contra *L. Hardjo* es la producción de IgM, aparecen rápido en la circulación, pero disminuye su número en un lapso de cuatro semanas post-infección. Los anticuerpos aglutinantes pueden ser demostrados a los tres o cuatro días de que las leptospiras han alcanzado el torrente circulatorio. Los primeros anticuerpos en aparecer son los del tipo IgM que son aglutinas y posteriormente los de tipo IgG con actividad neutralizante. Los anticuerpos circulantes pueden ser detectados en el suero al noveno día posterior a la infección. La aparición de los anticuerpos coincide con la eliminación de los agentes de la sangre y de la mayoría de los órganos y tejidos (Rebhun, 1995; Bolin y Alt, 1998; Torres y cols., 1998; Radostits y cols., 2000).

Entre las semanas una a dos post-infección aparecen las IgG y representan hasta el 80% de los anticuerpos detectados por la prueba de AM. El pico de la concentración de Igs es entre 11-21 días después de la infección. Los títulos antileptospira pueden declinar gradualmente después de los 11 meses pero la persistencia es variable. La vacunación induce la producción de anticuerpos del tipo IgG y el nivel de concentración más alto se manifiesta a las dos semanas posteriores, aplicando un refuerzo posterior se aumenta aún más, pero en comparación con la infección de tipo natural los primeros persisten menor tiempo (Rebhun, 1995; Bolin y Alt, 1998).

Principales medidas de control y prevención de la leptospirosis

Un programa de control tiene como objetivo prevenir las manifestaciones clínicas de dicha enfermedad y reducir las pérdidas económicas ocasionadas por problemas reproductivos, así como la disminución de la producción de leche. El control de la leptospirosis en una región se realiza por medio de la identificación, inmunización y tratamiento con antimicrobianos específicos a los portadores de las leptospiras. Los esfuerzos deben ser encaminados a evitar el contacto directo e indirecto de los bovinos sanos con los portadores. El control

de los roedores contribuye a prevenir infecciones por otras serovariedades, en las que el bovino es el huésped accidental (Marshall y Manktelow, 2002).

Para aquellos animales que van a ser introducidos a una unidad de producción, es conveniente que sean puestos en cuarentena y se determine su perfil serológico para leptospirosis, con el fin de prevenir la introducción de animales portadores de serovariedades de leptospiras que no estén presentes en el hato o la región (Marshall y Manktelow, 2002).

La vacunación es una medida importante para prevenir la transmisión de enfermedades entre los animales de una misma especie. El empleo de biológicos se basa en el hecho de que la inmunidad que producen éstos es serovariedad específica. Una enfermedad infecciosa induce la producción de inmunidad de tipo humoral y celular, que sirve para curar y controlar la enfermedad y por otra parte deja células de memoria que reaccionarán rápida y activamente ante un nuevo ataque del mismo agente infeccioso (Marshall y Manktelow, 2002).

La aplicación del microorganismo inactivado o atenuado, estimula al sistema inmune para la producción de anticuerpos, células T sensibilizadas y células de memoria, en ausencia de signología clínica aparente y si se presenta que sea en forma leve o inaparente (Marshall y Manktelow, 2002).

Aglutinación microscópica

El uso, la interpretación y la confirmación del laboratorio para el diagnóstico de la leptospirosis debe acompañarse de la anamnesis, signos clínicos y lesiones, ya que el diagnóstico de la enfermedad basándose sólo en los signos clínicos, es difícil, porque estos no son patognomónicos en el hombre y son muy variados en las distintas especies animales (Cacchione, 2001).

La observación directa del microorganismo en muestras de sangre mediante el uso de microscopio de campo oscuro es un método diagnóstico de gran ayuda, debido a que el aislamiento de las leptospiras se dificulta por el tiempo que se requiere para el cultivo e identificación de éstas (mínimo de 6 a 8 meses). La prueba de aglutinación microscópica (AM), es la prueba de referencia internacional aprobada por la WHO (World Health Organization, 1985), recomendada por la OPS (Organización Panamericana para la Salud, 1985) y la OIE (Office international des Epizooties, 1996), ya que es muy sensible pero también específica. Esta prueba ha sido descrita por Galton y colaboradores; modificada por Cole y colaboradores, utilizándose comúnmente para el diagnóstico de leptospirosis. Esta prueba requiere de cepas de leptospiras vivas y frescas de diferentes serovariedades y sueros con títulos de inmunoglobulinas (Ig) antileptospira. Los cultivos de leptospiras deben mantenerse en un medio líquido de 4 a 14 días y no presentar grumos (autoaglutinaciones), ni contaminación. Los antígenos deben tener una densidad de microorganismos y contener aproximadamente de 100-200 células por campo de gran aumento (45x). La selección de las cepas de leptospiras

para ser usados en la prueba de (AM) debe incluir los serogrupos de todas las serovarietades conocidas que existan en el país o región (Fernández y cols., 1993; Sting y Dura, 1994; Hutter y cols., 1997; Torres y Sánchez, 1999; Molnar y cols., 2001).

Si bien existen varios métodos para el serodiagnóstico de la leptospirosis, sólo la prueba de aglutinación microscópica (AM) es el procedimiento de referencia. Esta técnica se emplea para detectar anticuerpos leptospirales en el suero, identificar los aislamientos de leptospiras y clasificar cepas, además de servir de base para evaluar cualquier otro método serológico nuevo para el diagnóstico de la enfermedad (Myers, 1985; Torres, 1995).

Metodología

Selección de animales

Se realizó un muestreo de 200 becerras del CRCLT por conveniencia, se dividieron en cuatro grupos (dependiendo la edad) de 50 animales cada uno. La edad de estos varía desde los 6 días de nacidas hasta los 12 meses, de razas Holstein y Parda Suiza y propósito zootécnico reemplazos para la producción láctea en la misma cuenca. Cuadro 1

Cuadro 1. División por etapas de desarrollo de becerras.

