

## ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL DE BOVINOS CEBÚ ANTE UNA VACUNA MULTIVALENTE CONTRA LA LEPTOSPIROSIS BOVINA

Study of the Humoral Immune Response of Zebu Cattle to  
Multivalent Bovine Leptospiral Vaccine

Karen Clerc P.\*<sup>1</sup>, Liliana Aidorevich de A.\*\* , Miguel Tirado A.\* y  
Carmen Tovar\*\*

*\*Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento Médico Quirúrgico, Cátedra de Medicina Aplicada. Universidad Central de Venezuela. Apartado 4563, Maracay 2101A, Estado Aragua, Venezuela. \*\*Instituto de Investigaciones Veterinarias, INIA. Laboratorio de Leptospirosis. Maracay, Estado Aragua.*

Correo-E: karenclerc@yahoo.com

Recibido: 17/02/04 - Aprobado: 03/12/04

### RESUMEN

La infección por *Leptospira* en los bovinos provoca pérdidas económicas significativas a la industria ganadera y representa un importante riesgo de salud pública. Las *Leptospira* son bacterias invasoras sistémicas y la protección en su contra se logra principalmente, mediante la producción de anticuerpos estimulados por la aplicación de bacterinas y los mismos pueden ser medidos. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la respuesta inmune humoral de un grupo de toretes cebú ante una bacterina comercial polivalente contra la Leptospirosis Bovina. Para ello se utilizaron 76 toretes cebú con edades comprendidas entre 1,5 y 2,5 años sometidos a las mismas condiciones sanitarias y de manejo. La bacterina utilizada contenía los serovares Canicola, Ballum, Grippytyphosa, Pomona, Hardjo e Icterohaemorrhagiae, y se aplicó en las semanas 1, 4 y 26 del ensayo, tomando

### ABSTRACT

Bovine leptospiral infections cause significant economic losses in the cattle industry, representing an important public health risk. Protection against these systemic invasive bacteria is achieved mainly by quantifying antibodies stimulated by bacterin application. The main objective of this paper was to evaluate the humoral immune response of a group of 76 zebu bulls (17-29 months), raised under the same sanitary and husbandry conditions. A polyvalent commercial bacterin containing Canicola, Ballum, Grippytyphosa, Pomona, Hardjo and Icterohaemorrhagiae serovars, was applied at weeks 1, 4 and 26 of the trial. Blood samples were drawn at weeks 1, 4, 13, 26 and 43. A microscopic agglutination test was used to determine antibodies titers, observing a mean increase in titers of 1/400 in vaccinated animals. All serovar-induced titers disappeared between weeks

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (Corresponding Author).

como semana 1 el inicio del mismo. La toma de las muestras para serología se realizó en las semanas 1 (previa a la primera vacunación), 4, 8, 13, 26 y 43. Los títulos de anticuerpos se determinaron por la técnica de Aglutinación Microscópica. La bacterina utilizada produjo una respuesta inmune humoral en los bovinos tratados, observándose un incremento de títulos promedio hasta 1/400. Los títulos inducidos por todos los serovares desaparecieron entre las semanas 15 y 17 luego de la segunda y tercera dosis de bacterina. El número de animales que respondió a la primera dosis de bacterina fue mayor que para la segunda dosis, pero los mayores títulos de anticuerpos se observaron luego del refuerzo. No se observó diferencia en la duración de los títulos entre la primera aplicación más refuerzo (semanas 0 y 4) y la aplicación de una sola dosis (semana 26). En el caso del serovar Hardjo, no se pudo determinar si los anticuerpos previos a la aplicación de la bacterina eran vacunales o por infección previa; sin embargo, la curva de respuesta a la vacunación se comportó de forma similar al resto de los serovares, aunque con mayores títulos atribuibles a una respuesta de memoria.

(Palabras clave: Ganado bovino, Cebu, *Leptospira*, respuesta inmunológica, zoonosis, vacuna, Yaracuy.)

