

CARACTERIZACION DE LA VIRULENCIA DE UN AISLADO MEXICANO DE *Anaplasma marginale*^a

Miguel Angel García Ortiz ^{b,c}
Lilia Elvira Angeles Ojeda ^d
Georgina Hernández Salgado ^b
David García Tapia ^b
Ramón Aboytes Torres ^{b,e}
Sergio D. Rodríguez Camarillo ^b

RESUMEN

García O M A, Angeles O L E, Hernández S G, García T D, Aboytes T R, Rodríguez C S D. *Téc. Pecu. Méx.* Vol 36 No 3 1998 pp 197-202. El objetivo del estudio fue caracterizar la patogenicidad del aislado (MEX-17-029-01) de *Anaplasma marginale* recuperado de un caso clínico en Yáutepec, Morelos. El aislado se inoculó en cuatro bovinos susceptibles, a una dosis de 1×10^6 eritrocitos infectados. El período de prepatencia en los cuatro animales fue de 15 días, alcanzando el máximo porcentaje de eritrocitos infectados (PEI) de 21.4 ± 13 (desviación estándar) % a los 30 días posinoculación (dPI), disminuyendo a $\leq 1\%$ para el dPI 50. El volumen celular aglomerado inicial (VCA) promedio fue de $41.8 \pm 3.1\%$, valor que disminuyó hasta $14.5 \pm 2\%$ a los 31 dPI, para recuperarse sólo a $32.8 \pm 5.5\%$ a los 85 dPI. Solo tres de los animales presentaron fiebre ($t \geq 40$ C) entre los dPI 24 y 39. Asimismo, se observó una ganancia de peso de 12.7 ± 8.7 kg en los primeros 13 dPI, contrastando con una pérdida de 18 ± 4.7 kg en los siguientes 28 días (41 dPI), la recuperación del peso fue muy lenta de ahí en adelante. Todos los animales mostraron depresión y palidez de mucosas, coincidentes con los valores máximos de PEI y mínimos de VCA. Al ELISA las muestras de los animales se presentaron negativas al inicio del experimento (0.09 densidad óptica [D.O.]), alcanzando valores de entre 0.2 y 0.7 D.O. entre los dPI 29 y 50, valores que descendieron entre 0.2 y 0.5 D.O. para el dPI 85. El aislado MEX-17-029-01 bajo estas condiciones, fue capaz de inducir un cuadro clínico de tipo agudo en el 100% de los animales sin causar la muerte.

PALABRAS CLAVE: *Anaplasma marginale*, Virulencia, Bovinos

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa caracterizada por producir pérdidas notables en la producción y está considerada como uno de los mayores impedimentos en el mejoramiento genético de hatos nativos de baja producción en nuestro país. En México, la anaplasmosis

es producida por *Anaplasma marginale*, la especie más dañina del género (1).

Se ha informado de la existencia de diversidad en el comportamiento clínico de aislados de diferentes regiones de la rickettsia (2), que pudiera estar ligada a diferencias estructurales de las proteínas del microorganismo (3). Desafortunadamente, *A. marginale* no ha podido ser tipificado por carecer de un sistema que pueda diferenciar aislados o cepas en forma sistemática.

La importancia de tipificar la variabilidad que se presenta tanto en la virulencia como en el perfil molecular de cepas de regiones geográficas diferentes del microorganismo

a Recibido el 31 de agosto de 1998 y aceptado para su publicación el 7 de diciembre de 1998.

b Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, INIFAP, SAGAR, km 11.5 Carr. Fed. Cuernavaca-Cuatla, Jiutepec, Mor. 625500

c Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

d Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM
e Dirección actual: American Water Works Service, Inc., Quality Control and Research Laboratory, 1115 South Illinois Street, Belleville, IL. 62220-3102

radica en la necesidad de establecer un banco de material criopreservado, que posibilite la elaboración de inmunógenos de características conocidas. Por este motivo, el objetivo del presente trabajo fue el de caracterizar la virulencia en bovinos susceptibles de una cepa de *Anaplasma marginale* (MEX-17-029-01) colectada en el municipio de Yautepec, estado de Morelos como uno de los parámetros a usar en un sistema para clasificar cepas aisladas de regiones geográficas distantes de este microorganismo.