ETAPA	EDAD (meses)	No. DE MUESTRA
Lactancia	6 días a 3	50
Desarrollo 1	4 a 6	50
Desarrollo 2	7 a 9	50
Finalización	10 a 12	50

(Se tomó la misma clasificación que tienen en el CRCLT).

Características de la región del estudio

El municipio de Tizayuca, se localiza al sur del estado de Hidalgo. Al norte colinda con el municipio de Tolcayuca, y con el estado de México en su parte este y oeste. Tiene una extensión de 287.70 Km² que representa el 1.35% del total de dicho estado. Se encuentra ubicado geográficamente en las coordenadas 19° 48' y 19° 55' de latitud norte y entre los paralelos 98° 00' y 99° 00' de longitud oeste. Su altitud sobre el nivel del mar es de 2, 271 metros. El clima de la región es típico del altiplano mexicano, su clasificación es: C(w₀) n (e)g, según la clasificación de Köeppen, que corresponde a un clima seco templado con lluvias en verano, extremoso y niebla frecuente. La temperatura mínima es de 3.4 C y la máxima de 33.3 C, con una media anual de 16.3 C; la precipitación pluvial media anual es de 600.5 mm; la temporada de lluvias se presenta en la época de verano entre los meses de junio a septiembre (Vázquez, 1995).

Características de la Cuenca Lechera de Tizayuca

El Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca S.A. (CAITSA), es una agroindustria que se encuentra ubicada en la cuenca de Tizayuca del municipio del mismo nombre en el sur del estado de Hidalgo. Está conformado por 90 socios ganaderos. La principal función de CAITSA es la producción y comercialización láctea; sin embargo, realizan diversas funciones en el mismo

complejo como producir el alimento para los animales de la cuenca, suministrar de materiales, equipos y tecnología para la producción lechera, así como proporcionar servicio médico veterinario y asesoría técnica a todos los socios que así lo soliciten. Este complejo tiene un diámetro cerrado de 216 hectáreas y 126 establos con un hato lechero total de 27,000 vacas en producción y 8,000 becerros en recría (de los cuales sólo el 25% se encuentran en el Centro de Recría de la Cuenca Lechera de Tizayuca). Entre las actividades diarias principales están las de recolectar y comercializar la leche producida por las vacas de todos los establos, la cual es del orden de 552,000 litros de leche diarios, es decir 3,870.000 litros semanales de leche, con una planta productiva de 2,340 empleos directos y 7,000 empleos indirectos. Además de las actividades antes mencionadas también tienen que incluir entre sus prioridades la crianza de ganado lechero para reemplazo, para lo cual asignaron un área específica dentro de la misma cuenca lechera y tomando en cuenta la importancia de la bioseguridad en la producción pecuaria crearon el Centro de Recría de la Cuenca Lechera de Tizayuca (CRCLT) para dicho propósito (Ramírez, 2003).

Características del Centro de Recría

El Centro de Recría de la Cuenca Lechera de Tizayuca (CRCLT) es un área protegida y aislada de los establos lecheros, situada dentro de la misma Cuenca Lechera de Tizayuca, con un diámetro aproximado de seis hectáreas rodeadas con malla ciclónica, en donde se concentran cerca de 2000 becerras de diferentes edades provenientes de once establos diferentes (Soto, 2004).

El objetivo principal y al que debe llegar el CRCLT como meta es el de incorporar a la producción lechera las becerras que tienen la edad cronológica y fisiológica (12 meses en adelante) para sustituir a las vacas que ya no son productivas en la explotación. Para lograr este objetivo llevan a cabo diversas tareas entre estas: 1) las becerras provenientes de diferentes establos, son trasladadas a partir de los seis días de nacidas al CRCLT y aisladas; 2) deben estar libres de enfermedades infecciosas antes, durante y después del tiempo que permanezcan en el CRCLT; 3) mantenerlas separadas por etapas de desarrollo de acuerdo a la edad; 4) inventario de cada uno de los animales, identificándolas y llevando una tarjeta de registro de cada una de ellas; 5) proporcionando un adecuado alojamiento y alimentación; 6) teniendo un control estricto de la vigilancia epidemiológica; inmunizando y tomando muestras para laboratorio (Soto, 2004).

Los productores de cada uno de los establos seleccionan a los animales a los 12 meses de edad que servirán para reemplazar a las vacas productoras que se encuentran en los establos y que son desechadas por diferentes causas como: disminución en la producción láctea, problemas reproductivos u otros padecimientos de índole infeccioso y no infeccioso o por la venta de dichos animales entre otras causas (Soto, 2004).

Los animales que llegan a la última etapa y entran a la madurez sexual (después de los 12 meses de edad) son inseminadas en el mismo CRCLT, donde se les permite que pasen la mayor parte de la gestación, y posteriormente son trasladadas a los diferentes establos de donde provienen para ser incorporadas a la producción después del parto (Soto, 2004).

Lactancia: las becerras en esta etapa son alojadas en naves techadas con estructura de acero, concreto y pisos de cemento. Las naves se dividen en dos salas, cada una con capacidad para 104 corraletas de madera, dispuestas en hilera. Para la alimentación de las becerras y limpieza de la nave existen dos pasillos laterales y uno central. El objeto de alojarlas en dichas naves es protegerlas del clima. Además de un lugar aislado de los establos para evitar la propagación de enfermedades (Soto, 2004).

En la parte exterior de las naves alojan a las becerras de tres meses (lactancia). Estos corrales miden 10 m² y fueron construidos de acuerdo a las características específicas con materiales adecuados: bardas y piso de concreto, puertas metálicas, protecciones tubulares, área de sombreadero con techo de lámina galvanizada que cubre 5 m² del corral, los otros 5 m² están descubiertos y funcionan como asoleadero, cuenta con arenero para descanso, comedero tipo canoa y bebedero tipo pileta (Soto, 2004).

