

“ESTUDIO DE UNA VACUNA ATENUADA DE ANAPLASMA MARGINALE EN MÉXICO”

M.V.Z., U.S. B. MIGUEL OSORNO¹
M.y.Z. M.S. PEDRO SOLANA¹
D.V.M., Ph. D. MIODRAG RISTIC²
M.V.Z. EDUARDO SERRANO¹

Resumen

Este informe describe el segundo de una serie de estudios efectuados en México con respecto a la inocuidad y potencia de la vacuna atenuada de *Anaplasma marginale* de la Universidad de Illinois. En el experimento se incluyen 20 bovinos Hereford de 3 años de edad. Diez de los animales fueron vacunados y los restantes se dejaron sin vacunar como testigos. Todos los animales se mantuvieron en unidades de aislamiento de el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (I.N.I.P.) en la ciudad de México. La alimentación proporcionada a los animales es la que se recomienda para alimentar ganado adulto de carne en el período de engorda.

A los 5 meses y una semana después de la vacunación los animales fueron desafiados con una cepa virulenta de *Anaplasma marginale* aislada en México. La cepa del desafío se mantuvo, en alícuotas de 1.0 ml en nitrógeno líquido. Se conoce la dosis suficiente para causar 100% de morbilidad y 80% de mortalidad en bovinos Hereford adultos. El desafío con esta cepa ofreció 100% de protección en mortalidad y 70% de protección para morbilidad en el grupo de animales vacunados, comparados con 100% de mortalidad en el grupo control. La morbilidad en el 30% de los animales fue de corta duración y de rápida recuperación.

Anaplasmosis es una enfermedad causada por la rickettsia *Anaplasma marginale* Ristic (1968). La enfermedad es de distribución mundial y las pérdidas más severas ocurren en ganado vacuno que se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales. En la última década se han obtenido considerables conocimientos con respecto a las bases fisicoquímicas y propiedades serológicas de *A. marginale* Ristic (1968); Ristic Osorno y Solana (1973). Se conocen dos cepas virulentas de *Anaplasma*, cada una de éstas posee diferencias en cuanto a morfología, antigenicidad, y especificidad de huésped, se han identificado ambas cepas en el hemisferio occidental, representado por el continente Americano en su parte Norte y Sur; España, C. y España, E. (1959); España, C. y España, E. (1963); Kreier y Ristic (1963a); Kreier y Ristic (1963b); Kreier y Ristic (1963c).

Recibido para su publicación el 20 de febrero de 1973.

¹ Instituto Nacional de Invest. Pecs., S.A.G. Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, D. F.

² Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Illinois. E.U.A.

La presencia de la Anaplasmosis en México, se conoce desde el inicio de este siglo. La incidencia más alta de esta enfermedad se encuentra en áreas con altitudes por debajo de los 1,000 metros sobre el nivel del mar, estando en directa relación con la presencia de vectores artrópodos en esas regiones.

Estudios serológicos utilizando la prueba de “aglutinación en tubo capilar” (A.C.) Morales, (1966); diferentes informes de campo disponibles en la Secretaría de Agricultura y Ganadería; observaciones efectuadas por Médicos Veterinarios y Ganaderos, han mostrado que la anaplasmosis está muy difundida en gran parte del país y que es una de las enfermedades económicamente más importantes en México. El control de la enfermedad a nivel nacional, utilizando agentes quimioterapéuticos, resultaría demasiado costoso además de ser poco práctico. Toda la información disponible y las experiencias de campo, sugieren que la inmunoprofilaxis es el único medio práctico para controlar la anaplasmosis en zonas endémicas.

Ristic, Sibinovic y Welter (1968), desarrollaron una vacuna atenuada por medio de la adaptación de una cepa virulenta denominada Florida, de *A. marginale* en huésped que no es bovino. Experimentos de campo y de la-

boratorio, hechos con esta vacuna en los Estados Unidos de Norteamérica, Taylor (1969); Welter y Ristic (1970); Welter y Woods (1963); en Perú, Castillo (1968); Lora (1971); Lora y Koechlin (1969); en México. Osorno, Pérez y Ristic (1973), han demostrado que la respuesta inmunológica inducida por esta vacuna es suficiente para proteger bovinos adultos susceptibles contra el desafío de cepas virulentas de *Anaplasma* encontradas en esos países. Carson Adams y Todorovic (1970) compararon en Colombia algunas propiedades antigénicas entre la cepa atenuada y varias otras cepas virulentas, no encontrando diferencias entre éstas. Recientemente Kuttler (1972) informó que la cepa atenuada de *A. marginale* fue notablemente mejor en cuanto a inocuidad y a la inducción de resistencia inmunológica, que una cepa de *A. centrale*; esto concuerda con los resultados de laboratorio y de campo, en los cuales *A. centrale* y la cepa atenuada de *A. marginale* fueron comparadas, inmunogénicamente en contra de una cepa de campo de *A. marginale* de Perú, Lora (1971).

