

ENSAYO DE UN INMUNOGENO EXPERIMENTAL INACTIVADO CONTRA *Anaplasma marginale*^a

Sergio D. Rodríguez Camarillo^b
Miguel Angel García Ortiz^b
Germinal Jorge Cantó Alarcón^{b,c}
Georgina Hernández Salgado^a
Noritza Santos Cerda^c
Ramón Aboytes Torres^{be}

RESUMEN

Rodríguez C S D, García O M A, Cantó A G J, Hernández S G, Santos C N, Aboytes T R. *Téc. Pecu. Méx.* Vol. 37 No 1 1999 pp 1-12. Para evaluar la capacidad de inducir protección específica de una mezcla de cuerpos de inclusión de tres aislados (MEX-15-099-01, MEX-17-029-01 y MEX-31-096-01) de *Anaplasma marginale* se inocularon en dos ocasiones con 21 días de diferencia, tres grupos de cinco animales cada uno, con una dosis de 3.3×10^9 cuerpos de inclusión inactivados de cada aislado bovino, mezclados con un adyuvante comercial. Cada animal de cada grupo vacunado junto con su correspondiente testigo fue desafiado en forma separada con una dosis de 1×10^8 eritrocitos infectados con los aislados incluidos en el inmunógeno experimental. La protección se evaluó en términos de las variaciones del volumen celular aglomerado, temperatura rectal, porcentaje de eritrocitos infectados y signos clínicos. Los resultados mostraron una protección total contra el aislado MEX-17, protección parcial (60%) contra el aislado MEX-15 y no se pudo corroborar la protección contra el aislado MEX-31. La cantidad de cuerpos de inclusión en el inmunógeno experimental podría ser modificada para ser usado en programas extensivos para el control de la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: *Anaplasma marginale*; Inmunógeno experimental, Cuerpos de inclusión

INTRODUCCION

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa, causada por la rickettsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale* caracterizada por producir pérdidas notables en la producción y considerada como uno de los mayores impedimentos en el mejoramiento genético de hatos nativos

de baja producción en nuestro país. Las pérdidas que ocasiona incluyendo muerte, abortos y baja producción son cuantiosas (1), en México se le considera responsable del 26% de la mortalidad total de los animales manejados en programas de mejoramiento genético por la industria aseguradora (Marusitch, 1995, comunicación personal). Los métodos actualmente disponibles para controlar la enfermedad como la premunización, donde se usa sangre infectada con números desconocidos de eritrocitos infectados, o en el tratamiento al inicio de una infección supervisada para prevenir la presentación de signos clínicos en forma severa más conocida como quimioprofilaxis no son confiables. En ambos casos el riesgo que se corre es considerable ya que por un lado

a Recibido el 24 de julio de 1998 y aceptado para su publicación el 22 de marzo de 1999.

b Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, INIFAP, SAGAR, km 11.5 Carr. Fed. Cuernavaca-Cuahtla, Jiutepec, Mor. 62550.

c Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Fisiología. INIFAP, SAGAR, km 1 Carr. a Colón, Ajuchitlán Qro.

d Facultad de Ciencias Naturales; Universidad Autónoma de Querétaro.

e Dirección actual: American Water Works Service, Inc., Quality Control and Research Laboratory, 1115 South Illinois Street, Belleville, IL. 62220-3102

la dosis puede ser muy grande y provocar la enfermedad en forma muy severa, o por el contrario, no existir un número de eritrocitos infectados que permitan el establecimiento de la infección en un período razonable para ser detectada para controlarla y establecer protección. En algunos países se usan cepas vivas atenuadas de *A. marginale* (2,3) o especies diferentes como *A. centrale* considerada como de menor virulencia (4). Sin embargo, estas vacunas a partir de cepas atenuadas pueden ocasionar la enfermedad en animales adultos (5, 6) o en el caso particular de *A. centrale*, como agente exótico su uso no está permitido en México (7). Más aún, estas cepas funcionan bien bajo esquemas de vacunación con una supervisión gubernamental estricta (6,8). El uso de agentes vivos conlleva también el riesgo de transmisión de otros patógenos que pueden traer graves consecuencias a programas de control y/o erradicación a nivel nacional (9). En México no existen vacunas comerciales para la protección del ganado contra esta enfermedad y aunque se han probado vacunas extranjeras para su registro, éstas no han protegido adecuadamente a la confrontación heteróloga con aislados mexicanos (10). En esta comunicación se presentan los resultados de los experimentos de un inmunógeno inactivado que indujo protección específica, sólida y de larga duración en la inmunización contra la anaplasmosis bovina en animales susceptibles.