Los corrales están separados uno del otro por una barda y puerta metálica. Por el frente de los corrales hay pasillos de 4.70 m de ancho para que pueda pasar el tractor que reparte el alimento y a los lados de los corrales las vías de acceso para camiones y automóviles (Soto, 2004).

Al nacer las terneras se les permite estar con la madre un día, con el propósito de que consuman la mayor cantidad de calostro posible, posteriormente las separan y le proporcionan alimentación asistida con dos litros de calostro por la mañana y dos litros por la tarde. Permanecen en el establo de cinco a seis días, para después ser trasladadas al Centro de Recría en donde son alojadas y alimentadas con sustituto de leche (2.5 litros por la mañana y 2.5 litros por la tarde). Adicionalmente les dan de comer concentrado iniciador con 18% de proteína cruda y maíz roado y agua ad libitum (Soto, 2004).

A los tres meses de edad son cambiadas a uno de los corrales exteriores del mismo Centro de Recría, la dieta no varía durante la estancia en esta área, sólo se adiciona forraje principalmente alfalfa y silo, el agua es ad libitum (Soto, 2004).

Se dan los mismos cuidados en cuanto a limpieza, ya que todos los días se realiza la limpieza y desinfección de las naves y corrales de crianza, y un médico veterinario lleva a cabo la vigilancia e inspección zoonosanitaria y su tarea es detectar los animales que pudiesen en determinado momento presentar alguna enfermedad para que inmediatamente sea medicado e identificar a animales sospechosos de contraer alguna enfermedad contagiosa y ser separado de los demás (Soto, 2004).

Desarrollo 1: a partir de los 4 meses de edad, son alojadas en distintos corrales, ya que provienen del lote anterior de lactancia. Los corrales son de las mismas dimensiones (10 m²) y características. En esta etapa se realizan las primeras aplicaciones de inmunización activa contra rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR); diarrea viral bovina (DBV); parainfluenza tipo 3; virus respiratorio sincitial bovino (VRSB), leptospirosis bovina (L), ya que dichas enfermedades son las que más afectan el ganado bovino de la cuenca de Tizayuca. A los 6 meses de edad se les aplica la vacuna contra Brucella cepa RB-51 (Soto, 2004).

A partir de esta etapa se destetan las becerras y se modifica nuevamente la dieta y sólo se les proporciona concentrado (15% de proteína cruda), maíz rolado, forraje como alfalfa, silo y libre acceso al agua (Soto, 2004).

Desarrollo 2: en esta etapa de crianza los animales por lo general ocupan tres corrales contiguos de 30 m² sin separación donde alojan aproximadamente 30 vaquillas. Por ser animales más grandes que los de etapas anteriores, requieren de mayor espacio, alimentación y agua. El manejo por parte de los cuidadores es menor, así como los cuidados, el problema que llegan a presentar los animales es en épocas de frío con infecciones de vías respiratorias altas y en épocas de lluvias es el encharcamiento excesivo del agua de lluvia que al mezclarse con las deyecciones de los animales contaminan el ambiente y generan el desarrollo de parásitos, moscas y en consecuencia infecciones gastroentéricas. Los animales pesan entre 180-200 kg (Soto, 2004).

Durante esta etapa se incrementa la cantidad de alimento y la proporción de nutrientes suministrados; sin embargo, la dieta no varía mucho con respecto a la etapa anterior y consiste principalmente en concentrado (13% de proteína cruda), alfalfa, silo y en ocasiones paja de maíz, sales minerales y agua ad libitum (Soto, 2004).

Finalización: esta etapa es una de las más importante para los productores, ya que de aquí se seleccionan a las vacas que sustituirán a las que están por terminar su ciclo productivo y tienen que identificar a las que están próximas a presentar su primer ciclo estral. Las vaquillas deben tener un peso inicial entre 200 a 250 kg de peso vivo. La función de los cuidadores además de proporcionarles alimentación y agua es verificar que las vaquillas lleguen a su peso final (300-350 kg) y que se encuentren en condiciones óptimas para ser inseminadas. La alimentación es la misma de la etapa anterior, lo único que cambia es la cantidad de alimento ofrecido. Cabe mencionar que a los 12 meses de edad se les aplica el refuerzo contra DVB, IBR, VRSB, Pi₃ y Leptospira (Soto, 2004).

Cepario

Se utilizó la serovariedad Hardjo genotipo Hardjoprajtino, cepa H-89, como antígeno para determinar la presencia de anticuerpos específicos contra esta

serovariedad, la importancia de evaluar la presencia de esta cepa es debida a que fue aislada por Salomón y cols. en 1989 de un feto de bovino proveniente de la Cuenca Lechera de Tizayuca en el estado de Hidalgo. Por otro lado, para identificar la presencia de anticuerpos contra otras serovariedades se utilizaron 10 serovariedades de leptospiras del cepario internacional de referencia proveniente de Australia y dos cepas más de aislamiento nacional e identificadas como serogrupo Canicola serovariedad Portland vere cepa Sinaloa ACR y serogrupo Icterohaemorrhagiae serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa Palo alto, los cuales se encuentran en el Laboratorio de Leptospira de la UAM-X cuadro 2.

Cuadro 2

Serovariedades de *Leptospira interrogans* utilizadas como antígenos en la prueba de AM**

Especie	Serogrupo	Serovariedad	Cepa
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjoprajitno	H-89*
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Pórtland- Vere	Sinaloa ACR*
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Palo Alto*
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3707
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez-Bratislava
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis	LT1085
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin

*Cepas aisladas en México

**Aglutinación microscópica OIE, OPS.

Técnica de aglutinación microscópica (AM)

Para la determinación de anticuerpos antileptospira se utilizó la técnica serológica de (AM), de acuerdo a lo recomendado por la OPS y la OIE, empleando el cepario del Laboratorio de Leptospira de la UAM-X.