La administración del organismo atenuado no causó cambios adversos en el cuadro hematológico, ni signos clínicos de la enfermedad, la protección al desafío fue completa; por el contrario, las respuestas a la administración de *A. centrale* variaron desde la presentación ligera de la enfermedad, hasta la presentación aguda de ésta, además no indujo protección en contra de cepas domésticas de *A. marginale*.

El propósito de este segundo trabajo de una serie entre la Universidad de Illinois y el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias fue el de investigar la inocuidad y eficiencia de la vacuna atenuada de *A. marginale* para inducir protección en contra de un desafío artificial con una cepa virulenta de *Anaplasma marginale* de potencia conocida.

Material y métodos

La vacuna utilizada fue elaborada a partir de una cepa de *A. marginale* atenuada, que se referirá como vacuna de anaplasmosis de la Universidad de Illinois, desarrollada por Ristic, Sibinovic y Welter (1968). La vacuna fue producida en ovinos y se mantuvo en alícuotas de 1 ml en nitrógeno líquido.

La cepa de desafío: La cepa virulenta de *A. marginale* fue aislada en México, con la cual se inoculó un becerro esplenectomizado. Cuando la parasitemia alcanzó un 30%, el animal fue desangrado asépticamente, los eritrocitos fueron lavados y más tarde se le agregó un volumen igual de dimetil sulfoxido al 10%. esta mezcla se dividió en alícuotas de 1 ml y se mantuvo en nitrógeno líquido. La dosis infectante 50% del organismo, fue determinada usando 6 grupos de 5 animales adultos cada uno; 1 ml de esta cepa causó el 100% de morbilidad y el 80% de mortalidad en esos animales, Correa *et al.* (1972). La misma dosis fue utilizada para desafiar a los animales de este experimento.

Animales y Procedimientos de Vacunación y Desafío

Veinte bovinos Hereford adultos, provenientes de una región libre de anaplasmosis, fueron introducidos a las unidades de aislamiento del INIP en la Ciudad de México; antes de utilizar estos animales en el experimento, se les examinó clínicamente, se estableció el nivel de hematocrito, se les estudió microscópicamente los frotis sanguíneos, teñidos con Giemsa, y el suero sanguíneo fue estudiado con la prueba de aglutinación capilar, Ristic (1962).

Los animales fueron distribuidos en dos grupos iguales, cada animal del primer grupo fue vacunado por vía intramuscular en junio de 1972, utilizando 1 ml de la vacuna. Los animales del segundo grupo se dejaron sin tratamiento, para que sirvieran como testigos, después de la fecha de vacunación se les tomó temperatura rectal diariamente, se determinó el hematocrito, y se estudió microscópicamente el frotis sanguíneo; la prueba de A.C., fue determinada 3 veces a la semana hasta noviembre de 1972, cuando todos los animales fueron inoculados subcutáneamente con 1 ml de la cepa del desafío. Estudios clínicos hematológicos y exámenes microscópicos del frotis sanguíneo, fueron realizados diariamente después del desafío. El experimento se consideró terminado cuando los animales sobrevivientes recuperaron sus condiciones clínicas normales.

Resultados

Los valores de parasitemia de los animales vacunados fluctuaron entre 1 y 7%, obteniendo promedio de 2.2% entre la 4a. y 6a. semanas después de la vacunación. Los anticuerpos aglutinantes del suero, se determinaron por la prueba A.C. y fueron observados inicialmente a partir de la 6a. semana después de haber administrado la vacuna. Los anticuerpos persistieron durante todo el experimento. El valor del hematocrito, temperatura rectal y en general la condición clínica de los animales vacunados, no se alteró durante el período posterior a la vacunación. (Fig. 1).