Para este propósito, el aislado se reactivó de la criopreservación mediante inoculación consecutiva en dos bovinos encastados *Bos taurus* de menos de un año, susceptibles, con un peso promedio de 140 kg, libres de anticuerpos contra anaplasmosis, babesiosis y, negativos a las pruebas oficiales contra brucelosis y tuberculosis, esplenectomizados e inmunodeprimidos con dexametasona a la dosis terapéutica (Aziium®, amablemente donado por el Dr. Jorge Luengo Creel, Laboratorios Schering Plough), del último bovino se tomó sangre infectada y se inoculó 1×10^6 eritrocitos infectados en cada uno de cuatro bovinos *Bos taurus* de 18 meses, susceptibles, con un peso promedio de 247 kg, libres de anticuerpos contra anaplasmosis, babesiosis y, negativos a las pruebas oficiales contra brucelosis y tuberculosis. Los animales se mantuvieron en los corrales del CENID-PAVET en Jiutepec Mor. y recibieron agua y alimento *ad libitum*. Cada 48 horas, se midió la temperatura rectal y se tomaron muestras de sangre yugular en tubos al vacío con EDTA (Vacutainer®) para determinar el volumen celular aglomerado (VCA) y para la determinación de la

presencia de la rickettsia, así como el porcentaje de eritrocitos infectados (PEI) en laminillas de sangre teñidas con colorante de Giemsa; cada 24 horas desde el momento de la detección de la rickettsia por microscopía óptica. Muestras de plasma se procesaron por el ensayo de ELISA (4) para determinar la presencia de anticuerpos específicos. Los animales no recibieron quimioterapia y se permitió que el curso de la enfermedad se resolviera por sí solo.

El período de prepatencia (tiempo desde la inoculación hasta el momento en que se detectaron positivos a la rickettsia por microscopía por primera vez) en los cuatro animales fue de 15 días, el período de incubación (tiempo desde la inoculación hasta momento en que se observaron los signos clínicos), varió entre los animales, pero se presentaron en forma paralela a la disminución del VCA y al aumento del PEI (Fig. 1). Los animales alcanzaron 21.4 ± 13 (desviación estándar) % como máximo PEI a los 30 días posinoculación (dPI), disminuyendo a ≤ 1 % para el dPI 50. El VCA inicial promedio fue de 41.8 ± 3.1 %, valor que disminuyó hasta 14.5 ± 2 % (71 % de pérdida; Cuadro 1) a los 31 dPI para recuperarse sólo a 32.8 ± 5.5 % hasta los 85 dPI. La elevación de la temperatura rectal no fue uniforme, sin embargo, tres animales presentaron fiebre ($t \geq 40$ C) entre los dPI 24 y 39. Asimismo, se observó una ganancia de peso de 12.7 ± 8.7 kg en los primeros 13 dPI, contrastando con una pérdida de 18 ± 4.7 kg en los siguientes 28 días (41 dPI), la recuperación del peso fue muy lenta de ahí en adelante. Al ensayo de ELISA (para IgG específica) los sueros de los animales presentaron lecturas (0.013)

VIRULENCIA DE *Anaplasma marginale*

de densidad óptica (DO) por debajo a los valores de los controles negativos (0.09) al inicio del experimento, estos valores ascendieron a partir del día 18 gradualmente y alcanzaron valores máximos de 0.5 en promedio (Fig.1) para el día 38. Individualmente se observaron variaciones interesantes que incluyeron el descenso del VCA hasta 6%, mostrando una pérdida de 83.3% del valor inicial (Cuadro 1, bovino 8) y valores de PEI tan alto como 41.6% (bovino 36); los valores

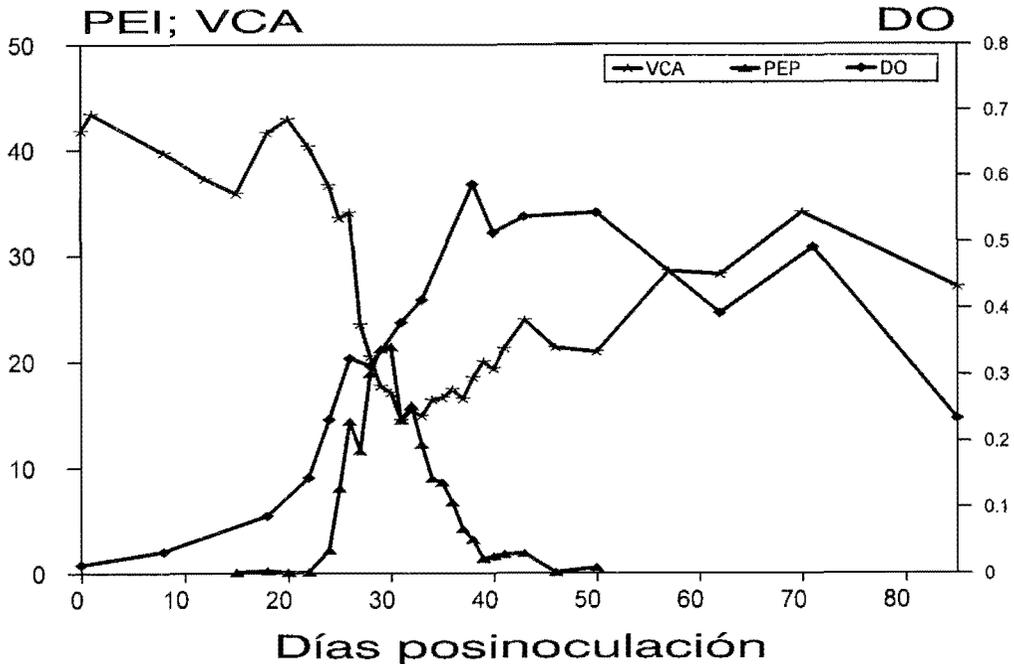
máximos de DO de los sueros de los animales en forma individual varió de 0.454 a 0.735 (Cuadro 1). A la observación clínica, todos los animales mostraron depresión, anorexia y palidez de mucosas, coincidentes con los valores máximos de PEI y mínimos de VCA. El aislado MEX-17-029-01 bajo estas condiciones, fue capaz de inducir un cuadro clínico de tipo agudo en el 100% de los animales experimentales sin causar la muerte.