Procedimiento

La prueba de aglutinación microscópica consistió en realizar diluciones dobles del suero "problema", comenzando en 1: 50 en tubos de ensayo. Para cada dilución se colocaron 2.4 ml de Solución amortiguadora de fosfato (PBS) y 0.1 ml del suero "problema", posteriormente se homogenizó dicha dilución en placas multipozitos para prueba de ELISA con 96 pocitos (12 pocitos en línea horizontal y 8 pocitos en forma vertical y se colocaron 0.05 ml de PBS en los pocitos 2 y 3, dejando el pocito 1 vacío. Después se colocó 0.05 ml del suero "problema" diluido con PBS en el pocito 1 de cada suero y en los pocitos 2 y 3 nuevamente se colocaron .05 ml del mismo suero diluido con el PBS y se

mezclaron entre sí quitando al final 0.05 ml de la dilución final. Con esto se obtuvo una dilución en placa de 1:25, 1:50 y 1:100. Por último a cada una de las diluciones se le agregó 0.05 ml de cada uno de 13 antígenos de leptospira para obtener una dilución final de 1:50, 1:100 y 1:200. Se incubaron por una hora en una cámara húmeda a temperatura ambiente y posteriormente se observó la reacción de aglutinación en microscopio de campo oscuro.

Lectura de la prueba de AM

Para realizar la lectura se empleó un asa bacteriológica calibrada, dejando caer una pequeña gota uniforme sobre un portaobjetos de vidrio limpio y se examinó el portaobjetos con el microscopio de campo oscuro con objetivo de (10x) sin cubreobjetos y oculares de 10x o 15x.

Se registró el grado de aglutinaciones de cada uno de los sueros comparándolos con el antígeno control negativo según la escala 1(+) a 4 (+), o como negativo dependiendo de la reacción. Se consideraron como positivos todos los sueros que presentaron aglutinaciones del 50% ó más en diluciones iguales o mayores de 1:100.

- Sin aglutinación e idéntico al control (-)
- Aglutinación con 75% de células libres (1+)
- Aglutinación con 50% de células libres (2+)
- Aglutinación con 25% de células libres (3+)
- Aglutinación con 0-25% de células libres (4+)

Todos los sueros que a una dilución de 1:100 reaccionaron con aglutinaciones del 50% o mayor frente a uno o más antígenos, fueron seleccionados para una segunda prueba.

Actividades realizadas

Obtención de las muestras

Se realizó la toma de muestras del primer grupo de becerras de seis días de nacidas a tres meses de edad, obteniéndose por venopunción yugular. Esto se hizo inmovilizando las becerras y extendiendo el cuello dirigiéndolo hacia el lado izquierdo o derecho dependiendo del lado que se trabajó, se localizó la vena y se puncionó para coleccionar aproximadamente 3 ml.

Para las siguientes tres sesiones se obtuvieron 50 muestras por cada etapa (animales de 4 a 12 meses de edad), se utilizó el mismo material y se recolectaron 150 muestras en total. Las muestras se recolectaron del paquete vascular coccígeo, esto se realizó inmovilizando a las becerras y levantando la cola del animal con una mano y con la otra introduciendo la aguja dentro de la primera porción de la cara ventral por la línea media de las vértebras coccígeas, para obtener de 3 a 5 ml de sangre en los tubos.

Transporte

Para obtener el suero se dejó reposar la muestra a temperatura ambiente hasta que coagulo la sangre y fueron transportadas al Laboratorio de Leptospira de la UAM-X en los mismos tubos vacutainer dentro de una hielera con refrigerantes.

Obtención del suero

Se centrifugaron las muestras hasta separar el suero del paquete celular, a 1,500 rpm durante 10 minutos y se extrajo el sobrenadante con micropipetas de 0.2 ml y posteriormente se trasvasaron a viales de 1.5 ml .

Almacenamiento

Con el propósito de preservar y evitar la contaminación de las muestras obtenidas se almacenaron y congelaron a una temperatura de -20°C , hasta el momento en que se realizó la prueba de AM.

Cultivo de antígenos de Leptospira

Para la realización de las pruebas de serología en el laboratorio, se preparó un cepario con las serovariedades antes mencionadas de la siguiente manera:

El primer paso fue preparar el medio de Cox modificado, ya que éste ofrece muchas ventajas como crecimiento rápido y seguro de las leptospiras y se ha utilizado con éxito en el laboratorio de Leptospira de la UAM-X, el segundo paso es descomplementar y filtrar el suero de conejo. Por último es la obtención de los antígenos, los cuales se utilizarán para la realización de la prueba de AM.

El cultivo de los antígenos se realizó colocando en tubos de ensayo 9 ml de medio de Cox. Éste se esterilizó a 121C por 20 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente en una campana de reflujo laminar se adicionó 1 ml de suero de conejo ya filtrado y 1 ml del antígeno, por último se colocó en una estufa a 30C y se dejó incubar por 5 a 7 días, revisándolos un día por semana para verificar que haya un crecimiento óptimo de las leptospiras y no se contamine el cultivo.

Obtención del cepario

Se obtuvieron cultivos puros del cepario de referencia, registrando el crecimiento de cada una de las cepas por medio de la observación a través de un microscopio provisto de un condensador de campo oscuro (120x) a fin de determinar la densidad, pureza y descartar posibles autoaglutinaciones y contaminación. Los sueros fueron cultivados con una batería de 13 serovariedades de *Leptospira interrogans*, del cepario de diagnóstico del Laboratorio y examinados una vez por semana.

Mantenimiento del cepario

Se resembró el cepario una vez por semana con la misma técnica. Los tubos se identificaron con el nombre de la cepa y la fecha en la cual se realizó la resiembra.

Objetivos y metas alcanzados

Se determinó con ayuda de la técnica de aglutinación microscópica en campo oscuro, que en la fase de lactancia se presentó el mayor número de sueros positivos en las becerras del Centro de Recría de la Cuenca Lechera de Tizayuca.