MATERIALES Y METODOS

Aislados. *Anaplasma marginale* aislados en

i Laboratorios Schering Plough, México D.F. México.
ii Fenwal, Baxter, Jiutepec, México

tres estados de México y denominados como MEX-15-099-01 recuperado de un brote en un centro de acopio en el municipio de Texcoco, Estado de México y mantenido en congelación a -96 C; aislado MEX-17-029-01 recuperado de un brote en el municipio de Yautepéc, Morelos; estos dos aislados se han pasado en dos ocasiones en animales esplenectomizados e intactos para su reactivación previos a este experimento; aislado MEX-31-096-01, recuperado de un caso clínico agudo en el municipio de Tizimín, Yucatán y ha sido usado en innumerables ocasiones para la producción de antígeno para los ensayos de aglutinación en tarjeta y fijación del complemento.

Animales. Se utilizaron 45 bovinos de aproximadamente 18 meses de edad y 200 Kg de peso promedio, todos ellos libres de anticuerpos contra *A. marginale*, y *Babesia spp.* y provenientes de hatos libres a brucelosis y tuberculosis del estado de Chihuahua.

Preparación del inmunógeno experimental. Nueve animales fueron alojados en las instalaciones del CENID-PAVET y se les proporcionó una dieta de sostenimiento. Los animales fueron esplenectomizados e inmunodeprimidos con dexametasona (Azium®) a la dosis terapéutica de 6 mg/animal/día y usados en grupos de tres para la producción de sangre infectada con cada aislado como sigue: cada aislado se recuperó de la congelación a -196 C por descongelación rápida en baño maría a 37 C y se inocularon 1×10^{11} eritrocitos infectados de cada aislado en respectivos animales. Cuando se determinó que la rickettsemia estaba en franco ascenso se pasaron dos

INMUNOGENO EXPERIMENTAL CONTRA *A. marginale*.

unidades (Unidad Bolsang® CPDA-1ⁱⁱⁱ), de sangre infectada conteniendo aproximadamente el mismo número de eritrocitos infectados que la dosis anterior a cada uno de los segundos animales. El procedimiento se repitió para los terceros bovinos de cada serie, estos últimos animales fueron exsanguinados cuando el porciento de eritrocitos infectados (PEI) era superior a 20 en un período menor a siete días. La sangre se colectó en bolsas con anticoagulante, lavada y congelada en 10% dimetil sulfóxido a -70 C hasta el momento de su uso (11). Para liberar los cuerpos de inclusión de las membranas de los eritrocitos, la sangre lavada se suspendió en el volumen original en el que se congeló, se sometió a dos minutos de sonicación a 50% de poder con una micro sonda de 12 x 3mm (sonicador Fisher Dismembrator, Modelo 300ⁱⁱⁱ), los cuerpos de inclusión se concentraron mediante centrifugación diferencial (6), y la purificación se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Tebele y col. (12). La liberación de los cuerpos de inclusión se verificó mediante microscopía, donde después de la sonicación se observó a los cuerpos de inclusión libres y sólo unos cuantos eritrocitos infectados intactos. Los cuerpos de inclusión se mezclaron con el adyuvante sintético trehalosa dicorinomicolato (S-TDCM®) en aceite Drakeol 6 VR^{iv}) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, suspendiendo los cuerpos de inclusión en un volumen final de 0.9 ml de una solución salina tamponada pH 7.4/0.5% Tween 80^v

(polioxietilensorbitan monooleato 80) y 0.1 ml del adyuvante. La mezcla se homogenizó mediante sonicación a 60% de poder en cinco ciclos de un minuto con intervalos de 30 segundos de descanso usando el aparato anteriormente mencionado.

Vacunación. Treinta bovinos fueron usados para la evaluación del inmunógeno. Se alojaron en las instalaciones del rancho González Blanco, mpio. El Márquez en Querétaro donde se le proporcionó una dieta de engorda y agua. Los bovinos fueron lotificados en grupos de cinco y usados como sigue: grupos 1, 2 y 3 fueron inoculados vía subcutánea en las tablas del cuello con cuerpos de inclusión equivalentes a 3.3×10^9 eritrocitos infectados de cada aislado (dando un total equivalente a 1×10^{10} cuerpos de inclusión) en un volumen final de 1 ml los días 0 y 21. Los grupos 4, 5 y 6 fungieron como testigos y recibieron 1 ml de un placebo compuesto de la misma solución en la que se suspendieron los cuerpos de inclusión en el mismo lugar que los vacunados.

Preparación de dosis de confrontación. Para este propósito se usaron tres bovinos esplenectomizados. Cada aislado fue descongelado en forma rápida en baño de agua a 37 C e inoculado a un animal. Al tercer día consecutivo de observar incremento en el PEI y superior a uno, se obtuvo una unidad de sangre que se transfirió al segundo animal intacto, el inoculo fue tomado de éste cuando el PEI alcanzó un mínimo de 10 durante la fase de incremento logarítmico.

