

Estudio sobre fijación del complemento en el diagnóstico de portadores asintomáticos de la anaplasmosis bovina

CARLOS ESPAÑA

Profesor de la Escuela de Medicina Veterinaria. Jefe del Proyecto sobre Anaplasmosis. Universidad de Pennsylvania, E.U.A. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G. México.

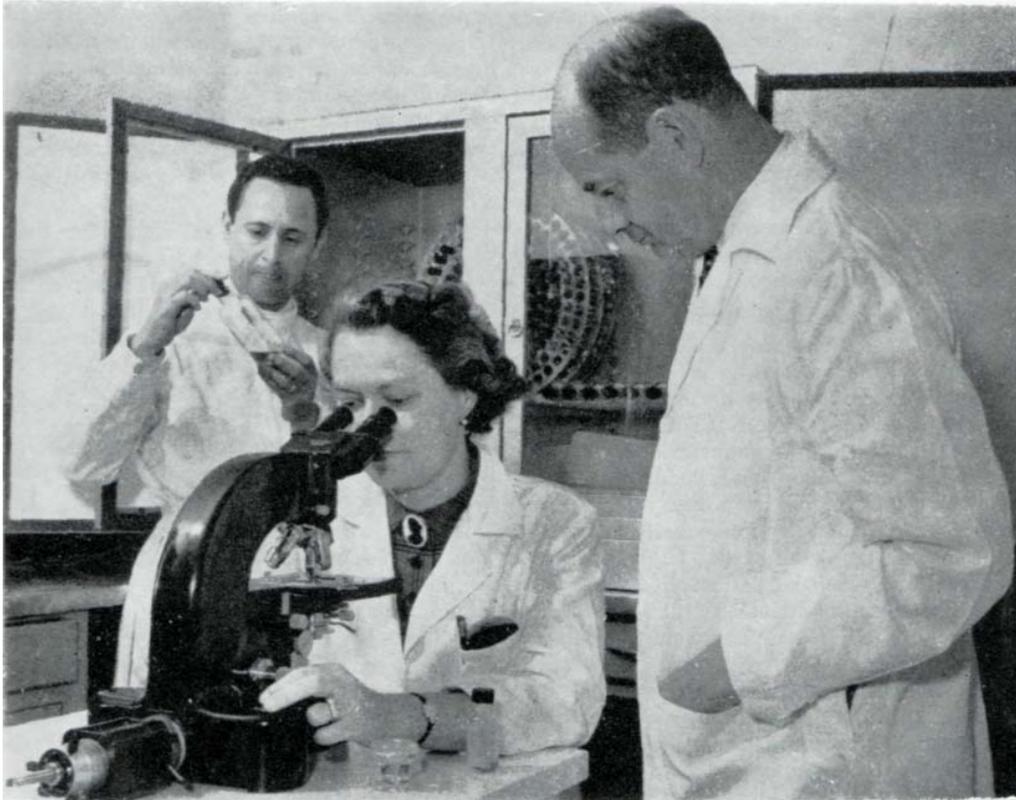
De acuerdo con los estudios realizados por varios investigadores se puede deducir que, tanto la piroplasmosis como la anaplasmosis bovinas, fueron introducidas en el continente americano por los conquistadores españoles. Theiler, en 1910 (1), observó por primera vez en los eritrocitos de los animales enfermos, en África del Sur, cuerpos redondeados que se coloreaban en azul oscuro o púrpura con los colorantes del tipo del Romanowski y a los cuales designó con el nombre de *Anaplasma marginate* y en 1911 (2), describió una variedad a la que llamó *A. marginole* var. *centrale*. Se distinguen estos dos parásitos por la posición dentro del eritrocito, la severidad del cuadro clínico que producen y por la incapacidad del *A. centrale* de producir una inmunidad completa contra el *A. marginale*.