Se comparó la presencia de las diferentes serovariedades de *Leptospira interrogans* con la serovariedad H-89, así como los títulos de anticuerpos identificados en los sueros analizados de las becerras del Centro de Recría de la Cuenca Lechera de Tizayuca. Se determinó las serovariedades más frecuentes encontradas en los sueros de las becerras, siendo éstas la cepa H-89, Grippotyphosa, Wolffii y Pomona.

Los sueros muestreados con la prueba de aglutinación microscópica mostraron una titulación final de 1:100 y 1:200 para las serovariedades H-89, Grippotyphosa, Wolffii y Pomona en el Centro de Recría de la Cuenca Lechera de Tizayuca.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las diferentes pruebas que se llevaron a cabo para determinar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira*, no se detectó en ningún animal muestreado la posibilidad alguna de colonización de estos microorganismos en el tracto reproductivo de los animales muestreados, tampoco la sospecha de la presencia de leptospirosis en dichos animales.

Para dar una buena recomendación acerca del calendario de vacunación contra esta enfermedad, es necesario realizar más estudios en animales jóvenes; sin embargo, se puede sugerir es importante evaluar la posibilidad de aplicar dos dosis con intervalo de 41 a 21 días de diferencia en el CRCLT.

Resultados

Del total de los 200 sueros analizados en el laboratorio de leptospira de la UAM-X solamente 7.5% (15/200) fueron positivos, encontrándose contra las siguientes serovariedades: H-89, Grippytyphosa, Wolffi en la etapa de lactancia y H-89 y Pomona en desarrollo 1. En las restantes etapas fueron todos negativos (Cuadro 1). Lo que arroja como resultado final 92.5% (185/200) de seronegatividad. Los resultados finales de los sueros analizados con esas serovariedades y por etapa, se presentan en sus respectivos cuadros.

Cuadro 1
Sueros positivos de becerras a diluciones 1:50 por etapa de crianza del CRCLT*.

Etapa	Identificación	S e r o v a r i e d a d			
		H-89	Grippytyphosa	Wolffi	Pomona
Lactancia	1	-	1:200	-	
	2	1:100	-	1:100	
	3	1:200	-	-	
	4	-	-	1:200	
	5	1:200	1:200	-	
	6	-	1:200	-	
	7	-	1:200	-	
	8	-	1:200	-	
	9	1:200	1:200	-	
	10	1:200	1:200	1:100	
	11	-	1:200	-	
Positivos	11	5	8	3	0
Negativos	39				
Subtotal	50				
Desarrollo 1					
	1	1:100			-
	2	1:100			-
	3	1:200			-
	4	-			1:100
Positivos	4	3			1
Negativos	46				
Subtotal	50				
Desarrollo 2					
Negativos	50				
Subtotal	50				
Finalización					
Negativos	50				
Subtotal	50				
Total	200				

*CRCLT Centro de Recría de la Cuenca Lechera de Tizayuca

Se identificaron los sueros que reaccionaron contra la serovariedad H-89 4% (8/200). De estos, la prevalencia en la etapa de lactancia sólo fue de 10% (5/50) y en la etapa de desarrollo1 fue de 6% (3/50). Las restantes etapas fueron negativas (Cuadro 2). La dilución final fue de 1:100 3 sueros y 1:200 5 sueros (Cuadro 3).

Cuadro 2.

Sueros analizados contra H-89 por etapa de desarrollo.

Etapa	Serovariedad	+/-/total	%/+
Lactancia	H-89	5/50	10
Desarrollo 1	H-89	3/50	6
Desarrollo 2	H-89	0/50	0
Finalización	H-89	0/50	0

Cuadro 3.

Titulación final de anticuerpos contra H-89.

Etapa	Serovariedad	Titulación
Lactancia	H-89	1:100
"	H-89	1:200
"	H-89	1:200
"	H-89	1:200
"	H-89	1:200
Desarrollo 1	H-89	1:100
"	H-89	1:100
"	H-89	1:200
Desarrollo 2	H-89	-
Finalización	H-89	-

Al analizar los resultados del total de los sueros positivos contra las 12 serovariedades, se encontró que sólo el 6% (12/200) fue positivo, a las siguientes serovariedades: Grippotyphosa (8/50), Wolffi (3/50) en la etapa de lactancia y Pomona (1/50) en la etapa desarrollo 1 (Cuadro 4).

Cuadro 4.

Resultados contra las diferentes serovariedades por etapa de desarrollo.

Etapa	Serovariedad	+/total	% /+etapa
Lactancia	Grippotyphosa	8/50	16
"	Wolffi	3/50	6
Desarrollo 1	Pomona	1/50	2
Desarrollo 2		0/50	0
Finalización		0/50	0

Contra las restantes serovariedades se presentan los resultados de la siguiente forma; por etapa: en lactancia en total se identificaron 11/200 (18%), con titulaciones de 1:100 y 1:200 (Cuadro 5), cabe destacar que el rango de edad de los animales positivos fue de 6 a 25 días de nacidos. De la etapa de desarrollo1, se identificaron, 1/50 (2%) a Pomona, estos animales tenían un rango de edad de 4-6 meses. No hubo becerros positivos en las etapas restantes.

Cuadro 5.
Sueros positivos contra otras serovariedades a título.

Etapa	Serovariedad	Título
Lactancia	Grippotyphosa	1:200
"	Grippotyphosa	1:200
"	Grippotyphosa	1:200
"	Grippotyphosa	1:200
"	Grippotyphosa	1:200
"	Grippotyphosa	1:200
"	Grippotyphosa	1:200
"	Grippotyphosa	1:200
"	Wolffi	1:100
"	Wolffi	1:100
"	Wolffi	1:100
Desarrollo 1	Pomona	1:100
Desarrollo 2	-	-
Finalización	-	-

Sólo 4/15 (0.60%) reaccionaron a más de una serovariedad en la etapa de lactancia.

Cuadro 6.
Sueros positivos a varias serovariedades.