En los días 25-30 después del desafío, se observó en el grupo testigo, baja del hematocrito, seguido por parasitemia en promedio de 20% y alza de temperatura rectal con temperatura promedio de 40.5° C. Seguidamente la parasitemia se incrementó hasta alcanzar un promedio del 58% a los 37 días después del desafío (Fig. 2). La parasitemia fue seguida por un descenso del hematocrito y por una constante alza de temperatura con promedio de 41.5° C a los 34 días después del desafío; la temperatura descendió, oscilando a niveles subnormales durante los días 37 y 41 (Fig. 3). Todos los animales testigos mostraron signos clínicos severos de anaplasmosis, manifestados por: Anorexia, anemia.

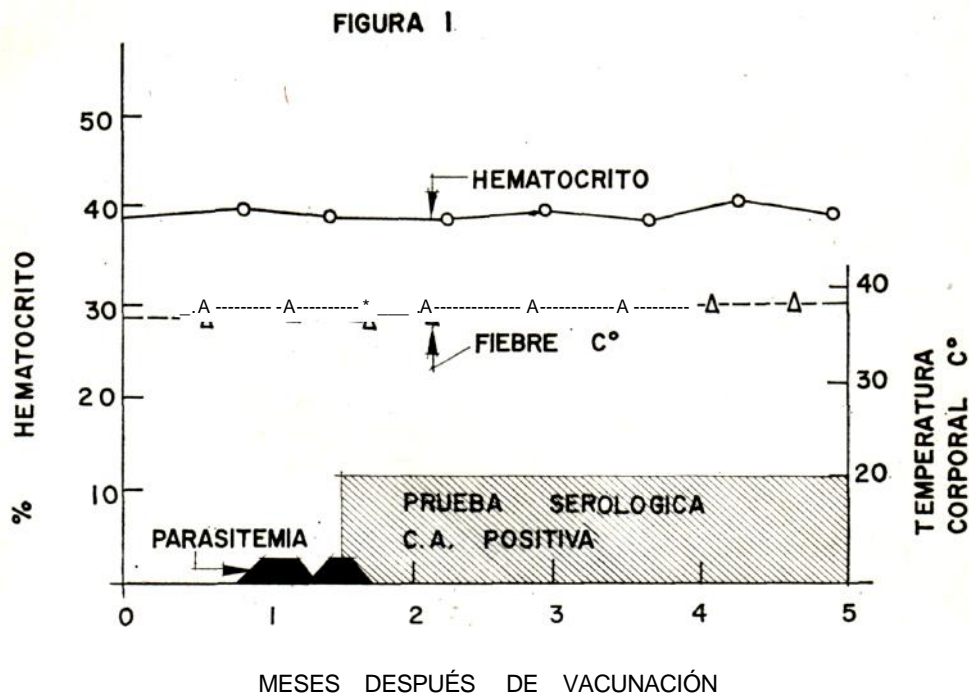


FIGURA 1. Respuesta a la vacunación *A. marginale* atenuada, hematocrito, temperatura rectal, parasitemia, aglutinación de tubo capilar, en 10 bovinos adultos Hereford.

Los animales del grupo control se mantuvieron también dentro de las instalaciones del INIP en la Ciudad de México, sin presentar cambios hematológicos y serológicos anormales. La condición clínica en general de estos animales se mantuvo en buena forma.

ictericia, debilidad, emaciación y deshidratación; 2 animales del grupo testigo, murieron los días 35 y 37 después del desafío, respectivamente. Los animales restantes murieron entre los días 38 y 41. Los valores del hematocrito del día en que murieron estos ani-

males variaron entre 11 y 17% (Fig. 4). La parasitemia en el grupo vacunado, se presentó entre los días 34 y 40 después del desafío, alcanzando un promedio máximo del 15% en el día 38. El hematocrito descendió de los valores normales un 10% y ocurrió

Discusión y conclusiones

Los resultados de este experimento demostraron que la inmunidad conferida por la vacuna atenuada de *A. marginale* fue suficiente para proteger bovinos susceptibles adul-

