

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES AGRÍCOLAS Y PECUARIAS
(INIFAP)

Evaluación de una bacterina homóloga contra la leptospirosis bovina

Dra. Laura Elena Orozco Vega,¹ Dr. Rafael López Flores,² Dr. Luis Pedro Moles y Cervantes³ y Dr. Jorge Quiroz Valiente⁴

RESUMEN

Se utilizaron 48 hembras bovinas adultas, asignadas a 6 grupos, con el objetivo de caracterizar la respuesta inmune inducida en vacas lactantes por una bacterina homóloga formulada con diferentes adyuvantes. Se les administró por vía intramuscular 2 mL de la bacterina formulada con *Leptospira interrogans* serovares uam, wolffi, hardjo, bratislava, grippotyphosa y panama adicionada con diferentes adyuvantes como: hidróxido de aluminio, adyuvante completo de Freud, adyuvante incompleto de Freud, vitaminas liposolubles, bacterina más desparasitación con levamisol. Al grupo control solo se le administró bacterina. La inmunización se realizó en 2 ocasiones con diferencia de 28 d. Cada 7 d durante el primer mes posvacunación y posteriormente cada 28 d durante 8 meses se realizaron muestreos sanguíneos. Los sueros se analizaron por aglutinación microscópica. Los resultados se transformaron a Log₁₀ y se analizaron por medio de los procedimientos para modelos no lineales y modelos lineales generales del programa estadístico SAS. Mediante el modelo de predicción (Wood) se estimó el período de mayor respuesta. La bacterina no produjo alteración en las constantes fisiológicas, ni en producción láctea. Los serovares de *Leptospira interrogans* que indujeron mayores títulos fueron uam, hardjo y wolffi. Se determinó diferencia estadística entre tratamientos y entre serovariedades.

Palabras clave: Leptospirosis bovina, bacterina homóloga, adyuvantes, respuesta inmune, Chiapas, México.

La leptospirosis bovina produce pérdidas económicas de manera primaria por sus efectos sobre la producción, pudiendo aparecer mortinatos, abortos o nacimientos de animales débiles, o ambos, e infertilidad;^{1,2} se consideran como pérdidas secundarias por efecto de la enfermedad al síndrome de la caída de la leche o agalactia transitoria.³ Por efectos en la producción del rebaño y el hecho de ser catalogada como una zoonosis, el control de la leptospirosis merece atención especial, siendo necesaria la utilización de medidas complementarias entre sí, como son el tratamiento con antibióticos, la vacunación y profilaxis higiénico-sanitaria; con el objetivo de evitar pérdidas económicas derivadas de la introducción

de la enfermedad a una explotación. Generalmente el método primario de control en los bovinos ha sido la inmunización con bacterinas que contengan organismos completos de *L. interrogans*; utilizándose biológicos con las serovariedades presentes en la explotación.⁴ Estos productos pueden aumentar su respuesta si se les adicionan adyuvantes, los cuales son sustancias que estimulan la respuesta inmune y su duración.⁵ Asimismo, la desparasitación de bovinos con productos que contengan levamisol, potencializa la respuesta inmune humoral en animales inmunosuprimidos.⁶

Estudios previos señalan que no existe una protección cruzada entre las diferentes

¹ Maestra en Ciencias. Investigadora Titular "C". Campo Experimental Pichucalco, México.

² Médico Veterinario Zootecnista. Investigador Titular "C". Campo Experimental Pichucalco, México.

³ Maestro en Medicina Pública. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México, DF.

⁴ Maestro en Ciencias. Investigador Titular "B". Campo Experimental Huimanguillo, Tabasco, México

serovariedades de *L. interrogans*; lo que hace suponer que las bacterinas formuladas en otros países no ofrecen una adecuada protección, llegándose a confundir las reacciones serológicas,^{7,8} por lo que en el presente trabajo sus autores se propusieron caracterizar la respuesta inmune inducida en vacas lactantes por una bacterina homóloga formulada con diferentes adyuvantes.