Etapa	Serovariedades		
Lactancia	H-89	Grippotyphosa	Wolffi
"	1:100	-	1:100
"	1:200	1:200	-
"	1:200	1:200	-
"	1:200	1:200	1:100

Discusión

En la Cuenca Lechera de Tizayuca (CLT) existen antecedentes de leptospirosis, demostrando serológicamente la presencia de estas serovariedades en frecuencias elevadas en hatos lecheros de donde provienen las becerras estudiadas, ya que algunos resultados encontrados en este estudio coinciden con lo mencionado. En 1991, Arteaga realizó un muestreo de 5, 186 casos de vacas abortadas, en las cuales detectó que el 41.7% fue positivo a la prueba de aglutinación microscópica, e identificó las siguientes serovariedades: L. Hardjo 91.7%; L. Pomona 48.1%; L. Icterohaemorrhagiae 31.7%; L. Canicola 29.6%; L. Grippotyphosa 17.9% (Arteaga, 1991; Torres, 1995).

Melgarejo (2002), en un estudio realizado en la CLT analizó 250 sueros de vacas que procedían de diferentes establos, los resultados que obtuvo fueron los siguientes: H-89 29.2%, Wolffi 14.8%, Pomona 6.4% y Grippotyphosa 1.6% (1).

Por otro lado Olarte y cols. (2003), realizaron un estudio comparativo de la prevalencia de diferentes enfermedades infecto-contagiosas dentro de la CLT en vacas en producción y con antecedentes de abortos, encontrando que leptospirosis es la enfermedad de mayor prevalencia con un 68% en comparación con las demás enfermedades y las serovariedades más frecuentes fueron: H-89 44.5%, Wolffi 13.6%, Pomona 8.1%, Grippotyphosa 6.3% (2).

(1) y (2) comunicación personal

Lo encontrado en estos estudios previos realizados en la CLT, coincide en cuanto a las serovariedades identificadas en esta investigación, ya que es común encontrar serovariedades como H-89, Grippotyphosa, Wolffi y Pomona en ese centro de producción, lo cual nos hace suponer lo siguiente que los sueros identificados como positivos en las becerras del CRCLT no son por contacto con leptospirosis de campo, sino que probablemente los anticuerpos detectados en los sueros de las becerras de 6 a 25 días de nacidas hayan sido transferidos vía calostro materno a las becerras (Arteaga, 1991).

Las pérdidas económicas debido a abortos y nacimientos débiles son costosas, sobre todo cuando la serovariedad Hardjo tiene la capacidad de penetrar a un hato susceptible y es la causa de dicha infección (Kingscote y cols., 1986; Radostits y cols., 2000).

Por otro lado en un estudio realizado en el CRCLT, para detectar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira interrogans*, serovariedad Hardjo cepa H-89, al utilizar dos bacterinas experimentales en becerras; encontraron que el hato en estudio fue considerado libre de leptospirosis al no encontrar un número evidente de animales positivos a la prueba de AM (Arteaga, 1991).

Con respecto a las serovariedades, Canicola, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Hardjo-bovis, Hardjo-prajitno, Palo Alto, Sinaloa ACR y Bratislava,

no se detectó ningún suero positivo, por lo que hace suponer que dichas serovariedades posiblemente no estén presentes en todos los establos de la CLT; otra posibilidad es que sí han detectados en sueros de vacas lactantes anticuerpos contra esas serovariedades, los cuales tal vez sean transferidos a las becerras mediante el calostro suministrado a las becerras, sin embargo, no todas las serovariedades estimulan la producción de cantidades suficientes de anticuerpos en un mismo animal (Dorantes, 1986; Arteaga, 1991; Lacerda y cols., 2002).

Actualmente es aceptado que de todas las serovariedades patógenas de *Leptospira* existen algunas mejor adaptadas al huésped. Los bovinos se consideran huéspedes de mantenimiento de Hardjo aunque, Pomona y Grippotyphosa también han sido asociadas con pérdidas económicas en los hatos lecheros (Gutián y cols., 2001). Wolffi a pesar de no ser especie-específica con relación al hospedero, aparentemente tiene cierta afinidad por la especie bovina (Soares y cols., 2000; Lacerda y cols., 2002).

Por etapa de desarrollo, las becerras de la etapa de lactancia del CRCLT, presentaron la mayor prevalencia de animales positivos (11/50) a las serovariedades H-89, Grippotyphosa y Wolffi en la prueba de aglutinación microscópica AM para leptospirosis bovina. En seguida la menor prevalencia correspondió a las becerras de la etapa de desarrollo 1 en la cual sólo fueron positivos (4/50) a las serovariedades H-89 y Pomona. La mayoría de las aglutinaciones ocurrieron en diluciones 1:100 y 1:200. En comparación con las otras dos etapas (desarrollo 2 y finalización), donde de 0/50 fueron positivos a dichas serovariedades en ambos grupos. La mayor incidencia ocurrió en becerras de la primera etapa de crianza, en la cual la edad de éstas osciló entre 6 a 25 días, lo cual indica que dichos resultados probablemente fueron influenciados por la presencia de anticuerpos específicos maternos, ya que en estudios realizados acerca de la transmisión de anticuerpos maternos por medio del calostro indican que éstos pueden permanecer viables hasta por 16 días o más en circulación periférica de los recién nacidos. Thiermann, mencionó que logró detectar anticuerpos calostrales por medio de la prueba de AM desde el día 1 al 31 de nacimiento de los becerros (de la Colina y cols., 1987; Vigre y cols., 2003).

Debido a que el calostro contiene varios nutrientes, lactoferrinas y vitaminas así como componentes inmunológicos, para compensar la incapacidad de los recién nacidos de no producir dichas sustancias; dentro de las 24 horas después del nacimiento deben recibir una gran cantidad de inmunoglobulinas (Ig) vía el calostro. Existe también la evidencia que proporcionando calostro de vacas inmunizadas con bacterinas contra leptospirosis a neonatos, éstos adquieren anticuerpos específicos y pueden ser detectados en el suero sanguíneo a partir de las tres horas de ingestión del calostro (Dorantes, 1986; de la Colina y cols., 1987; Yamanaka y cols., 2003).