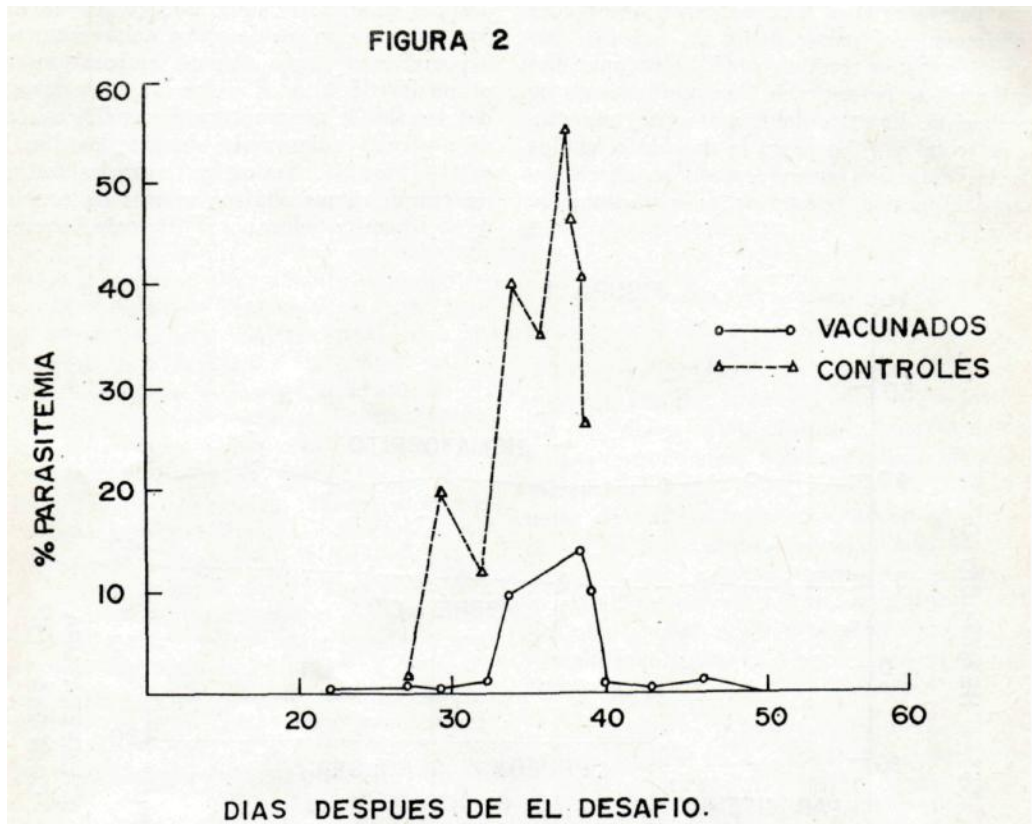


FIGURA 2. Promedio de parasitemia en los bovinos Hereford adultos vacunados y 10 testigos después del desafío con la cepa mexicana virulenta *Anaplasma marginale*.

en el día 42 después del desafío. Tres de los animales vacunados desarrollaron signos clínicos de la enfermedad de la manera siguiente: En un animal se observó una temperatura de 40.2° C durante un día, los dos animales restantes mostraron valores de hematocrito menores al 20% durante un período de 2 y 6 días respectivamente, el último animal, mostró anorexia durante un día y debilidad durante 4 días.

tos contra la mortalidad en el 100% de los animales contra la morbilidad en el 70% de los casos.

La extrema virulencia de la cepa usada para el desafío, fue comprobada por el hecho de que todos los animales testigos murieron entre los 10 días posteriores de la presentación de los signos de la enfermedad.

La información aquí presentada con respecto al comportamiento de la cepa virulenta