Cuadro 1. Valores críticos de los parámetros en observación.

Bo No.	05	08	36	38	media	S
VCA inicial	40.9	37.9	45.0	43.5	41.83	3.12
VCA mínimo	15.6	6.3	11.1	14.8	11.95	4.25
día de menor VCA	31	37	33	31	33.00	2.83
% de decremento	61.8	83.3	75.3	65.9	71.58	9.65
Prepatencia	15	15	15	15	15.00	0.00
PEI máx	18	28.5	41.6	16.8	26.23	11.52
día de PEI max	28	32	29	26	28.75	2.50
Período con T > 40 C	0	29 - 39	29	24 - 38	24 - 39	
Días con T > 40 C	0	10	1	6	4.2	4.6
DO inicial	0.021	0.009	0.012	0.01	0.013	0.005
DO máxima	0.454	0.562	0.735	0.603	0.589	0.116
Día de DO máx.	46	50	38	43	44.3	5.1
Peso inicial	256	256	206	271	247.25	28.39
Peso máximo	280	271	214	275	260.00	30.89
Peso mínimo	259	242	195	260	239.00	30.47
Dif Pmax-Pmin	21	29	19	15	21.00	5.89

Bovinos infectados experimentalmente con 1×10^6 eritrocitos infectados de la cepa MEX-17-029-01.

Figura 1. Promedios por grupo del volumen celular aglomerado (VCA), porcentaje de eritrocitos infectados (PEI) y valores de densidad óptica (DO) de los animales infectados experimentalmente con el aislado MEX-17-029-01



En el presente estudio se observó un período de prepatencia (15 días) ligeramente superior al señalado por otros autores para un aislado cubano (5), aún cuando la dosis de inoculación en el presente experimento fue 150 veces menor. La reducción del VCA en el presente estudio (71 %) aunque pudiera considerarse de mayor relevancia en contraste con los de otros estudios donde se han usado dosis 100 (5) y 800 (6) veces mayores, no se considera diferente ya que esta misma cepa inoculada a una dosis de 1×10^8 eritrocitos infectados en bovinos de semejantes condiciones produce pérdidas en el VCA y aumento del PEI muy

semejantes que en el presente estudio (Rodríguez y Col. datos no publicados).

Aún cuando se ha propuesto que el monitoreo de la elevación de la temperatura rectal puede ser usado para predecir la presentación del cuadro clínico tanto en babesiosis (7) como en anaplasmosis (5), en el presente estudio la presencia de temperaturas ≥ 40 C no fue uniforme, ya que por un lado no todos los animales alcanzaron este valor, y por el otro los valores más altos de temperatura coincidieron con los de PEI. El indicador más importante en el presente estudio para la predicción de la presentación del cuadro