Confrontación. Cada uno de los animales se confrontó con una dosis de 1×10^8

iii Fisher Scientific, Springfield, New Jersey, EE.UU.

iv Ribl ImmunoChem Research Inc., Hamilton Montana EE.UU.

v Sigma Chemical Company, San Luis Missouri, EE. UU.A.

eritrocitos infectados con *A. marginale* como sigue: el día 43 posvacunación (Pv), los grupos 1 y 4 recibieron el aislado MEX-15-099-01, y los grupos 2 y 5 el aislado MEX-17-096-01; Los grupos 3 y 6 recibieron el aislado MEX-31-029-01 hasta el día 73 Pv en función de que su reactivación fue mucho más lenta que la de los otros aislados.

Monitoreo. Inicialmente los animales se monitorearon cada cuatro días a partir de la primera inoculación para evaluar la presencia de posibles efectos secundarios del inmunógeno experimental. En cada ocasión se midió la temperatura rectal y se observaron los animales para determinar la presencia de signos clínicos típicos de anaplasmosis, también se tomaron muestras de sangre para medir el volumen celular aglomerado (VCA) y PEI en torrente sanguíneo, mediante la observación de laminillas de sangre teñidas con colorante de Giemsa, y suero para la evaluación de anticuerpos específicos por medio del ensayo de ELISA. El ELISA se realizó como se ha descrito (13), con algunas modificaciones como sigue; se usó una dilución 1:200 de un antígeno crudo, obtenido de eritrocitos infectados, previamente ajustado a una concentración de 1% vol/vol, del aislado MEX-31-029-01, de acuerdo a protocolos publicados (14), el antígeno se trató con una solución de sulfato de dodecil-sódico a una concentración final de 0.05% por 30 minutos a temperatura ambiente, se usó una dilución 1:10,000 de un conjugado anti-IgG bovina-fosfatasa alcalina^{vi} y como

sustrato fosfato de *p*-nitrofenil^{vi}, el ensayo se leyó a una longitud de onda de 405 nm en un densitómetro automático Multiskan® Plus^{vii}. Posterior a la inoculación con eritrocitos infectados para la confrontación, los animales se muestrearon de igual manera que se describió anteriormente, cada cuatro días hasta el momento en que se detectó el primer animal positivo a eritrocitos infectados por microscopía óptica, momento en que la toma de muestras se hizo cotidiana. Los animales severamente afectados recibieron oxitetraciclinas (Emicina Líquida^{viii}) a una dosis de 20 mg/kg de peso vivo para evitar la muerte.

Análisis estadístico. Las medias de los valores de los parámetros de los grupos se analizaron mediante un análisis de varianza y donde se encontraron diferencias, se utilizó la prueba de Duncan para determinar las diferencias (15).

RESULTADOS

El proceso de obtención del inmunógeno dio en un principio un volumen de cuerpos de inclusión muy manejable, menos de una décima parte del volumen final de la suspensión, que al ser combinado con el adyuvante rindió una suspensión blanca, homogénea y estable, que solo requirió ser agitada manualmente al momento de su aplicación. Los animales vacunados fueron monitoreados las siguientes tres semanas posteriores a cada vacunación, durante las que no presentaron signos clínicos aparentes o variaciones de los parámetros fisiológicos observados, VCA, temperatura rectal o presencia de eritrocitos infectados, atribuibles a anaplasmosis.

vi Sigma Chemical Company, San Luis Missouri, EE. UU. A.

vii LabSystems Oy. Helsinki, Finlandia.

viii Pfizer Salud Animal, México D.F., México.

INMUNOGENO EXPERIMENTAL CONTRA *A. marginale*.

Los valores de DO en el ELISA de los sueros de los animales al inicio del experimento fueron comparables a los de los controles negativos (0.04 a 0.06). Veinte días posteriores a la segunda vacunación los sueros de los animales vacunados alcanzaron valores de 0.34 a 0.58 de DO, que fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.01$) a los mostrados al inicio del experimento, indicando la producción de anticuerpos (IgG) específicos contra *A. marginale* (Cuadro 1). Igualmente, las lecturas de DO se incrementaron hasta 0.75, cuarenta días posdesafío (80 días posvacunación) en los grupos 1 y 2 y se mantuvieron hasta el fin del experimento, 90 días posvacunación. Los animales de los grupos testigos no presentaron evidencia de anticuerpos durante el período previo a la confrontación pero los valores de DO al ELISA posteriores a la confrontación variaron entre 0.14 y 0.39 (media 0.269 ± 0.076 absorbancia) hacia el fin del experimento.