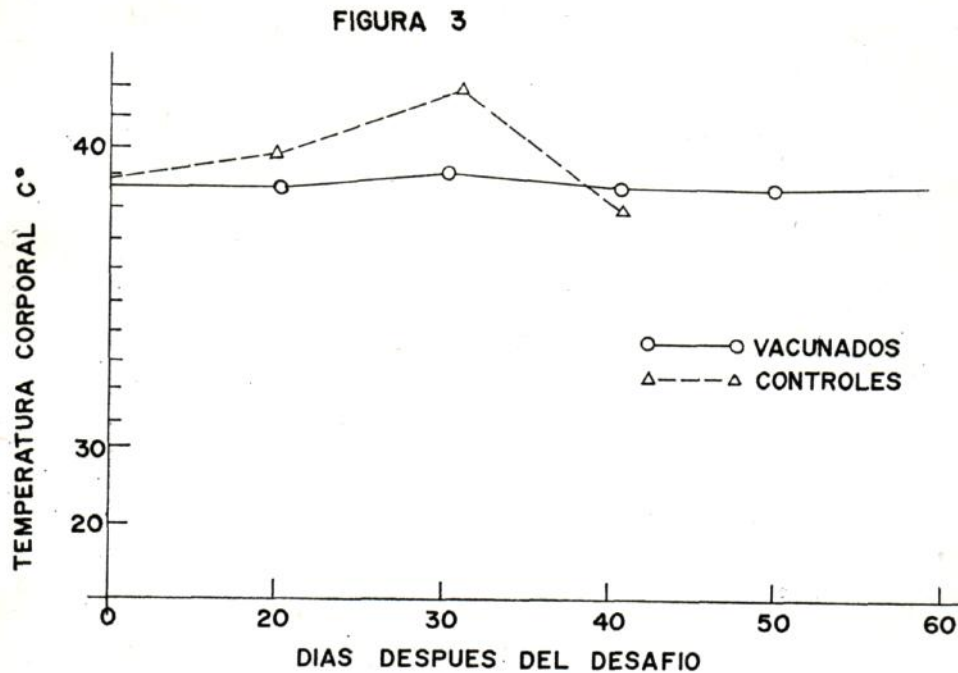


FIGURA 3. Promedio de la temperatura rectal en 10 bovinos Hereford adultos vacunados y 10 bovinos Hereford adultos testigos después del desafío con la cepa mexicana virulenta de *Anaplasma marginale*.

de *A. marginale* es similar a la notificada anteriormente por Correa *et al.* (1972), demostrando que la virulencia de este organismo puede ser preservada por períodos relativamente largos de tiempo, si se mantiene en nitrógeno líquido. La dosis de desafío utilizada en este experimento es poco probable que se presente bajo condiciones naturales. Se desconoce la existencia de algún informe que describa un brote de anaplasmosis, en el cual sucumbieran todos los animales por causa de esta enfermedad.

Se plantean 2 hipótesis con respecto a la presencia de parasitemia y morbilidad en el 30% de los animales vacunados: Primero es posible que animales con inmunidad natural no hubieran resistido completamente el desafío utilizado en este experimento. Esta sugerencia se basa en las observaciones anteriores en las cuales, animales que sobrevivieron a la exposición con el desafío utilizado anteriormente, desarrollaron signos de la enfer-

medad durante el redesiño con el mismo organismo, Correa *et al.* (1972), la otra posibilidad es que la cepa atenuada vacunal de *A. marginale* no es idéntica en todos los aspectos a las cepas de diversas localidades geográficas.

La cepa vacunal ha sido desarrollada por el proceso de selección y adaptación de *A. marginale* virulenta, en un hospedador diferente al bovino, este es, básicamente el primer organismo artificialmente atenuado de la cepa (Florida) virulenta de *A. marginale*. Este último organismo ha sido estudiado en varios niveles con respecto a sus propiedades estructurales e inmunológicas, Ristic (1968).

Aparentemente existe otro organismo atenuado y este es *A. centrale* que se presenta en forma natural en África. Este organismo ha sido importado a varios países de Latinoamérica y otros países, en un esfuerzo para valorar su eficacia como agente inmunoproláctico en contra de cepas de *A. marginale*