## INTRODUCCIÓN

La leptospirosis bovina es una enfermedad infecciosa con alta morbilidad y baja mortalidad, causada por uno o varios serovares de *Leptospira interrogans* y se caracteriza por producir septicemia, aborto, mastitis y nacimiento de crías débiles en los bovinos (Contreras, 1992; Blood *et al.*, 1996; Merk, 1988; Radostits *et al.*, 1999). En Venezuela, los serovares

15 and 17 after second and third application. Greater numbers of animals responded to the first rather than to the second bacterin dosage, but the highest titers of antibodies was observed after the boost. No difference in titer endurance was observed between the boosted first dose (weeks 1-4) and a single dose (week 26). In the Hardjo serovar case, it could not be established whether or not the antibodies titers present before the application of the bacterin, were due to vaccination or to infection, nevertheless the response to the vaccination behaved similarly in all other serovars, although with higher titers attributed to a memory response.

(Key words: Cattle, Zebu, *Leptospira*, immune response, zoonoses, vaccines, Yaracuy.)

de *Leptospira* aislados en bovinos son Ballum, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Pomona y Grippothyphosa (Jelambi *et al.*, 1984; Jelambi y de Aguirre, 1991; Contreras, 1992; Márquez y Fossi, 1996).

La infección por *Leptospira* en los bovinos provoca pérdidas económicas significativas a la industria ganadera y representa un importante riesgo como fuente de infección para el hombre, a través del agua

o alimentos contaminados; la Leptospirosis es considerada una enfermedad antropozoonótica (Merchant y Packer, 1980; Ellis, 1986; Biberstein y Chung, 1994; Heath y Johnson, 1994; Lugo, 1996). Los reservorios naturales predominantes de las *Leptospira* patógenas son los mamíferos salvajes, perros, bovinos, cerdos, ovinos, caprinos y equinos, siendo los roedores los portadores más frecuentes (Biberstein y Chung, 1994), por lo tanto, la única forma práctica de controlar la enfermedad, es a través de la inmunización contra los serovares prevalentes en cada especie (Ellis, 1986; Biberstein y Chung, 1994; Radostits *et al.*, 1999).

Las *Leptospira* son bacterias invasoras sistémicas y la protección contra este tipo de agentes suele lograrse mediante anticuerpos dirigidos contra los antígenos de superficie de la bacteria (lipopolisacárido leptospiral, LPS) y a través del complemento y la lisozima. Sin embargo, cuando pasan a los riñones pueden evadir el sistema inmune al ser secuestradas en los túbulos renales, en el lumen uterino o en los lugares inmunológicamente protegidos como el cerebro y los ojos (Heath y Johnson, 1994).

Una vez han penetrado al organismo, por vía directa o indirecta, transcurren de 4 a 10 días del período de incubación o fase de leptospiremia, en la cual los organismos viajan por la corriente sanguínea colonizando especialmente al hígado y riñón (Biberstein y Chung, 1994; Clerc *et al.*, 2002). Cuando se produce la infección, la respuesta inmune es principalmente humoral, formándose anticuerpos contra las bacterias que pueden reaccionar con antígenos comunes a todas las *Leptospira* (anticuerpos aglutinantes inespecíficos) y con antígenos específicos de los serogrupos y/o serovares (anticuerpos aglutinantes específicos). Los niveles de anticuerpos aglutinantes inespecíficos disminuyen más

rápidamente que los anticuerpos específicos. En algunos casos, durante la fase inicial de la infección, los anticuerpos no reaccionan específicamente contra el serovar que la está originando, sino que se produce una reacción cruzada con otros serovares; esto es lo que se conoce como "Reacción Paradójica" (Hartskeerl *et al.*, 2000). Por otra parte, se han realizado estudios que demuestran la participación de la inmunidad celular en la respuesta al agente; sin embargo, el grado de participación de la misma aún no está claro (Faine *et al.*, 1999).

La respuesta inmune humoral de un animal puede ser medida por la cantidad de anticuerpos protectivos detectados en el suero, independientemente que se produzcan como respuesta a una inmunización o a una infección (Faine *et al.*, 1999). La determinación de anticuerpos contra *Leptospira* se puede realizar a través de la Técnica de Aglutinación Microscópica (Microscopic Agglutination Test, M.A.T.). Esta técnica es la más utilizada para el diagnóstico de Leptospirosis y es la prueba recomendada por la OMS por su especificidad, ya que es serovar específica (Myers, 1985; Aidorevich, 1989; Smith *et al.*, 1994). Se emplea para detectar anticuerpos leptospirales en el suero, identificar los aislados de *Leptospira* y clasificar cepas, además de servir de base para evaluar cualquier otro método serológico nuevo para el diagnóstico de la enfermedad, por ser la prueba de referencia (Myers, 1985). En general, la especificidad de ésta prueba es alta, pero su sensibilidad declina a medida que pasa el tiempo entre la infección y la toma de la muestra. Mediante ésta técnica no es posible diferenciar anticuerpos vacunales de infecciosos, cuando éstos tengan rangos similares; sin embargo, los títulos post-infección son mayores y duran más tiempo que los post-vacunales (Smith *et al.*, 1994). Los

títulos superiores a 1/100 se consideran positivos, pero deben tomarse en cuenta una serie de consideraciones antes de emitir un diagnóstico definitivo.