A la confrontación, los animales vacunados y desafiados con los aislados MEX-17 y MEX-31 (grupos 2 y 3) no mostraron signos clínicos aparentes de la enfermedad aún cuando tres animales, 60% del grupo 2 alcanzaron temperaturas superiores a los 40 C por un día (Cuadro 1).

En contraste, los animales vacunados y desafiados con el aislado MEX-15 sufrieron cuadros clásicos de anaplasmosis y tres de ellos presentaron fiebre ≥ 40 C por lo menos durante un día; dos de estos últimos recibieron quimioterapia a pesar de la cual, uno de ellos murió el día 33 Pd. De la misma

forma, los grupos testigos desafiados con los aislados MEX-15 y MEX-17 (grupos 4 y 5) presentaron la enfermedad en forma aguda de los que cinco y cuatro respectivamente, presentaron fiebre.

Asimismo, se administró tratamiento a cuatro y tres bovinos respectivamente para evitar la muerte. En contraste, los bovinos del grupo 6 (desafío con el aislado MEX-31) presentaron la enfermedad en forma muy moderada aún cuando dos presentaron fiebre por lo menos por un día, y no se requirió tratamiento. Con respecto de los parámetros en estudio, en general se observó un descenso franco del VCA de los animales testigos entre los días 8 y 21, en contraste, el descenso del VCA en los grupos vacunados se observó entre los días 17 y 30 (Figura 1).

El promedio de los VCA mínimos observados en los grupos testigos desafiados con los aislados MEX-15 y MEX-17 fue de 10.4 y 9.8 % respectivamente, mientras que el de los desafiados con el aislado MEX-31 fue de 17.6%. Los grupos vacunados por su parte, mostraron un VCA mínimo de 10.6, 15.6 y 18.4% para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente (Cuadro 1).

En el caso de los PEI se observa un franco ascenso entre los días 12 y 17 en todos los animales testigos, independientemente del aislado con el que se hayan confrontado (aunque el observado en los del grupo 6 fue muy bajo), en contraste con los grupos vacunados que iniciaron el ascenso del PEI hasta el día 17 continuando hasta el día 26 (Figura 2).

Los promedios de los PEI máximos (Cuadro 1) para los grupos vacunados y testigos respectivamente muestran valores estadísticamente significativos ($p < 0.01$) al desafío con los aislados MEX-15 (10.68 vs 24.2) y MEX-17 (4.42 vs 17.42). Los grupos confrontados con el aislado MEX-31 no mostraron diferencia estadísticamente significativa además de que los valores de PEI fueron muy bajos en general.

DISCUSION

Los datos obtenidos en el presente experimento indican que es posible la inducción de protección específica contra la anaplasmosis bovina mediante la inoculación de cuerpos de inclusión inactivados y parcialmente purificados, mezclados con adyuvante comercial. El inmunógeno experimental, a la dosis usada en dos ocasiones en el presente experimento, indujo la producción de anticuerpos, indujo un retraso en la presentación de la parasitemia y en el inicio del descenso del VCA, independientemente del aislado usado para la confrontación. Asimismo, la intensidad de los signos clínicos se vio claramente reducida comparado con los testigos respectivos en los grupos desafiados con los aislados MEX-17 y MEX-15. Aún cuando las reacciones observadas en estos animales contra el aislado MEX-17 y particularmente contra el aislado MEX-15 fueron de mayor intensidad que los publicados para productos semejantes al desafío (16), esta variación puede deberse fácilmente a las diferentes dosis de confrontación, ya que en el presente experimento se usaron 1×10^8 eritrocitos

infectados de un PEI ascendente de cada aislado, mientras que en la publicación antes citada (9), se usó una dosis de 0.1 ml de sangre de un animal portador asintomático, independientemente del número de eritrocitos infectados.

Los animales testigos del presente experimento comenzaron a presentar signos clínicos desde los ocho días Pd, mientras que los del estudio señalado fueron monitoreados por un período de más de 100 días Pd, y se usó un número muy reducido de bovinos. Aunque una vacuna inactivada de este tipo es actualmente comercializada con buenos resultados en los Estados Unidos y con aparentemente amplio espectro con respecto de los aislados contra las que protege (5), al ser probada contra los aislados MEX-15 y MEX-17 y MEX31, no indujo la protección que normalmente se observa contra aislados del mismo país (10), muy probablemente debida a la ausencia de antigenicidad cruzada con los aislados mexicanos (17,18).

A pesar de que el inmunógeno experimental no indujo la protección esperada contra todos los aislados de los que está compuesta, la dosis usada en este experimento fue lo suficientemente pequeña como para permitir ajustes de la cantidad de cuerpos de inclusión que la componen en experimentos subsecuentes.