La anaplasmosis se transmite en la naturaleza por varias especies de garrapatas, tábanos, moscas de establo y por algunas especies de mosquitos. También es de gran importancia práctica, en la transmisión mecánica de la enfermedad, el uso indiscriminado de instrumentos no esterilizados en las intervenciones quirúrgicas del campo (castración, descornado, punciones), en vacunaciones o inyecciones con la misma aguja a varios animales y aun el uso incorrecto del narigón.

El anaplasma puede atacar a cualquier raza de bovino. Los animales menores de un año son más resistentes a la enfermedad que los animales adultos. El período de incubación es variable, dependiendo de varios factores (edad del animal, virulencia del parásito, método de transmisión, etc.) pero, por lo general,

fluctúa entre 28 y 45 días. La enfermedad se caracteriza por la aparición de fiebre, anorexia, debilidad intensa, anemia profunda y palidez marcada de todas las membranas mucosas visibles. Los síntomas pueden variar en intensidad y la recuperación es muy lenta. Cuando la enfermedad dura varios días los tejidos del animal se vuelven ictericos. En algunos brotes epidémicos, la mortalidad puede llegar hasta un 50% de los animales afectados. Se define a los portadores como animales que han padecido la enfermedad y se han recuperado. Aunque en algunas ocasiones los portadores pueden sufrir periódicamente recidivas, con la aparición de numerosos anaplasmas en la circulación periférica y síntomas clínicos, por lo general los portadores son asintomáticos. Son precisamente estos animales los reservorios importantes de la enfermedad y constituyen una amenaza constante a los animales sanos. Ya que no existe ningún tratamiento específico ni vacuna eficaz para controlar la enfermedad, es indispensable que los portadores sean identificados y eliminados del rebaño. Se ha comprobado que la separación de los animales sanos de los portadores, ha dado como resultado la disminución y aún desaparición de nuevos brotes en aquella; áreas donde no existen artrópodos transmisores (garrapatas, tábanos, etc.).

La distribución geográfica de la anaplasmosis bovina es mucho más extendida de lo que originalmente se suponía. Se ha reconocido la enfermedad como un problema económico importante en Asia, el Sur de Europa, la mayor parte de África, toda América Latina y



Un método de diagnóstico de animales portadores de anaplasmosis consiste en el examen Macroscópico de muestras de sangre en el laboratorio.

los Estados Unidos de Norte América. En este último país, la anaplasmosis se ha encontrado en 38 de los 51 estados y las pérdidas anuales, basadas en cálculos de mortalidad, ascienden a cientos de millones de pesos, mientras que las pérdidas en producción sobrepasan los mil millones de pesos. En México, aunque se sabe que la enfermedad se encuentra muy diseminada y que las pérdidas anuales deben ser enormes, no existen datos precisos en cuanto a su incidencia. Hasta hace poco, el diagnóstico de la enfermedad se hacía solamente de los casos agudos, ya sea clínicamente o por observación microscópica de la sangre teñida con Wright o Giemsa. La incidencia del portador se desconocía por completo, ya que éste no puede identificarse por los métodos mencionados; solamente el diagnóstico serológico

permite reconocer a los portadores "sanos". Es por esta razón que en los últimos 10 años, varios investigadores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) han trabajado intensamente en el desarrollo y estandarización de la reacción de fijación del complemento para el diagnóstico de la anaplasmosis y muy en particular, del portador "sano". El antígeno consiste, de acuerdo con estos investigadores, de la fracción antigénica de eritrocitos usados obtenidos de un caso muy agudo de anaplasmosis bovina y con un contenido bajo de hemoglobina. En nuestra experiencia, sin embargo, tanto las muestras de antígenos que se nos han enviado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, como los antígenos de este tipo preparados en nuestro laboratorio, han

dado resultados poco satisfactorios. El antígeno es bastante anticomplementario, poco estable y con un contenido de hemoglobina muy alto que dificulta la lectura de la prueba. En la actualidad (10), se ha logrado mejorar la calidad del antígeno eliminando gran cantidad de materia extraña. El objeto del presente estudio fue el tratar de preparar antígenos que no tuvieran estos inconvenientes y así, obtener una mejor información sobre la especificidad y valor diagnóstico de la prueba.