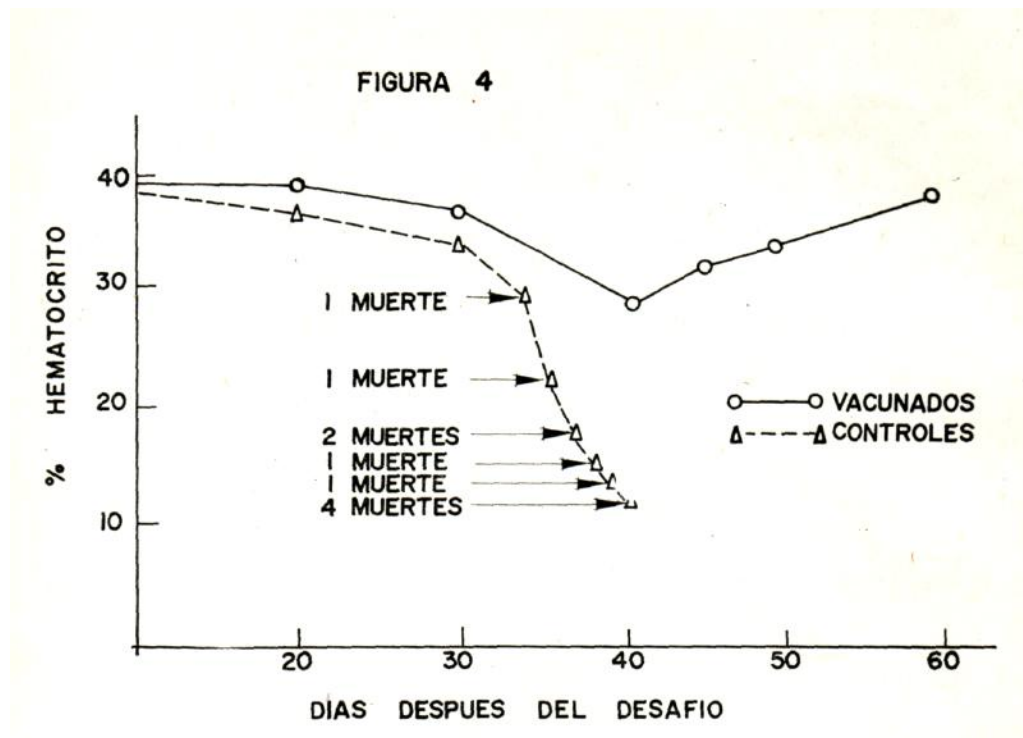


FIGURA 4. Promedio de los valores del hematocrito de los bovinos vacunados testigos, así como la secuencia de los animales muertos después del desafío con la cepa mexicana virulenta de *Anaplasma marginale*.

virulentas. Sin embargo, la inmunidad por este agente no ha protegido a los bovinos en contra de la morbilidad y mortalidad, después del desafío con *A. marginale*, Lora (1971); Lora y Koechlin (1969). En estudios recientes *A. centrale* ha sido comparada con la cepa atenuada de *A. marginale*, usada en este estudio y de la cepa virulenta de *A. marginale* con referencia a la producción de anticuerpos humorales que puedan ser detectables por la prueba de fijación de complemento, Kuttler (1972). El organismo atenuado de anaplasma ha demostrado ser inmunológicamente superior, produciendo además, infecciones más ligeras que los otros dos organismos en animales esplenectomizados y no esplenectomizados. Los resultados de estos estudios concuerdan con los que se han obtenido en el campo, Osorno, Pérez y Ristic (1973). Las áreas tropicales y subtropicales son las localidades de mayor crecimiento para la industria ganadera; la principal razón de la importación continua de bovinos hacia

estas áreas desde las regiones centrales de México, es la disponibilidad de los recursos naturales; las pérdidas causadas por la morbilidad de la anaplasmosis son muy altas, por lo cual el uso de la vacuna en estas regiones como medio inmunoprolifático en contra de la anaplasmosis, redundaría en un incremento de la industria ganadera, y por ende, atraería mayores inversiones a estas zonas.

Summary

The report describes the first of a series of studies conducted in México on the safety and efficacy of the University of Illinois attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. The experiment involves 20, 3-year-old Hereford cattle. Ten of the animals were vaccinated and the remaining 10 served as nonvaccinated controls. All animals were maintained in isolation units of the institute and fed dry feed prescribed for raising prime beef cattle.

At 5 months and 1 week after vaccination. the animals were challenged with a virulent Mexican anaplasma strain. The challenge strain, maintained in 1 ml doses in liquid nitrogen, had a standardized potency sufficient to cause 100% morbidity and 80% mortality in 2 —year— old Hereford cattle. The challenge with this strain afforded 100% protection against mortality and 70% protection against morbidity in the vaccinated group as compared to 100% mortality in the control group. The short-lasting morbidity in 30% of the vaccinates was followed by quick recovery.