De la misma forma la severidad del cuadro clínico presentada en los animales del grupo 1 al desafío, fue igual a la observada en bovinos adultos al ser vacunados con

INMUNOGENO EXPERIMENTAL CONTRA *A. marginale*.

cepas vivas de *A. centrale* (6) y de menor intensidad aún que los vacunados con cepas de *A. marginale* atenuadas en borrego (19).

Por otro lado, es sabido que los animales que sufren la infección sea en forma natural o inducida, quedan protegidos contra infecciones homólogas pero parcialmente protegidos contra infecciones heterólogas (2,5,20), este principio se ha tratado de usar para el diseño de vacunas derivadas de antígenos de membranas de cuerpos inclusión del *Anaplasma* que conservan epitopos homólogos en aislados de regiones geográficas muy distantes (21), el uso de cuerpos de inclusión de tres aislados diferentes intenta cubrir un espectro amplio de antígenos dentro de los aislados que se encuentran en México, abriendo la posibilidad para el uso regional o aún nacional de un inmunógeno inactivado de origen nacional, mientras que se desarrollan otro tipo de vacunas que en un número reducido de antígenos sintéticos cubran dicho espectro.

Aún cuando se ha argumentado en contra del uso de productos que contienen fragmentos de eritrocito del hospedero, debido a la posibilidad de inducción de isoanticuerpos que pueden desencadenar la isoeritrolisis neonatal de terneros de madres vacunadas (5,22), los cuerpos de inclusión (11) usados para este inmunógeno y mezclados con adyuvante completo de Freund al ser inoculados por una ocasión en conejos, no indujeron la producción de anticuerpos anti-eritrocito que sea detectable en el ELISA usando estroma de eritrocitos sanos como antígeno (Rodríguez y col., datos no publicados).

Los resultados derivados del presente estudio abren de nuevo la posibilidad de usar agentes inactivados seguros, quizá para uso regional y aún nacional para el control y/o erradicación de la anaplasmosis bovina, inhibiendo así la introducción ilegal de vacunas vivas atenuadas o derivadas de *A. centrale*, que por ser un agente exótico está prohibido en México. Sin embargo se requieren experimentos para determinar la dosis óptima, espectro de protección, duración de la inmunidad, en función de la necesidad de proteger los hatos nacionales contra esta enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México A.C.

Se agradece al Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria del estado de Querétaro las facilidades en la manutención y manejo de animales experimentales. Se agradece también al Dr. Jorge Luengo Creel la donación de Azium®, al Dr. Terry Ulrich por la donación del adyuvante, a Bayer de México por la donación de Medicamentos usados en el tratamiento de bovinos esplenectomizados y a Pfizer de México por la donación de Emicina® usado para la eliminación de la infección por *A. marginal* en los bovinos esplenectomizados.

Cuadro 1. Medias \pm desviación estándar de los parámetros en observación de bovinos vacunados con cuerpos iniciales de tres aislados de *A. marginale* y sus testigos desafiados con los mismos aislados.

Parámetro	Desafío MEX-15		Desafío MEX-17		Desafío MEX-31	
	grupo 1 Vacunado	grupo 4 testigo	grupo 2 vacunado	grupo 5 testigo	grupo 3 vacunado	grupo 6 testigo
VCA mínimo	10.6 \pm 0.55	10.4 \pm 0.89	15.6 \pm 2.88	9.8 \pm 2.95	18.4 \pm 3.58	17.6 \pm 3.05
% pérdida VCA	58.62 \pm 7.97	63.59 \pm 5.80	48.51 \pm 6.70a	72.43 \pm 6.14b	30.25 \pm 15.74	34.8 \pm 7.36
Día inicio PEI	16.8 \pm 1.79a	12.4 \pm 0.89b	17.0 \pm 1.41a	12.4 \pm 0.89b	20.6 \pm 2.88a	8.4 \pm 6.07b
Día de PEI max.	23.0 \pm 2.73a	17.8 \pm 1.10b	26.6 \pm 5.36a	16.8 \pm 1.79b	26.2 \pm 2.77	19.6 \pm 4.1
PEI máximo	10.68 \pm 10.02a	24.2 \pm 8.75b	4.42 \pm 2.31a	17.42 \pm 5.18b	3.67 \pm 4.10	4.94 \pm 1.14
DO inicial	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02	0.06 \pm 0.05	0.05 \pm 0.01	0.06 \pm 0.05	0.04 \pm .04
DO 2 ^a vacunación	0.34 \pm .06a	0.05 \pm 0.05b	0.44 \pm 0.17a	0.12 \pm 0.15b	0.58 \pm 0.09a	0.05 \pm 0.01b
DO 40 d Pv	0.75 \pm .05a	0.30 \pm .006b	0.68 \pm .07a	0.23 \pm 0.07b	NA	NA
Temp \geq 40 C	3	4	3	5	0	2
Muertos	1*	0	0	1**	0	0
Tratados	2	4	0	3	0	0

VCA, volumen celular aglomerado; PEI, porciento de eritrocitos infectados; DO, densidad óptica.