El antígeno más satisfactorio preparado en este laboratorio se obtiene a partir de eritrocitos de bovino conteniendo un gran número de parásitos, los cuales se hemolizan con una solución de saponina en NaCl al 0.85% y a una concentración óptima determinada previamente por titulación y observación microscópica con contraste de fase. Los estromas se separan por centrifugación a alta velocidad y a esta baja temperatura (5° C.) y se lavan repetidas veces con solución salina isotónica hasta que el sobrenadante se encuentra libre de hemoglobina. El antígeno final consiste en una suspensión de estromas parasitados parcialmente destruidos, parásitos libres y un contenido muy bajo de hemoglobina. Los antígenos han sido obtenidos en forma satisfactoria tanto de sangre fresca como de sangre almacenada a -20° C. por un período hasta

de 9 meses. Estudios comparativos de potencia, especificidad y estabilidad de estos antígenos utilizando un gran número de sueros de animales inmunes y sanos, han revelado que los antígenos preparados con saponina son más potentes, menos anticomplementarios y mucho más estables que los antígenos obtenidos por otros métodos.

El Cuadro 1 muestra la influencia que tiene la concentración de saponina sobre la antigenicidad y reacción anticomplementaria de los eritrocitos tratados. En ese Cuadro se incluye también un antígeno obtenido a partir de eritrocitos Usados con agua destilada y los estromas precipitados con agua saturada con CO₂ y resuspendidos en solución salina isotónica. Se verá que los antígenos preparados con saponina son mejores que los obtenidos con eritrocitos usados con agua.

Nuestros antígenos han sido utilizados muy satisfactoriamente en el laboratorio con fines de investigación para estudiar la respuesta inmunológica de animales inoculados experimentalmente con cepas aisladas de diversas áreas del país. También han sido utilizados con fines diagnósticos y en el Cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos con sueros de bovinos colectados de varias partes y enviados a nuestro laboratorio para diagnóstico de anaplasmosis.

Cuadro 1.—Influencia de la concentración de saponina - NaCl en la preparación de antígenos de eritrocitos de bovino infectado con *Anaplasma marginale*. Reacción de fijación de complemento.

Conc. de Saponina	1:8 Suero *		Diluciones de Antígeno				Actividad Anticmpl.**
			1:5	1:10	1:20	1:40	
0.312 %	Bov. No. 8		4	3	3	1	0
	Bov. No. 18		0				
0.156%	Bov. No. 8		3	4	3	3	0
	Bov. No. 18		0				
0.078 %	Bov. No. 8		4	4	4	3	0.25
	Bov. No. 18		0				
Control-H ₂ O	Bov. No. 8		4	4	1	0	1.0
	Bov. No. 18		1				

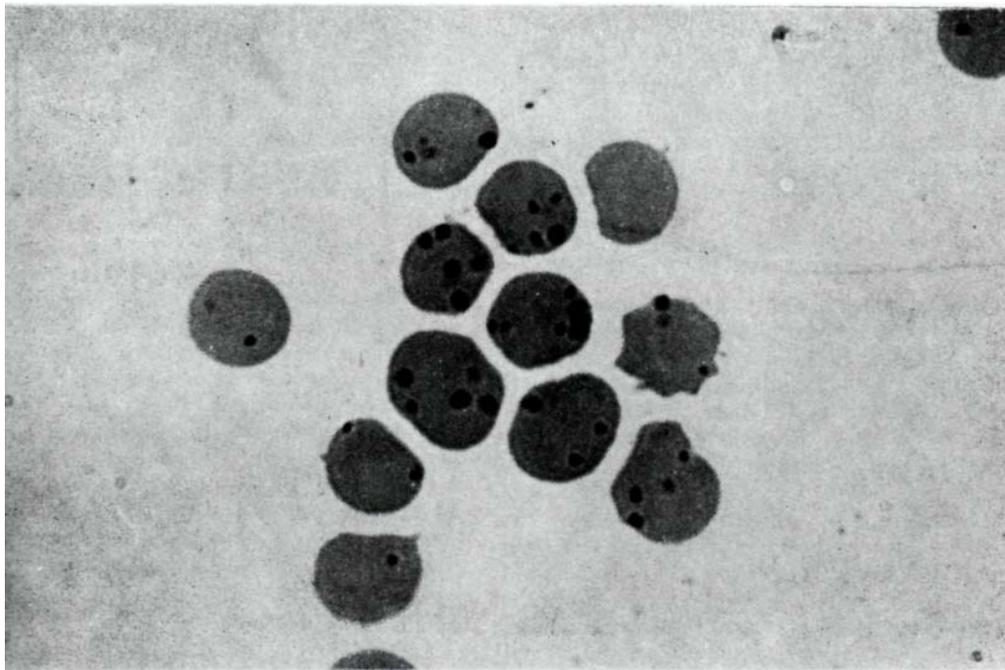
* Bov. No. 8: Suero Positivo. Bov. No. 18: Suero Normal.