Se ha demostrado que las bacterinas contra la leptospirosis bovina producen bajos títulos de anticuerpos detectables por serología (Stringfellow *et al.*, 1983). Las bacterinas comerciales disponibles, proveen inmunidad contra los 6 serovares prevalentes en dicha especie. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la respuesta inmune humoral de un grupo de toros cebú ante una bacterina comercial multivalente contra la leptospirosis bovina, permitiendo determinar la respuesta del sistema inmune humoral de los animales y verificar la prevalencia de los anticuerpos antileptosirales en el tiempo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Área de estudio*

Esta investigación se realizó en una finca de ganado de carne ubicada en el municipio San Felipe del estado Yaracuy, la cual presenta pastos introducidos debidamente mantenidos, destacándose las especies de *Bracharia* y *Cynodon dactylon*. La fase experimental se realizó entre mayo de 2000 y abril de 2001.

### *Población y muestra*

Se seleccionaron 76 toretes provenientes de 16 ganaderías diferentes, comprendidos entre 1,5 y 2,5 años de edad y se mantuvieron bajo las mismas condiciones de manejo durante todo el ensayo. Todos fueron animales puros registrados de las razas: Brahman (52), Guzerá (16) y Nelore (8). La alimentación se basó en pastoreo con suplementación mineral *ad libitum* y se aplicó un programa sanitario completo a toda la población muestreada.

### *Bacterina*

Para la vacunación se empleó una bacterina comercial polivalente contra la leptospirosis bovina, elaborada con bacterias vivas atenuadas de los serovares Canicola, Pomona, Ballum, Hardjo, Icterohaemorrhagiae y Grippotiphosa, utilizando Hidróxido de Aluminio como adyuvante.

### *Vacunación de los animales*

Los animales se vacunaron al iniciar el ensayo, considerando dicho momento como la semana 1. Siguiendo este esquema, la vacunación de los animales se llevó a cabo en las semanas 1, 4 y 26 del ensayo.

### *Toma de las muestras*

Las muestras de sangre sin anti-coagulante para serología se tomaron en las semanas 1, 4, 8, 13, 26 y 43 del ensayo, siguiendo el mismo esquema de semanas utilizado para la vacunación.

### *Determinación de anticuerpos por microaglutinación*

Para determinar los títulos de anticuerpos se aplicó la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) por su alta especificidad en el reconocimiento de los serovares, y por ser la prueba oficial de diagnóstico recomendada por la OMS. La prueba se realizó según la técnica descrita por Myers (1985). Todas las muestras de los animales fueron procesadas a través de esta técnica.

## RESULTADOS

Los resultados de la serología están expresados en la Tabla 1. Las muestras tomadas en la semana 1 (previa vacunación), presentaron títulos para los serovares

Hardjo (24 animales), Pomona (1 animal) e Icterohaemorrhagiae (5 animales). De los 24 animales que presentaron títulos prevacunales para Hardjo, 3 individuos reaccionaron 1/800, y 21 individuos tuvieron títulos entre 1/100 y 1/400. Para *Pomona*, el animal reaccionante tuvo títulos de 1/200 y los 5 animales que reaccionaron para Icterohaemorrhagiae, lo hicieron con títulos de 1/100.

Luego de las tres dosis de bacterina, el patrón de incremento y caída de los títulos de anticuerpos fue básicamente similar para todos los serovares, excepto para Hardjo que alcanzó los mayores títulos en cada una de las vacunaciones.

La primera dosis de bacterina aplicada en la semana 1 estimuló la respuesta de anticuerpos con rangos entre 1/100 y 1/400 y respondieron entre 21 y 64,5% de los animales; los serovares Ballum, Hardjo, Icterohaemorrhagiae y Pomona alcanzaron títulos de 1/400, mientras que Grippotyphosa produjo 1/200 y Canicola 1/100.