Literales diferentes para el mismo rubro indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$) ente los grupos desafiados con cada aislado.

muerte día 33 Pd; ** muerte día 22 Pd.

Figura 1. Promedios por grupo del volumen celular aglomerado (VCA) de los animales vacunados y controles. Panel superior: grupo 1, vacuna experimental vs aislado MEX-15; grupo 2, vacuna experimental vs aislado MEX-17; y grupo 3, vacuna experimental vs aislado MEX-31; Panel inferior grupo 4, testigo vs aislado MEX-15; grupo 5, testigo vs aislado MEX-17; grupo 6, testigo vs aislado MEX-31.

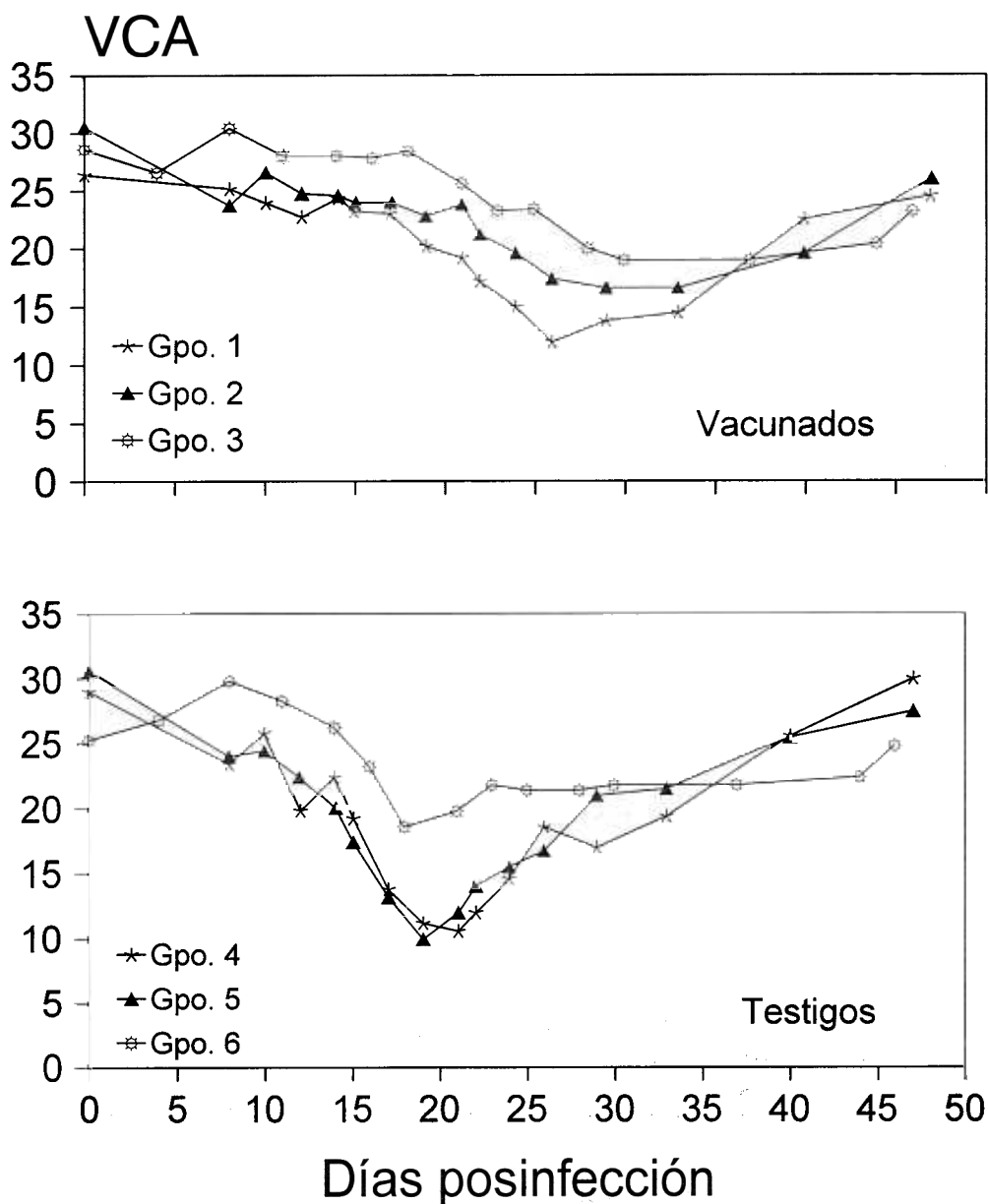
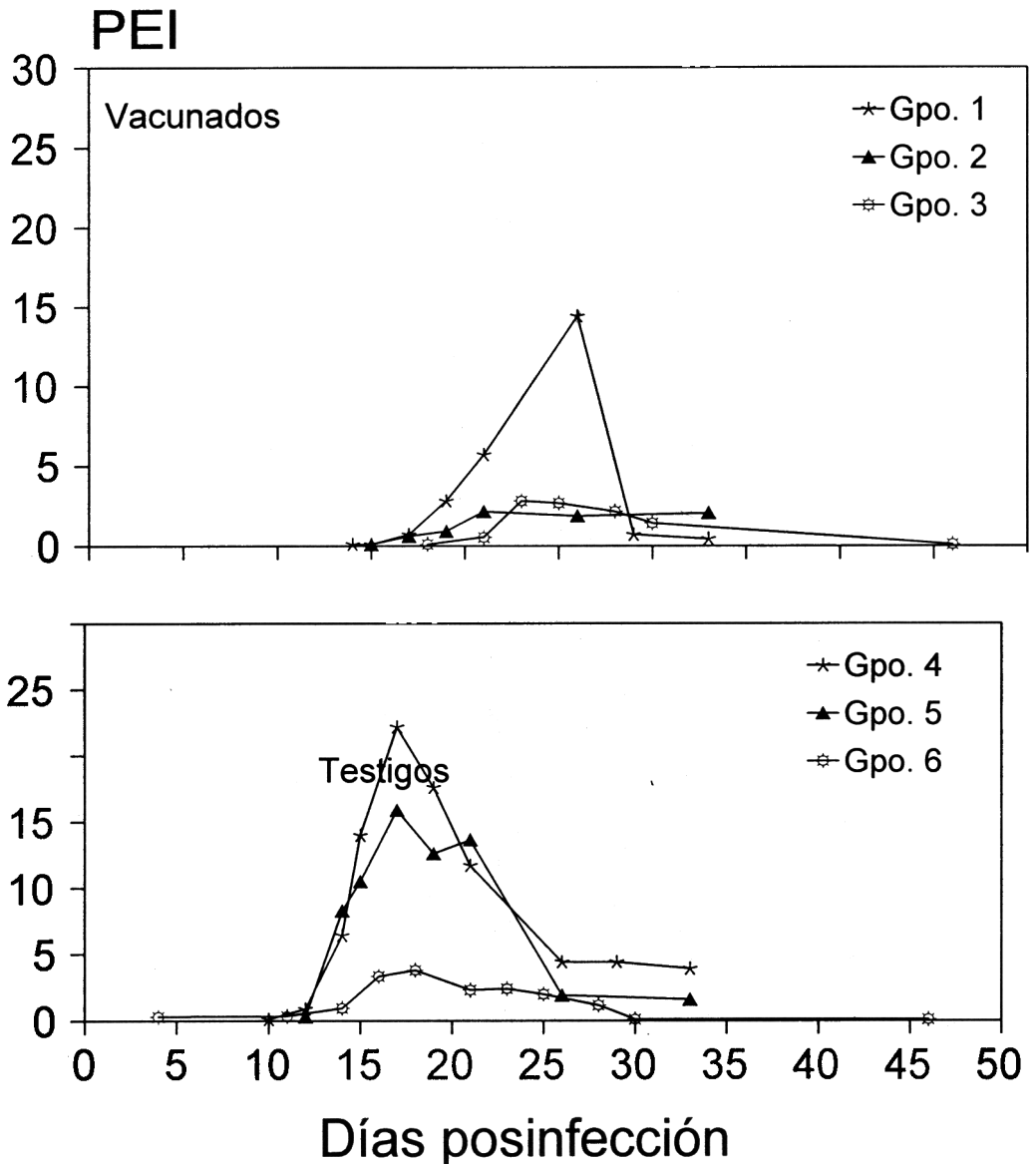