** Número de Unidades de Complemento fijadas por el Antígeno solo.
0 Hemolisis total; 4, ausencia de Hemolisis; 1, 2, 3, Hemolisis parcial.

Cuadro 2.—Diagnóstico de anaplasmosis con antígeno de *A. marginale* preparados de eritrocitos tratados con saponina - NaCl. Reacción de fijación de complemento.

Procedencia del Suero	Número de Sueros	Sueros Positivos	Sueros Negativos	% Sueros Positivos
Apaseo, Glo.	47	2	45	4.0
Coapa, D. F.	117	11	106	9.4
Ilu Ipulco, D. F.	10	3	7	30.0
Ixtacalco, D. F.	28	12	16	43.0
Palo Alto, D. F.	39	6	33	15.8
Valle de Bravo, Méx.	56	22	34	39.3
Tuxpan, Ver.	12	3	9	25.0
Tamiahua, Ver.	31	10	21	32.2
T o t a l	340	69	271	

Nota: En adición se han hecho diagnósticos de Anaplasmosis en los siguientes Estados de la República Mexicana: Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Jalisco, Tamaulipas y San Luis Potosí.



Eritrocitos de bovino mostrando gran número de Anaplasma en coloración Wright-Giemsa.

Dada la importancia económica que tiene esta enfermedad, sería muy conveniente que se llevara a cabo una investigación cuidadosa de la incidencia de portadores "sanos" de *A. marginale* en la República Mexicana. Para esto, es necesaria la colaboración del ganadero, del médico veterinario regional y del gobierno para que se obtenga el mayor número de muestras posibles y que éstas sean enviadas al laboratorio en condiciones adecuadas.

Bibliografía

1. THEILER, A. 1910. *Anaplasma marginale* (Genus nov. et species nov.). Un nouveau protozaire du betail, Bull. soc. pathol. exotique, 3: 135-137.
2. THEILER, A. 1911. Further investigations into Anaplasmosis in South África. Ist. Rept. Director Vet. Research Union S. África, pp. 7-46.
3. REES, C. W.; and W. M. MOHLER. 1934. Preliminary studies on the complement fixation test for the diagnosis of bovine anaplasmosis. J.A.V.M.A., 87: 59-63.
4. MOTT, L. O., and D. W. GATES. 1949. The production of an antigen for anaplasmosis complement-fixation test. Vet. Med., 44: 296-299.
5. PRICE, K. E., L. J. POELMA and J. E. FABER. 1952. Preparation of an improved antigen for anaplasmosis complement-fixation tests. Am. J. Vet. Res., 13: 149-151.
6. MOHLER, W. M. and D. W. GATES. 1952. Present status of the complement-fixation test for the diagnosis of anaplasmosis. Proc. U. S. Livestock San. Assn. 56th Ann. Meeting, pp. 61-64.
7. PRICE, K. E., W. E. BROCK and J. G. MILLER. 1954. An evaluation of the complement-fixation test for anaplasmosis. Am. J. Vet. Res., 15:511-516.
8. GATES, D. W., W. M. MOHLER, L. O. MOTT, L. J. POELMA, K. E. PRICE and J. MITCHELL. 1954. A comparison of antigen production methods and complement-fixation procedures for diagnosing bovine anaplasmosis. Proc. U. S. Live stock San. Assn., 58th Ann. Meeting, pp. 105-114.
9. GATES, D. W. and T. O. ROBY. 1956. The status of the complement-fixation test for the diagnosis of anaplasmosis in 1955. Annals N. Y. Acad. Sci., 64: 31-39.
10. FRANKLIN, T. E., J. W. HUFF, F. C. HECK. 1962. Large scale production of anaplasmosis antigen. The Southwestern Veterinarian, 15: 1-8.