El refuerzo aplicado a la cuarta semana provocó un incremento de los títulos de anticuerpos hasta 1/1600 para Hardjo, 1/800 para Icterohaemorrhagiae, 1/400 para Ballum y Pomona, 1/200 para Grippotyphosa y 1/100 para Canicola. En

Tabla 1. Número de animales negativos (N) y con títulos de anticuerpos contra serovares de *Leptospira* determinados por MAT, en las semanas 1, 4, 8, 13, 26 y 43 del ensayo

Toma de las Muestras	N	L. Ballum	
		100	200
Semana 1 *	76	-	-
Semana 4 *	27	24	18
Semana 8	42	29	4
Semana 13	37	25	12
Semana 26 *	76	-	-
Semana 43	67	5	2

	N	L.
		100
Semana 1 *	75	-
Semana 4 *	35	15
Semana 8	60	10
Semana 13	69	4
Semana 26 *	68	2
Semana 43	76	-

(\*): Vacunación  
 (100, 200, 400, 800, 1600): diluciones de los sueros  
 N: animales negativos

ésta oportunidad el porcentaje de animales que respondió con aumento de títulos de anticuerpos fue entre 21 y 45%.

En los siguientes muestreos (semanas 13 y 26), los títulos de anticuerpos se mantuvieron entre 1/100 y 1/400 para todos los serovares, excepto Ballum que no reaccionó en el último análisis (semana 26).

La respuesta a la tercera dosis de bacterina aplicada en la semana 26, fue evaluada en la semana 43 y se observaron títulos de anticuerpos de 1/400 para Ballum en el 12% de los animales y 1/200 para Hardjo en el 12% de la población en estudio. El resto de los serovares no reaccionaron 17 semanas después de la tercera dosis de bacterina.

## DISCUSIÓN

Con base a los resultados obtenidos en el muestreo realizado en la semana 1 previa vacunación, se puede inferir que los títulos de anticuerpos obtenidos en los subsiguientes muestreos fueron vacunales y no por infección, excepto para el serovar Hardjo, ya que los animales con títulos previos no permitieron conocer si la respuesta inmune humoral ocurrió por vacunación o por una infección previa. Para el resto de los serovares si fue evidente que hubo una respuesta humoral a la aplicación de la bacterina, siendo mayor el número de animales que respondió a la primera dosis aunque los mayores títulos de anticuerpos se obtuvieron luego del refuerzo (segunda dosis) aplicado en la semana 4. Ris y Hamel (1982), obtuvieron resultados similares al vacunar 2 grupos de vacas con dos bacterinas diferentes y en ambos lotes observaron un incremento mayor de títulos luego del refuerzo aplicado un mes después de la primera vacunación.

Los títulos de anticuerpos se mantuvieron altos 5 semanas después de la aplicación del refuerzo (semana 13) y fueron disminuyendo progresivamente hasta la semana 26 donde se aplicó la tercera dosis, observándose un discreto aumento de títulos expresado en los resultados del muestreo realizado en la semana 43. Esto nos indica que los títulos de anticuerpos en respuesta a la bacterina utilizada se mantuvieron aproximadamente por 15 a 17 semanas, independientemente de aplicar una dosis con refuerzo (semanas 1 y 4) o una dosis única (semana 26). Estos resultados coinciden con otras investigaciones llevadas en animales de 6 meses a los cuales se les aplicó primovacuna y refuerzo contra Hardjo y Pomona y los títulos de anticuerpos obtenidos luego de la segunda dosis de bacterina fueron mayores que en la primera dosis y duraron aproximadamente por 15 semanas (Schollum y Marshall, 1985). En estudios realizados con otras bacterinas comerciales, se observaron respuestas inmunes humorales con títulos de 1/200 que disminuyeron a 1/100 apenas 60 días después de la vacunación, aplicando una sola dosis de bacterina (Bolin y Alt, 2001).

En el caso del serovar Hardjo, se obtuvo una respuesta similar al resto de los serovares haciendo la salvedad de que la presencia de títulos previos a la vacunación no nos permitió determinar si el incremento de títulos ocurrió por efecto de la bacterina o por una respuesta de memoria inducida por una infección previa (Ris y Hamel, 1982; Stingfellow *et al.*, 1983) lo que le permitió alcanzar los mayores títulos postvacunales. Sin embargo, el comportamiento de la respuesta inmune humoral para Hardjo fue similar al resto de los serovares luego de las tres vacunaciones.