clínico agudo fue la disminución del VCA, precisamente porque corre muy paralelamente a la elevación del PEI, por lo que en animales susceptibles introducidos a zonas endémicas es altamente recomendable monitorear este parámetro. Es difícil comparar los presentes resultados en otros sentidos con los de otras caracterizaciones biológicas hechas de aislados de otras partes del mundo, pues estas se han enfocado a la determinación de la transmisibilidad por garrapatas y a la caracterización mediante anticuerpos monoclonales (8), más que a las reacciones clínicas en animales susceptibles. En el presente trabajo se ha usado un esquema donde se ha iniciado con un aislado criopreservado y su reactivación utiliza la inoculación en dos bovinos esplenectomizados, considerando que en ocasiones esta rickettsia, después de mucho tiempo en congelación no alcanza a desarrollar PEI altos y se requiere un segundo bovino para implementar una fase de rápido crecimiento, tratando de imitar las condiciones de campo. De la misma forma, la dosis usada (1×10^6 glóbulos rojos infectados) trata de acercarse a un número que puede ser más parecido a lo que en el campo puede recibir un bovino mediante inoculación natural por picadura de insectos, garrapatas (8), o por punción no intencional con aguja hipodérmica, aún cuando se sabe que 200 eritrocitos infectados. Este esquema será usado en la caracterización de futuros aislados en función de que no todos ellos pueden ser trabajados al mismo tiempo o pasados en animales en el momento de su recuperación de casos clínicos.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado parcialmente por el

Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México A.C.

Se agradece la colaboración de los estudiantes del CETIS # 99 y del CBTIS # 166 del edo. de Morelos. También se agradece a Pfizer de México por la donación de Emicina[®], usada para tratar a los animales usados en la reactivación de la cepa MEX-17.

B I O L O G I C A L CHARACTERIZATION OF A MEXICAN *Anaplasma marginale* ISOLATE

SUMMARY

García O M A, Angeles O L E, Hernández S G, García T D, Aboytes T R, Rodríguez C S D. *Téc. Pecu. Méx.* Vol 36 No 3 1998 pp 197-202. The objective of the present work was to characterize the pathogenicity of the MEX-17-029-01 *Anaplasma marginale* isolate recovered from an outbreak in Yautepec, Morelos. One million infected erythrocytes of the isolate were inoculated into each of four susceptible steers. The prepatence period for the four animals was 15 days. The mean maximum rickettsemia was 21.4 ± 13 (sd) % at 30 days postinoculation (dPi) waning to $\leq 1\%$ by dPi 50. The initial packed cell volume (PCV) was $41.8 \pm 3.1\%$, which decreased to $14.5 \pm 2\%$ by dPi 31 to recover only to $32.8 \pm 5.5\%$ by dPi 85. Only three of the four bovines suffered fever ($t \geq 40$ C) between dPi 24 and 39. There was a weight increment of 12.7 ± 8.7 kg along the first 13 dPi, in contrast with a decrease of 18 ± 4.7 kg during the next 28 days (41 dPi) with a very slow recovery from then on. All four animals showed depression and pale mucous membranes which coincided with the maximum rickettsemia and lowest PCV. Serum samples from these animals at the ELISA test were negative at the beginning of the experiment (0.09 optical density [OD]), and reached values ranging from 0.2 y 0.7 OD between dPi 29 and 50, waning to 0.2 DO by dPi 85. The MEX-17-029-01 *A. marginale* isolate under the present conditions was capable of inducing a typical acute anaplasmosis syndrome in 100% of the inoculated bovines without causing death.

KEYWORDS: *Anaplasma marginale*, Virulence.

REFERENCIAS

1. Osorno B M, Ristic M. Anaplasmosis bovina con énfasis en control, diagnóstico, distribución de la enfermedad en México y uso de una vacuna atenuada de *Anaplasma marginale*. Vet. Mex. 1977. 8:85.
2. Kuttler K L, Zaugg J L, Johnson L.W. Serologic and clinical responses of premunized, vaccinated, and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. Am. J. Vet. Res. 1984. 45:2223.
3. Palmer G H, Barbet A F, Davis W C, McGuire T C. Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. Science. 1986; 231:1299.
4. Tello-Robles M, Alvarez-Martínez J, Ramos-Aragón J, Aboytes-Torres R, Cantó-Alarcón G J. La prueba de ELISA en el diagnóstico de la anaplasmosis. Tec. Pecu. Mex. 1986; 52:45.
5. Alonso M, Blandino T, Sánchez A. Caracterización de cepas de *Anaplasma marginale*. Rvta. Cub. Cienc. Vet. 1989; 20:71.
6. Parker R J, Shepherd R K, Trueman K F, Jones G W, Kent A S, Polkinhorne I G. Susceptibility of *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. Vet. Parasitol. 1984/85; 17:205.
7. Callow L L, Pepper P M. Measurement of and correlation between fever, changes in the packed cell volume and parasitaemia in the evaluation of the susceptibility of cattle to infection with *Babesia argentina*. Aust. Vet. J. 1974; 50:1.
8. Eriks I S, Stiller D, Goff W L, Panton M, Parish S M, McElwain T F, Palmer G H. Molecular and biological characterization of a newly isolated *Anaplasma marginale* strain. J. Vet. Diagn. Invest.