**ESTUDIOS SOBRE FIJACIÓN DEL
COMPLEMENTO EN EL DIAGNOSTICO DE
PORTADORES ASINTOMATICOS DE LA
ANAPLASMOSIS BOVINA**

La anaplasmosis s: trasmite en la naturaleza por varias especies de garrapatas, tábano y moscas de establos. Todo animal que se recupera de un ataque agudo de esta enfermedad se convierte en portador asintomático y representa una amenaza constante para el ganado bovino sano. Sólo el diagnóstico serológico permite identificar a los portadores. Se describe la preparación de un antígeno satisfactorio para el diagnóstico de portadores asintomáticos de la Anaplasmosis bovina.

C. ESPAÑA, Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., México. D. F.

Tec. Pec. en México. 1:42-46 (1963)

**ETUDES SUR LA FIXATION DU COMPLE-
MENT DANS LE DIAGNOSTIC DES POR-
TEURS ASINTOMATIQUES DE L'ANAPLAS-
MOSE BOVINE**

Dans la nature l'anaplasmosis est transmise par diverses especes de tiques, taons et mouches de létable. Tout animal qui quérit d'un attaque aigue de cette maladie se transforme en porteur asintomatique et représente un danger constant pour le bétail bovin sain. Seul le diagnostic sérologique permet l'identification des porteurs. L'on décrit la préparation d'un antigene satisfaisant pour le diagnostic des porteurs asintomatiques de l'anaplasmosis bovine.

C. ESPAÑA, Centre National des Investigations du Bétail, S.A.G., Mexique, D. F.

Tec. Pec. en México. 1:42-46 (1963)

**STUDIEN UEBER DEN ERGAENZENDEN
FIXIERUNGSTEST IN DER DIAGNOSE VON
ASYMPTOMATISCHEN TRAEGERN DER
ANAPLASMOSE DES RINDES**

Die Anaplasmosis wird durch verschiedene Arten von Zecken, von Pferdefliegen und von Hausfliegen übertragen. Die Tiere, welche sich von einem schweren Anfall von dieser Krankheit erholt haben, werden zu Trägern und stellen eine ständige Gefährdung für die gesunden Tiere dar. Nur die serologische Diagnose ermöglicht die Feststellung der Träger. Diese Aufsatz beschreibt die Vorbereitung eines befriedigenden Antigens, welches sich in der Diagnose der Träger der Rindanaplasmosis als wertvoll bewährt hat.

C. ESPAÑA, Zentrum National für Forschungen der Tierzucht, S.A.G., Mexiko, D. F.

Tec. Pec. en México. 1:42-46 (1963)

**STUDIES ON THE COMPLEMENTING FIX-
ATION TEST IN THE DIAGNOSIS OF
ASYMPTOMATIC CARRIERS OF
BOVINE ANAPLASMOSIS**

Anaplasmosis is transmitted by various species of ticks, horse flies and domestic flies. Animals which recover from an acute attack of this disease become carriers and represent a constant menace to healthy animals. Only serological diagnosis permits the identification of carriers. This paper describes the preparation of a satisfactory antigen useful in the diagnosis of carriers of bovine Anaplasmosis.

C. ESPAÑA, Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., México, D. F.

Tec. Pec. en México. 1:42-46 (1963)