MÉTODOS

FUNDAMENTO

El planteamiento del presente experimento tuvo como antecedente los resultados obtenidos en un estudio serológico llevado a cabo en 1 455 bovinos explotados en la Región Norte del Estado de Chiapas, en el cual se determinó 84,5 % de reactores al menos a 2 serovariedades de *L. interrogans*, donde uam (65 %), wolffi (61 %), hardjo (61 %), bratislava (14 %), grippotyphosa (10 %) y panama (10 %) resultaron las de mayor frecuencia.⁹

BACTERINA

Se formuló de acuerdo con el Manual de Requerimientos Mínimos de Calidad de los productos para uso veterinario.¹⁰ Los serovares incluidos en la formulación de la bacterina fueron uam, wolffi, hardjo, bratislava, grippotyphosa y panama, para lo cual fueron cultivados en medio líquido de Cox modificado suplementado con 8 % de suero de conejo estéril e inactivado, incubándose a 30 °C por una semana. Al obtener un crecimiento abundante, se inactivaron con formol 10 %, realizando posteriormente el conteo bacteriano con una cámara de Petroff-Hausser para obtener una concentración final de $2,8 \times 10^8$ leptospiras/mL; se distribuyeron en 6 lotes y se adicionó a cada uno los adyuvantes correspondientes.

ANIMALES

Se utilizaron 48 hembras bovinas adultas en etapa de lactancia (30 a 60 d posparto), distribuyéndose al azar en 6 grupos. Se mantuvieron en la explotación y se ordeñaron hasta que su cría cumplió 9 meses de edad.

TRATAMIENTOS

Fueron 6, integrados de la manera siguiente: I. Bacterina con hidróxido de aluminio; II. Bacterina con adyuvante completo de Freud; III. Bacterina con adyuvante incompleto de Freud; IV. Bacterina con vitaminas liposolubles emulsionada; V. Bacterina sola y desparasitación con levamisol al momento de la inmunización; y VI. Testigos, solo se les aplicó la bacterina.

INMUNIZACIÓN

Vía intramuscular, administrando 2 mL de la bacterina con el adyuvante respectivo, en 2 ocasiones a intervalo de 28 d.

SEGUIMIENTO

Muestreo sanguíneo vía yugular cada 7 d en el primer mes posvacunación, posteriormente cada 28 d durante 8 meses. Las muestras de suero se analizaron por la prueba de aglutinación microscópica.¹¹ Durante los primeros 4 muestreos se efectuaron inspecciones individuales, para identificar la posible formación de abscesos en el área de aplicación del biológico; durante todo el desarrollo del experimento se registraron los eventos reproductivos (manifestación de celo e inseminación artificial).

Los datos obtenidos en la prueba serológica se transformaron a Log_{10} para estimar la diferencia estadística significativa entre tratamientos y se analizaron por un modelo de bloques al azar, en el cual los bloques representaron el número de animales en cada tratamiento. Para el análisis de comparación de medias se utilizó la prueba de Duncan; asimismo, las medias de cada tratamiento se analizaron por medio de los procedimientos para modelos no lineales (NLIN) y modelos lineales generales (GLM) del programa estadístico SAS.¹² Se determinaron las r^2 para incluirlas en el modelo de predicción de Wood y estimar el intervalo de mayor respuesta inmune.