En la siguiente etapa desarrollo1, la incidencia de presentación de sueros positivos fue menor (4/50) en comparación con la primer etapa analizada, en la cual la edad de las becerras que presentaron resultaron positivas fue de 4 meses, esto posiblemente se deba a las prácticas de manejo que se llevan a

cabo en el CRCLT, ya que a edades tempranas entre 90 a 120 días de edad son vacunadas contra leptospirosis bovina con una vacuna comercial, la explicación del por que no todos los sueros de las becerras de esta etapa resultaron positivos se debe a que tal vez por que se utilizó una dilución de 1:50 y en ocasiones no se detectan los anticuerpos post vacunales en dicha dilución y por otro lado algunas vacunas no estimulan lo suficiente al sistema inmunológico como para producir un buen numero de anticuerpos (Dorantes, 1986)

Los terneros deben ser vacunados después de que los anticuerpos maternos han disminuido a los 3 meses de edad, siendo esenciales dos dosis de vacuna para crear la inmunidad primaria. Después de la primera vacunación, las dosis de refuerzo se administran cada 6 meses. El error más frecuente que impide la inmunización eficaz consiste en administrar una sola dosis de vacuna a las novillas y después no administrarles inyecciones de refuerzo hasta 6 a 12 meses más tarde (Rebhun, 1995).

La vacunación es una medida importante para prevenir la transmisión de enfermedades entre los animales de una misma especie. El empleo de biológicos se basa en el hecho de que la inmunidad que producen éstos es serovariedad específica. Una enfermedad infecciosa induce la producción de inmunidad de tipo humoral y celular, que controla la enfermedad y por otra parte deja células de memoria que reaccionarán rápida y activamente ante un nuevo ataque del mismo agente infeccioso (Marshall y Manktelow, 2002).

En las demás etapas de análisis, se encontraron animales negativos, tanto en la etapa de desarrollo 2 como en la de finalización. En el caso de la infección por Hardjo y posiblemente por otras serovariedades, éstas aparece sólo en vacas preñadas o que se encuentren lactando, y no en animales jóvenes, debido a la preferencia de las leptospiras por colonizar el útero preñado de los bovinos, así como las glándulas mamarias de vacas lactando. Lo que coincide con lo encontrado en este estudio que a medida que avanza la crianza de los animales, no se detectan anticuerpos antileptospira, aún en animales muestreados de entre 11 y 12 meses de edad. Cabe aclarar que los animales de ésta edad aún no presentaban su primer ciclo estral (Radostits y cols., 2000)

Conclusiones

La leptospirosis es una enfermedad importante que afecta al ganado bovino y en consecuencia a los productores. En México las estimaciones basadas en estudios serológicos previos, indican prevalencias del 15 al 60%, siendo Hardjo la serovariedad más importante, ya que se encuentra mejor adaptado a su hospedero natural el bovino. En la Cuenca Lechera de Tizayuca, se han realizado diversas investigaciones para determinar la prevalencia de la enfermedad en dicho lugar y se ha detectado que muchos de los problemas reproductivos y de baja producción lechera se deben a esta enfermedad. En la CLT, el serogrupo Sejroe, serovariedad Hardjo, cepa H-89 es una de las más frecuentemente encontradas en los hatos lecheros de la cuenca, sin embargo, las becerras del CRCLT, presentaron una prevalencia baja de animales positivos en la prueba de aglutinación microscópica (AM) para leptospirosis bovina. Las serovariedades más importantes detectadas en dicho centro de crianza fueron H-89, Grippotyphosa, Wolffi y Pomona, siendo que la mayoría de las aglutinaciones ocurrieron en diluciones de 1:100 y 1:200 y únicamente en las dos primeras etapas de crianza, estos resultados sugieren que el CRCLT se encuentra libre de leptospirosis, hasta el momento de realizar dicho estudio.

Recomendaciones

Se recomienda realizar la confirmación del diagnóstico de la enfermedad por medio de la técnica de aglutinación microscópica, ya que se ha demostrado que es la prueba serológica más confiable para estos casos. También continuar con las prácticas de manejo en el CRCLT, así como implementar nuevas técnicas que mejoren la producción sin olvidar el bienestar de los animales incluyendo el mantenerlos sanos y libres de enfermedades infectocontagiosas. Entre estas practicas se encuentran: 1) el mantener aisladas a las becerras; 2) proporcionarles una buena alimentación; 3) realizar inspecciones periódicas en los corrales, con el objeto de prevenir la presencia de vectores transmisores de enfermedades como leptospirosis; 4) inmunizar adecuadamente a las becerras con biológicos de acuerdo al calendario de vacunación en dicho Centro; 5) muestrearlas regularmente y mandar a laboratorio dichas muestras para detectar y/o prevenir enfermedades a tiempo.