Las Figuras del 1 al 6 representan los títulos de anticuerpos contra *Leptospira* para cada uno de los serovares en estudio.

les tratados, observándose un incremento de títulos de anticuerpos promedio hasta 1/400. Los títulos de anticuerpos inducidos por todos los serovares desaparecieron entre las semanas 15 y 17 luego de la segunda y tercera dosis de bacteria. El número de animales que respondió a la primera dosis de bacteria fue mayor que

CONCLUSIONES

La bacterina utilizada produjo una respuesta inmune humoral en los anima-

Figura 1. Respuesta inmune humoral al serovar Hardjo

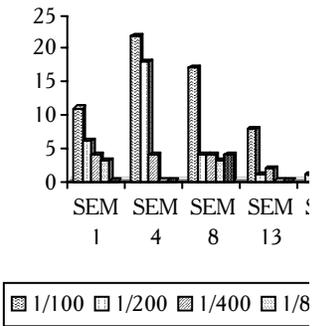


Figura 2. Respuesta inmune humoral al serovar Ballum

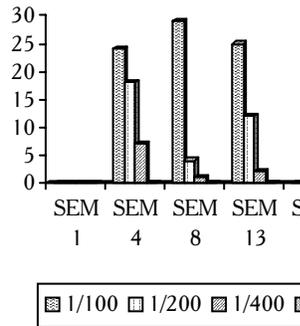


Figura 3. Respuesta inmune humoral al serovar Pomona

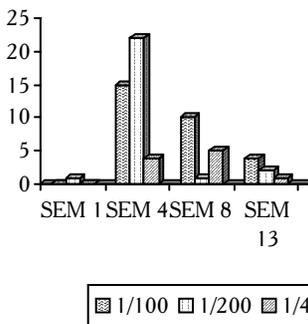


Figura 4. Respuesta inmune humoral al serovar Canicola

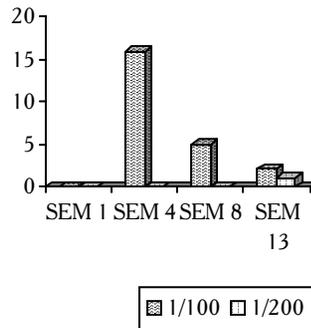


Figura 5. Respuesta inmune humoral al serovar Grippotiphosa

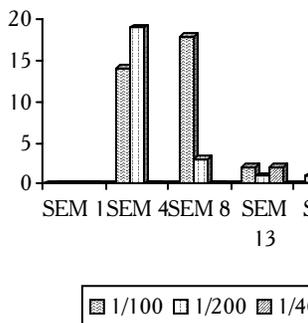
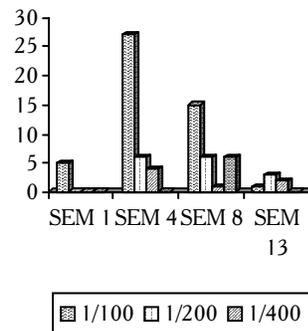


Figura 6. Respuesta inmune humoral al serovar Icterohaemorrhagiae



para la segunda dosis, pero los mayores títulos de anticuerpos se observaron luego del refuerzo (segunda dosis). No se observó diferencia en la duración de los títulos de anticuerpos en el tiempo entre la primera aplicación más refuerzo (semanas 0 y 4) y la aplicación de una sola dosis (semana 26). En el caso del serovar Hardjo, no se pudo determinar si los anticuerpos previos a la aplicación de la bacterina eran vacunales o por infección previa; sin embargo, la curva de respuesta a la vacunación se comportó de forma similar al resto de los serovares, aunque con mayores títulos atribuibles a una respuesta de memoria. A través del análisis de los resultados obtenidos con éste trabajo, se puede recomendar que la bacterina puede aplicarse cada tres meses, revacunando a los animales primovacunados a los 21 días, para lograr una protección adecuada en contra del agente causal.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis A. Vásquez, REBIOTEC, S.A., empresa rental de la UCV, por el acceso a la población animal; Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), por el procesamiento de las muestras; Estancia «Las Mercedes» finca piloto del ensayo; Asociación de Criadores de Ganado Cebú (ASOCEBU), por permitirnos la participación en la IX Prueba de Ganancia de Peso en la cual intervinieron los animales del estudio.