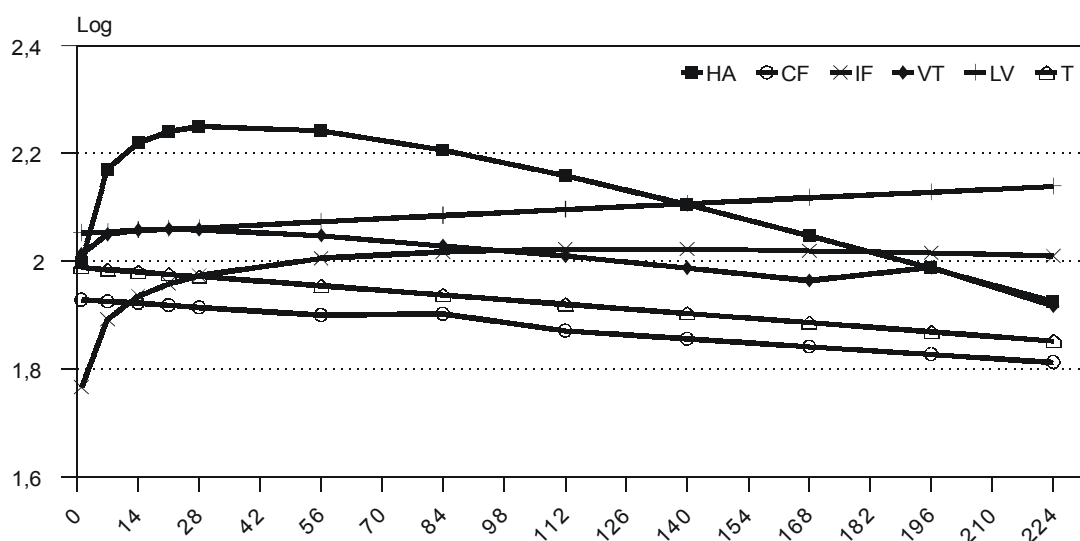
RESULTADOS

La aplicación de la bacterina no indujo la formación de abscesos en el área de inoculación.

TABLA 1. Representación de la diferencia estadística entre tratamientos

Tratamientos	Media	Significancia*
Bacterina con hidróxido de aluminio	2,07977	a
Bacterina + desparasitación con levamisol	2,02530	b
Bacterina con vitaminas liposolubles	1,98282	bc
Bacterina con adyuvante incompleto de Freud	1,96018	cd
Testigos	1,91696	de
Bacterina con adyuvante completo de Freud	1,91081	e

*Filas con distinta literal indican diferencia estadística ($p < 0,05$)



HA= hidróxido de aluminio, CF= adyuvante completo de Freud, IF= adyuvante incompleto de Freud, VT= vitaminas liposolubles, LV= levamisol, T= testigos

Fig. Respuesta inmune a la bacterina.

No se manifestaron cambios adversos en la conducta reproductiva de las vacas y la producción láctea no se modificó, manteniéndose todas en la ordeña hasta el momento de destetar a sus crías a los 9 meses de edad. Durante el desarrollo del experimento solo 3 vacas no gestaron, aun cuando manifestaron celo y se inseminaron.

En todos los tratamientos empleados se observó un incremento en los títulos de anticuerpos a partir de la segunda aplicación de la bacterina.

Se encontró diferencia estadística entre tratamientos, determinando que los mayores títulos de anticuerpos producidos correspondieron al grupo inmunizado con la bacterina adicionada con hidróxido de aluminio, seguido del grupo de animales que al momento de ser vacunado se desparasitaron mediante un producto con principio

activo sobre la base de levamisol; en tercer término se ubicó la respuesta inmune de animales inmunizados con bacterina con vitaminas liposolubles (fig.) (tabla 1).

Al analizar el efecto de las serovariedades, en cada uno de los tratamientos a que se sujetó la bacterina, la mayor respuesta correspondió a *L. interrogans* serovar hardjo, seguida por wolffi y bratislava (tabla 2).

DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que la inmunización contra *Leptospira interrogans* serovar hardjo con bacterinas tanto monovalentes como polivalentes no evitan la infección, su migración al útero y oviducto, ni los problemas

TABLA 2. Representación de la diferencia estadística entre las serovariedades de *Leptospira interrogans* empleadas en la bacterina experimental con hidróxido de aluminio

Serovariedad	Media	Significancia*
<i>Leptospira interrogans</i> , serovar hardjo	2,14270	A
<i>Leptospira interrogans</i> , serovar wolffi	2,09477	B
<i>Leptospira interrogans</i> , serovar bratislava	2,05954	B
<i>Leptospira interrogans</i> , serovar grippotyphosa	1,83733	C
<i>Leptospira interrogans</i> , serovar panama	1,82286	C
<i>Leptospira interrogans</i> , serovar uam (aislamiento nacional)	1,77075	D

*Filas con distinta literal indican diferencia estadística ($p < 0,05$)

renales debido a su persistencia y por consiguiente su eliminación por medio de la orina.^{13,14} No obstante, en los sistemas de control la vacunación sigue siendo un factor elemental, demostrándose que la inmunización permanente de todos los animales de una explotación permite el control de infecciones de *Leptospira interrogans*, serovar hardjo y por ende su erradicación.^{15,16}

Al igual que en otras enfermedades de los bovinos, la adición de adyuvantes a bacterinas contra la leptospirosis ha sido evaluada en diferentes esquemas; se tiene también la diversa combinación de serovariedades de leptospirosis empleadas para fines de inmunización, así como las pruebas diagnósticas empleadas para la cuantificación de la respuesta inmune en los animales.^{17,18}

En 1991, Banda y otros¹⁹ en un ensayo en el cual inmunizaron vaquillas con una bacterina polivalente para la cual utilizaron 2 adyuvantes, además de un inmunomodulador, determinaron que la bacterina que propició mayores títulos de anticuerpos específicos fue la que contenía vitaminas liposolubles, seguida de la adicionada con hidróxido de aluminio. El uso del levamisol en el momento de la inmunización no tuvo respuesta relevante. El serovar wolffi fue el único que manifestó respuesta inmune en los 4 tratamientos a los 90 d posvacunación.

En 1991, Cortese²⁰ informa que la inmunización con biológicos polivalentes no influye en la disminución de la producción láctea en vacas; resultado similar se observó en el presente estudio, porque todas las hembras inmunizadas no manifestaron alteraciones en su producción de leche durante su fase de lactancia.

La investigación realizada permitió la generación de un biológico para la prevención de

la leptospirosis bovina, a partir de *Leptospira interrogans* serovares uam, hardjo, wolffi, bratislava, grippotyphosa y panama, teniendo como adyuvante al hidróxido de aluminio; este biológico se presenta como una respuesta específica para la situación prevaleciente en cuanto a la leptospirosis bovina, caracterizada en la Región Norte del estado de Chiapas, México; en contraste con la respuesta inducida por las bacterinas de los laboratorios comerciales, las cuales están formuladas con serovares de *Leptospira interrogans* no presentes en la región de interés.

Evaluation of an homologous bacterin against bovine Leptospirosis

SUMMARY

48 adult bovine females divided into 6 groups were used aimed at characterizing the immune response induced in breastfeeding cows by an homologous bacterin formulated with different adjuvants. They were intramuscularly administered 2 milliliters of a bacterin formulated with *Leptospira interrogans* serovars uam, wolffi, hardjo, bratislava, grippotyphosa and panama added with different adjuvants, such as aluminum hydroxide, Freud's complete adjuvant, Freud's incomplete adjuvant, liposoluble vitamins, bacterin plus disparasitization with levamisol. The control group was administered only with bacterin. Immunization took place in 2 occasions at a time interval of 28 days. Blood samples were taken every 7 days during the first month after vaccination, and every 28 days for the next 8 months. All the sera were analyzed by the microscopic agglutination test. The results were transformed into Log_{10} and they were analyzed by NLIN and GLM of SAS. The period of greater response was estimated by the prediction model (Wood). The bacterin did not produce alteration either in the physiological constants, or in milk production. The serovars of *Leptospira interrogans* that induced higher titers were uam, hardjo and wolffi. The statistical difference between treatments and between serovars was determined.