Literatura citada

- CARSON, C. A., L. G. ADAMS and R. A. TODOROVIC. 1970. An Antigenic and Serologic Comparison of Two Virulent Strains and an Attenuated Strain of *Anaplasma marginale*. *Am. J. Vet. Res.*, 31:1071-1078.
- CASTILLO, AUGUSTO G.. 1968. Laboratory and Field Trials of Attenuated *Anaplasma marginale* Vaccine in Perú, *Proceedings of 5th Nat. Anaplasmosis Conf.*, Stillwater, Okla., Feb. 28-29.
- CORREA, G. P., H. QUIROZ, C. HERNÁNDEZ, D. HERRERA, E. SERRANO, J. L. DOMÍNGUEZ y C. A. ELIZONDO, 1972, Dosis infectante letal 50% de una cepa de *Anaplasma marginale* en bovinos. IX Reunión Anual INIP. de México, D. F.
- ESPAÑA, C. and E. M. ESPAÑA. 1959. *Anaplasma marginale*. I. Studies with phase Contrast and Electron Microscopy. *Am. J. Vet. Res.*, 20:795-805.
- ESPAÑA, E. M. and C. ESPAÑA. 1963. *Anaplasma marginale*. I. Studies with phase Contrast and Features with Phase Contrast and Light Microscopy. *Am. J. Vet. Res.*, 24:713-722.
- KREIER, J. P. and M. RISTIC. 1963^a. Anaplasmosis. X. Morphologic Characteristics of the Parasites Present in the Blood of Calves Infected with the Oregon Strain of *Anaplasma marginale*. *Am. J. Vet. Res.*, 24:676-687.
- KREIER, J. P. and M. RISTIC, 1963^b. Anaplasmosis. XI. Immunoserologic Characteristics of the Parasites Present in the Blood of Calves Infected with the Oregon Strain of *Anaplasma marginale*. *Am. J. Vet. Res.*, 24:688-696.
- KREIER, J. P. and M. RISTIC, 1963^c. Anaplasmosis. XII. The Growth and Survival in Deer and Sheep of the Parasites Present in the Blood of Calves Infected with the Oregon Strain of *Anaplasma marginale*. *Am. J. Vet. Res.*, 24:697-702.
- KUTTNER, K. L., 1972, Comparative Response to Premunition Using Attenuated *Anaplasma marginale*. Virulent *A. marginale*, and *A. centrale* in Different Age Groups, *Trop. Animal Health Prod.*, 4:197-203.
- LORA, CÉSAR O., 1971, Enfermedades por Hematozoarios del Ganado Bovino del Perú, *Revista del Inst. de Zoonosis e Investigaciones Pecuarias*, (Lima, Perú) 1:15-19.
- LORA, CÉSAR O. and ADA KOEHLIN. 1969, An attenuated *Anaplasma marginale* Vaccine in Perú. *Am. J. Vet. Res.*, 30:1993-1998.
- MORALES, S. H., 1966, Determinación de Porcentajes de Infección de Anaplasmosis en México por Medio de la Prueba de Aglutinación en tubos Capilares. IV Reunión CNIP de México, 16 de diciembre de 1966.
- OSORNO, M. B., J. M. PÉREZ y M. RISTIC, 1973, Evaluación en condiciones de campo del efecto de la vacuna viva modificada para prevenir la anaplasmosis. Reunión Anual del INIP., México, D. F.
- RISTIC, M., M. B. OSORNO, P. SOLANA M., 1973, Anaplasmosis bovina con énfasis en control, diagnóstico y uso de una vacuna atenuada de *Anaplasmosis marginale*. VII Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Bogotá, Colombia.
- RISTIC, M., 1968. Anaplasmosis, In: Infectious Blood Diseases of Man and Animals, *Academic Press, Inc.*, N. Y. 2:473-542.
- RISTIC, M., 1962, A Capillary Tube Agglutination Test for Anaplasmosis A Preliminary Report, *JAVMA*, 141:588-594.
- RISTIC, M., S. SIBINOVIC and C. J. WELTER, 1968, An Attenuated *Anaplasma marginale* Vaccine. Proceedings of 12nd Ann. Meeting U.S. Livestock Sanitarr Assoc., New Orleans, 56-64.
- TAYLOR, R. L., 1969, Immunogenic Differences Between Two *Anaplasma marginale* isolates, *Am. J. Vet. Res.*, 30:1999-2002.
- WELTER, C. J. and M. RISTIC, 1970, Laboratory and Field Trials with an Attenuated *Anaplasma marginale* Vaccine, 12nd Annual Meeting U.S. Animal Health Assoc., 122-130.
- WELTER, C. J. and R. D. WOODS, 1963, Preliminary Evaluation of an Attenuated *Anaplasma marginale* Vaccine in Cattle, *Vet. Med. Sm. Anim. Clin.*, 3:798-802.