Figura 2. Promedios por grupo del porcentaje de eritrocitos infectados (PEI) de los animales vacunados y testigos. El panel superior muestra los grupos vacunados con el inmunógeno experimental. Los animales de los grupos vacunados fueron inoculados con el mismo inmunógeno y los animales fueron desafiados con los aislados correspondientes a los números que sustentan. El panel inferior muestra los grupos testigos e igualmente confrontados con los aislados de los mismos números. Los grupos son como en la figura 1.



PRELIMINARY ESSAY OF AN INACTIVATED, EXPERIMENTAL *Anaplasma marginale* IMMUNOGEN

SUMMARY

Rodríguez C S D, García O M A, Cantó A G J, Hernández S G, Santos C N, Aboytes T R. *Téc. Pecu. Méx.* Vol. 37 No 1 1999 pp 1-12. In order to evaluate the specific protection induced by a mixture of inclusion bodies from three different *Anaplasma marginale* isolates, three groups of five animals were inoculated twice 21 days apart, with a dose of inclusion bodies of each isolate equivalent to 3.3×10^9 infected erythrocytes, mixed with a commercial adjuvant. A vaccinated group along with a similar control group were challenged with 1×10^8 infected erythrocytes of either of the strains included in the experimental immunogen. Protection was measured by in terms of variation of packed cell volume, Rectal temperature, percent infected erythrocytes and clinical signs. Results showed complete protection against MEX-17 isolate, partial (60%) protection against MEX-15 isolate, and protection could not be tested due to lack in virulence of the MEX-31 isolate. This experimental immunogen can be improved and tested to be used in extensive control programs against bovine anaplasmosis.

KEYWORDS: *Anaplasma marginale*; Experimental immunogen, Inclusion bodies.

REFERENCIAS

1. Ristic M. Anaplasmosis. En: Bovine Medicine and Surgery ed. by H.I. Amstutz, Am. Veterinary Publications, Inc. 2nd Ed. Vol. 1 Sta Barbara, Cal.1980; pp 324.
2. Vizcaino O, Corrier D E, Terry M K, Carson C A, Lee A J, Kuttler K L, Ristic M, Trevino G S., Comparison of three methods of immunization against bovine anaplasmosis; evaluation of protection afforded against field challenge exposure. *Am. J. Vet. Res.* 1980; 41(7); 1066.
3. Zaraza H, Kuttler K L. Comparative efficacy of different immunization systems against anaplasmosis. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 1971; 3:77.
4. Pipano E. Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 1997 Nov;29(4 Suppl):86S-90S
5. 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(11):2223.
6. Pipano E, Mayer E, Frank M.. Comparative response of Friesian milking cows and calves to *Anaplasma centrale* vaccine. *Br. Vet. J.* 1985; 141:174.
7. CONASA, Análisis de la situación de las vacunas contra anaplasmosis y babesiosis. Conclusiones y recomendaciones presentadas por el Comité de Enfermedades Parasitarias. Memoria de la IV Reunión Anual. 14-17 de Nov. México D.F. 1995. pp. 79-81
8. Pipano E, Krigel Y, Frank M, Markovics A, Mayer E. Frozen *Anaplasma centrale* vaccine against anaplasmosis in cattle. *Br. Vet. J.* 1986; 142(6):553.
9. Rogers R J, Dimmock C K, de Vos A J, Rodwell B J. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced *in vivo* against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust. Vet. J.* 1988; 65:285.
10. CONASA,. Experiencias sobre el uso de vacunas contra *Anaplasma marginale*. Memoria de la IV Reunión Anual. 14-17 de nov. México D.F. 1995; pp. 452.
11. Palmer G H, McGuire T C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J. Immunol.* 1984; 133(2):1010.
12. Tebele N, McGuire T C, Palmer G H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect. Immun.* 1991. Sep; 59(9):3199.
13. Tello-Robles M J, Alvarez-Martínez J, Ramos-Aragón, Aboytes-Torres R, Cantó-Alarcón G.J. La prueba de ELISA en el diagnóstico de la anaplasmosis. *Tec. Pecu. Mex.* 1986; 52:45.
14. Amerault T E, Roby T O. Preparation and characterization of a soluble *Anaplasma marginale* antigen. *Am. J. Vet. Res.* 1967, 28(125); 1067.
15. Snedecor G W, Cochran W G. *Statistical Methods.* The Iowa State University Press. Ames Iowa, 1980; p. 215.
16. Hart L T, Todd W J, Luther D G, Hoyt P G, Morris N G, McDonough K C, Hoyt M J. Progress toward an improved vaccine for anaplasmosis. *Louisiana Agriculture* 1987; 31:3.

17. McGuire T C, Palmer G H, Goff W L, Johnson M I, Davis W C. Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. *Inf. Immun.* 1984; 45:697.
18. Tebele N, Palmer G H. Cross protective immunity between the Florida and a Zimbabwe stock of *Anaplasma marginale*. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 1991; 23:197.
19. Jorgensen W K, Bock R E, De Vos A J, Shiels I A. Sheep-adapted *Anaplasma marginale* maintains virulence for cattle. *Aust. Vet. J.* 1993; 70(5):192.
20. Palmer G H. *Anaplasma* Vaccines. En: *Veterinary and Hemoparasite Vaccines*. I.G. Wright (ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Fl. 1989; Pp. 2-29.
21. Palmer G H, Barbet A F, Musoke A J, Katende J M, Rurangirwa F , Shkap V, Pipano E, Davis W C, McGuire T C. Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenya and the United States. *Int. J. Parasitol.* 1988; 18:33.
22. Dimmock C K, Bell K. Hemolytic disease of the newborn in calves. *Aust. Vet. J.* 1970; 46:44.