Key words: Bovine leptospirosis, homologous bacterin, adjuvants, immune response, Chiapas, Mexico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ellis WA, O'Brien JJ, Brison DG. Bovine leptospirosis: some clinical features of serovar hardjo infection. *Vet Rec* 1985;117:101-3.
2. Ellis WA. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet Clin North Am. Food Ann Pract* 1994;10:463-8.
3. ————. Recent developments in bovine leptospirosis. *Vet Annu* 1993;23:91-5.
4. Morilla A. *Inmunología Veterinaria México*, DF:Editorial Diana; 1989.
5. Vanselow BA. The application of the adyuvants to veterinary medicine. *Vet Bull* 1987;57: 881-4.
6. Brunner CJ, Muscoplat CC. Immunomodulation effects of levamisole. *J Am Vet Med Assoc* 1980;176:1159-62.
7. Thiermann AB. Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the *hebdomadis* serogroup. *Am J Vet Res* 1982;43:780-5.
8. Reza GLC. Leptospirosis en ganaderías lecheras: diagnóstico y programa de control Acontecer Lechero 2001;1(3-4):29-34.
9. Orozco VLE, López FR, Alvarado IA, Mejía SP, Quiroz VJ. Enfermedades asociadas a problemas reproductivos del ganado bovino en Chiapas. *Conexión Sur. CONACYT* 2003;3 (6):14-8.
10. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana NOM 038-ZOO-1995: Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la leptospirosis bovina México, DF. México: Diario Oficial Nacional; 1995.
11. Myers MD. *Manual de métodos para el diagnóstico de la leptospirosis*. Washington, DC:Organización Panamericana para la Salud, Centro Panamericano de Zoonosis; (Nota Técnica No. 30.)1993.
12. Barr AJ, Goodnight JH. *Statistical Analysis Systems Version 6*; North Caroline State University Raleigh: Department of Statistics, 1972.
13. Bolin CA, Casselld HA, Phil B, Zuerner RL, Trueba G. Effect of vaccination with a monovalent leptospira interrogans serovar *hardjo* type *hardjo*-bovis vaccine on type *hardjo*-bovis infection of cattle. *Am J Vet Res* 1991;52:1639-43.
14. Bolin CA, Thiermann AB, Handsaker AL, Foley JW. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo* bovis infection in pregnant cattle. *Am J Vet Res* 1989;50:161-5.
15. Little TWA, Hathaway SC, Broughton ES, Seawright D. Control of *Leptospira hardjo* infection in beer cattle by whole herd vaccination. *Vet Rec* 1992;131:90-2.
16. Ellis WA, O'Brien JJ Nelly SD. Bovine leptospirosis: experimental serovar hardjo infection. *Vet Microbiol* 1986;11:293-5.
17. Brunner CJ, Muscoplat CC. Immunodulation effects of levamisole. *J Am Vet Med Assoc* 1980;176:1159-63.
18. Confer AW, Hall SM, Espe BH. Transient enhancement to the serum antibody response to *Brucella abortus* strain 19 in cattle treated with levamisole. *Am J Vet Res* 1981;46:2440-44.
19. Banda RVM, Loza RE, Mejía SP. Eficiencia del hidróxido de aluminio, vitaminas liposolubles y levamisol, empleados en una bacterina de *Leptospira* en vaquillas, para la generación de anticuerpos específicos. *Técnica Pecuaria México* 1991;29(3):139-43.
20. Cortese VS. Effects on milk production by a nonabortigenic vaccine for prevention of respiratory and reproductive system diseases in cattle. *Agri Practive* 1991;12(6):21-6.

Recibido: 27 de diciembre de 2004. Aprobado: 10 de marzo de 2005.

Dra. Laura Elena Orozco Vega. Campo Experimental Pichucalco, Km 8 carretera Pichucalco-Teapa, CP 29520 Pichucalco, Chiapas, México. (52) 932 32 70573. Correo electrónico: leorozco@yahoo.com.mx; rafa_lf@yahoo.com.mx; lpmoles@yahoo.com; jquiroz@141.com