Literatura citada

- Arteaga T. G. 1991. Leptospirosis bovina en el Complejo Agroindustrial Tizayuca, Hgo.: Prevalencia y consideraciones epidemiológicas. Tesis de Maestría, FMVZ, UNAM. México D.F. 34-52.
- Black P.F.; Corney B.G.; Smythes L.D.; Dohnt M.F.; Norris M.A.; Symonds M.L. 2001. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in beef cattle in central Queensland. *Aust Vet J* 79:344-348.
- Bolin A.C.; Alt P.D. 1998. Clinical sign, diagnosis and prevention of bovine leptospirosis. XX World Buiatric Congress. Sidney, 6-10 July, Sidney Australia II:899-904.
- Cacchione A.R. 2001. Leptospirosis, una zoonosis perseverante. *Vet Arg XVIII*:601-605.
- Colina T.F.; Machorro M.E.; Torres B.I.; Rojas S.N. 1987. Anticuerpos antileptospira en Becerros (recién nacidos) provenientes de vacas inmunizadas con una bacterina experimental. Reunión de Investigación Pecuaria en México. Diciembre 1- 4, México D.F. 37.
- Dorantes L.A. 1986. Estudio retrospectivo de la leptospirosis en el Centro de Recría de becerras de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo, de enero de 1977 a diciembre de 1983. Tesis de licenciatura. FMVZ, UNAM. México D.F. 14-16;26-28.
- Effler V.P.; Domen Y.H.; Braga L.S.; Aye T.; Sasaki M.D. 2000. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol* 38:1081-1084.
- Fernández L. J.J.; Reyes V. V.A.; de la Peña M.A. 1993. Detección de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* en bovinos de hatos lecheros en el Valle de Atlixco, Puebla, mediante la prueba de aglutinación microscópica. *Veterinaria México* 24:47-49.
- Flannery B.; Costa D.; Pinheiro C. F.; Guerreiro H.; Matsunaga J.; Domingos D.S.E.; Gomes P.F.A.; Riley W.L.; Mitermayer G.R.; Haake A.D.; Ko L.A. 2001. Evaluation of recombinant *Leptospira* Antigen-Based Enzyme-Linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 82:3303-3310.
- Gutián F.J.; García-Peña F.J.; Oliveira J.; Sanjuán M.L.; Yus E. 2001. Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia Spain. *Vet Microbiol* 80:275-284.
- Hutter E.; Brihuega B.; Cattaneo M.L. 1997. Técnica de diagnóstico rápido para leptospirosis. *Rev Med Vet* 78:150-152.
- Kingscote F.B.; Wilson D. 1986. *Leptospira Pomona* abortion storm in a cattle herd in Saskatchewan. *Can Vet J.* 45:101
- Lacerda M.L.; Girio S.R.J.; Marchiori F.M.; Mathias A.L. 2002. Investigation of agglutinins to *Leptospira interrogans* serovar *Wolffi* in serum and whey of cows in different phases of the lactation period. *Ars Vet* 18:294-299.
- Lilenbaum W.; Monteiro R.V.; Ristow P.; Fraguas S.; Cardoso V.S.; Fedullo L.P.L. 2002. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brasil. *Res Vet Sci* 73: 319-321.

- Madigan T.M.; Martinko M.J.; Parker J. 2001. *Biología de los Microorganismos*. 8a Edi. Prentice Hall. Madrid, España. 798-799.
- Marshall R.B.; Manktelow B.W. 2002. Fifty years of leptospirosis research in New Zeland: a perspective. *NZ J* 50:61-63.
- Melgarejo E. 2004. Comunicación personal. (1).
- Molnar E.; Tavares D.H.L.; Molnar L. 2001. A comparative study between the microscopic agglutination test and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of equine leptospirosis. *Rev. Bras Med Vet* 23:151-155.
- Myers D.M. 1985. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de leptospirosis. Centro Panamericano de Zoonosis. OPS. Nota Técnica 35. Mendoza, Argentina. 23-26.
- Olarte R. 2004. Comunicación personal. (2).
- Olguín B.A. 1999. Uso de biológicos (vacunas) en ganado bovino. Curso de Uso de Biológicos en Ganado Bovino. Noviembre de 1999. FMVZ, UNAM. México D.F. 56.
- Radostits M.O.; Blood C.D.; Gay C.C.; Hinchcliff W.K. 2000. *Veterinary Medicine*. 9th Edition. Mc Graw-Hill. New York. 971-985.
- Ramírez C.R. 2003. Entrevista con leche. *Acontecer Lechero*. Sept-Nov. Vol II:54-55
- Rebhun W.C. 1995. *Enfermedades del Ganado Vacuno Lechero*. Acribia. Zaragoza, España. 611-613.
- Soares J.R.; Troncoso Ch.N.S.; Acyprestes S.C.; Souza R.L.; Quieroz S.H.; Rodrigues M.L.; Gottschalk S.; Correa F.R. 2000. Prevalence and epidemiology aspects of bovine leptospirosis in dairy herd from Goiania microregion, Goias state, Brasil. *Ciencia Rural*. 30:857-862.
- Soto R. 2004. Comunicación personal.
- Sting R.; Dura U. 1994. Isolation of serovar-specific leptospiral antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) compared with the microscopic agglutination test and immunofluorescence. *J Vet Med Berl* 41:166-175
- Tizard R.I. *Inmunología Veterinaria*, 3ª. Ed. Interamericana. México. 1989. 188-191.
- Torres A.F. 1995. Frecuencia de leptospirosis en bovinos productores de leche con problemas reproductivos en una explotación de Ixtapaluca Estado de México. Tesis de licenciatura. FMVZ, UNAM México D.F. 5-11.
- Torres B.J.; Moles y C.L.P.; Gavaldón R.D.; Rojas S.N. 1998. "Importancia de la leptospirosis como una zoonosis emergente en México". Curso teórico organizado por el Programa de Zoonosis de la Coordinación de Vigilancia Epidemiológica de la Subsecretaria de Prevención y Control de Enfermedades de la Secretaria de Salud. 20 y 21 de Julio, México D.F. 39-41.
- Torres B.J.; Sánchez M.C. 1999. Uso de biológicos (vacunas) en ganado bovino. Curso de Uso de Biológicos en Ganado Bovino. Noviembre de 1999. FMVZ, UNAM. México D.F. 24-27.

- Yamanaka H.; Hagiwara K; Kirisawa R.; Iwai H. 2003. Proinflammatory cytokines in bovine colostrum potentiate the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from newborn calves through IL-2 and CD25 expression. *Microbiol Immunol* 47:461-468.
- Vázquez C.L.M. 1995 Evaluación zootécnica de una explotación intensiva de bovinos productores de leche en la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo. Tesis de licenciatura. FMVZ, UNAM. México D.F. 6,21,25.
- Vigre H.; Ersboll A.K.; Sorensen V. 2003. Decay of acquired colostral antibodies to *actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *J. Vet. Med.* 50:430-435.