#### REFERENCIAS

Aidorevich de A., L. 1989. Procedimientos diagnósticos para la Leptospirosis bovina. *I Foro Nacional sobre Leptospirosis Bovina*. Memorias. Universidad del Zulia. Venezuela.

- Biberstein, E.; Chung, Y. 1994. Tratado de Microbiología Veterinaria. Editorial Acribia. España. pp 267-273.
- Blood, D.; Radostits, O. y Henderson, J. 1996. Medicina Veterinaria. Enfermedades causadas por bacterias. Séptima edición. Editorial Interamericana. México. pp 740-751.
- Bolin, C.; Alt, DP. 2001. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Am J Vét Res.* 62: 995-1000.
- Clerc, K.C.; Aidorevich, L.; Tkachuk, O. y Márquez, N. 2002. Aislamiento de *Leptospira interrogans* en vacas mestizas Hosltein en el municipio Girardot del estado Aragua. *Rev Fac Cs Vets UCV.* 43(2):95-105.
- Contreras, J.A. 1992. Enfermedades de los Bovinos. Enfermedades causadas por bacterias. Editora Rapidit. Lara, Venezuela. pp 435-448
- Ellis, W. 1986. Effects of leptospirosis on bovine reproduction. En: *Current Therapy in Theriogenology 2*. Morrow, D. Ed. Saunders. United States of America. pp 267-271.
- Faine, S.; Adler, B., Bolin, C. and Perolat, P. 1999. *Leptospira* and Leptospirosis. Segunda edición. Editorial MediSci. Australia.
- Hartskeerl, R.A.; Smits, H.L.; Korver, H.; Goris, M.G. and Terpstra, W.J. 2000. International Course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. Royal Tropical Institute, Department of Biomedical Research. Amsterdam, Holanda.
- Heath, S. and Johnson, R. 1994. Leptospirosis. *J Am Vet Med Assoc.* 205:1518-1523.
- Jelambi, F.; A. De Aguirre, L.; Mazzonelli, J.; Padilla, C.; De Aponte, F. y

- Rodríguez, R. 1984. La Leptospirosis bovina en Venezuela. *Revista Asogal* 8:13-15.
- Jelambi, F.; Aguirre, L. 1991. Evaluación de una vacuna contra la Leptospirosis bovina elaborada en un medio con bajo contenido de proteína. *Resumen de Jornadas Técnicas*. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Publicación especial No. 25. Venezuela.
- Lugo, A. 1996. Epidemiología de la Leptospirosis. *Memorias del I Taller Regional sobre Leptospirosis Bovina*. Sur del Lago. Venezuela.
- Márquez Q.N. y Fossi, H. 1996. La leptospirosis como una de las principales enfermedades reproductivas de los bovinos. *Memorias del I Taller Regional sobre Leptospirosis Bovina*. Sur del Lago. Venezuela.
- Merchant, I. y Packer, R. 1980. Bacteriología y Virología Veterinarias. Tercera edición. Editorial Acribia. España. pp 503-513.
- Merck. 1988. El manual Merck de Veterinaria. Afecciones generalizadas. Tercera edición. Editorial Centrum. España. pp 437-442.
- Myers, D. 1985. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. *Centro Panamericano de Zoonosis*. Nota técnica No. 30. OPS, OMS.
- Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C.; and Hinchcliff, K.W. 1999. Medicina Veterinaria. Novena edición. Editorial Mc Graw Hill. España.
- Ris, D.R. and Hamel, K.L. 1982. «An unusual serological response in cattle after use of a commercial leptospiral combined hardjo-pomona vaccine». *N Z Vet J*. 30:115-116.
- Schollum, L.M. and Marshall, R.B. 1985. Age and ability of calves to respond to a leptospiral vaccine. *N Z Vet J*. 33:146-147.
- Smith, C.; Ketterer, P.; Gowan, M. and Corney, B. 1994. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in cattle. *Aust Vet J*. 71:290-294.
- Stringfellow, D.A.; Brown, R.R.; Hanson, L.E.; Schnurrengerger, P.R. and Johnson J. 1983. Can antibody responses in cattle vaccinated with a multivalent leptospiral bacterin interfere with serologic diagnosis of disease?. *J Am Vet Med Assoc*. Jan 15;182:165-7.