

Anaplasma marginale: Diferentes grados de virulencia en dos aislados mexicanos

Miguel Ángel García Ortiz *^{***}
Ramón Aboytes Torres ***
Georgina Hernández Salgado *
Germinal Jorge Cantó Alarcón *[†]
Sergio Darío Rodríguez Camarillo *[†]

Abstract

The present work was designed to evaluate the virulence of Mexican *Anaplasma marginale* isolates MEX-15-099 (MEX15) and MEX-31-096 (MEX31). Two groups of four steers were inoculated with a dose of 1×10^6 infected erythrocytes of either of the isolates per animal. Experimental animals were monitored for 65 days from the inoculation date. Rectal temperature, packed cell volume (PCV), rickettsemia (PIE) and presence of specific antibodies detected by the ELISA, were registered. MEX15-infected steers reached maximal rickettsemia between 8.8% and 34.7%, while MEX31 steers only maximal values between 0.1% and 16.3%. Only MEX15 steers suffered fever $> 40^\circ\text{C}$ coincidental with the amplification of the rickettsemia. A PCV loss of $68.2 \pm 8.9\%$ was registered for the MEX15 steers, which was statistically different ($P < 0.05$) to the $50.1 \pm 8.9\%$ loss registered for the MEX31 steers. Except for one MEX31 animal, all other animals developed O.D. readings between 0.355 and 0.829. Only the MEX15-infected animals presented clinical signs of anaplasmosis, whereas only one of the infected with the MEX31 isolate did. Under the conditions of this study, isolate MEX15 appeared more virulent than isolate MEX31.

Key words: *ANAPLASMA MARGINALE, VIRULENCE, STEERS.*

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la virulencia de los aislados MEX-15-099 (MEX15) y MEX-31-096 (MEX31) de *Anaplasma marginale*. Dos grupos de cuatro bovinos susceptibles, fueron inoculados con una dosis de 1×10^6 eritrocitos infectados por bovino. La temperatura rectal, el volumen celular aglomerado (VCA), la rickettsemia y la presencia de anticuerpos específicos se registraron durante el periodo experimental de 65 días. Los animales del grupo MEX15 alcanzaron un máximo PEI entre 8.8% y 34.7%; en contraparte, en los animales del grupo MEX31 se observaron valores máximos en el PEI entre 0.1% y 16.3%. Sólo los bovinos del grupo MEX15 presentaron fiebre $> 40^\circ\text{C}$, coincidente con la amplificación de la rickettsia. Se registró una pérdida media del VCA de $68.2 \pm 8.9\%$ en los animales inoculados con MEX15 y de $50.1 \pm 8.9\%$ en los inoculados con MEX31, esta diferencia fue significativa entre los grupos ($P < 0.05$). Excepto por un animal infectado con MEX31, todos desarrollaron valores de DO entre 0.355 y 0.829. Todos los animales infectados

Recibido el 19 de febrero de 1999 y aceptado el 21 de agosto de 1999.

* Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Km 11.5, Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, 62500, Jiutepec, Morelos, México.

** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

*** American Water Works Service, Inc., Quality Control and Research Laboratory, 1115 South Illinois Street, Belleville, IL 62220-3102, U.S.A.

† Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, 16 de septiembre 63 Oriente, Centro, Santiago de Querétaro, 76000, Querétaro, Querétaro, México.

‡ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Campus Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.

con MEX15 desarrollaron anaplasmosis clínica, mientras que sólo uno de los infectados lo fue con el aislado MEX31. Las observaciones anteriores muestran una mayor virulencia para el aislado MEX15.

Palabras clave: *ANAPLASMA MARGINALE*, VIRULENCIA, BOVINOS.

La anaplasmosis bovina, causada por rickettsias intraeritrocíticas del género *Anaplasma*, es una enfermedad infecciosa ampliamente distribuida que ocasiona grandes pérdidas económicas en países en desarrollo.¹ En México, la enfermedad es producida por *A. marginale*, la especie más dañina del mismo género² a la que se le responsabiliza por el 26% de la mortalidad total de bovinos dentro de los programas de mejoramiento genético de hatos nativos de baja producción.³ La anaplasmosis puede presentarse en cuadros clínicos hiperagudos, con muerte súbita en ausencia de signos clínicos, cuadros agudos o crónicos, con un serio retraso del crecimiento en animales jóvenes y en muchos casos se pueden observar abortos.⁴ Las variaciones en la virulencia de aislados de diferentes regiones geográficas⁵⁻⁷ se han asociado a diferencias estructurales de las proteínas del microorganismo.⁸ Sin embargo, los análisis de *A. marginale* publicados hasta el momento contemplan características biológicas, inmunoquímicas, o moleculares en forma aislada y no en forma sistemática.^{9,10} De esta forma, existe una urgente necesidad de tipificar la variabilidad que se presenta tanto en la virulencia como en el perfil molecular de cepas del microorganismo de regiones geográficas diferentes. En el presente trabajo se evalúan los cambios en los parámetros hematológicos, fisiológicos e inmunológicos de bovinos susceptibles infectados con dos aislados de *A. marginale* recuperados de regiones geográficas diferentes de México. Asimismo, los resultados se comparan con los publicados para otros aislados, tanto mexicanos como de otras partes del mundo,^{6,7,9-11} para determinar si esta variabilidad se presenta también en los aislados mexicanos previamente publicados.

Los aislados evaluados se designaron de acuerdo a la nomenclatura del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), para los estados y municipios donde fueron obtenidos por primera vez.

El aislado MEX-15-099 (MEX15), recuperado de un brote agudo en un lote de acopio en el municipio de Texcoco, Estado de México, México, ha permanecido mayormente en criopreservación (-196°C) con no más de 3 pasos en terneros esplenectomizados para su mantenimiento. El aislado MEX-31-096 (MEX31)* fue recuperado de un animal portador asintomático del municipio de Tizimín, Yucatán, México, y ha sido pasado en numerosas ocasiones en bovinos esplenectomizados e intactos.**

Para evaluar los aislados se usaron 12 bovinos *Bos taurus* en crecimiento, de aproximadamente 18 meses de edad y de 160 kg de peso, clínicamente sanos y libres de anticuerpos contra *A. marginale*, *Babesia* spp y negativos a las pruebas oficiales a brucelosis y tuberculosis. Los animales se mantuvieron en los corrales del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria en Jiutepec, Morelos, México, y recibieron agua y alimento *ad libitum*.

Cada aislado se reactivó de la criopreservación mediante descongelación rápida a 37°C e inoculación intravenosa consecutiva en 2 bovinos esplenectomizados e inmunodeprimidos con dexametasona*** a la dosis terapéutica (6 mg kg⁻¹ peso vivo).

Del segundo bovino de cada serie se tomó sangre infectada y se transfirió una dosis de 1×10^6 eritrocitos infectados (ei) a cada uno de 4 bovinos intactos, que no recibieron medicamento alguno durante 65 días de la evaluación, dejando que el cuadro clínico se resolviese en forma natural con la muerte o la recuperación. Cada 48 horas se determinó la temperatura rectal y se tomaron muestras de sangre caudal en tubos al vacío con o sin EDTA (Vacutainer®[†]) para a) medir el volumen celular aglomerado (VCA) por la técnica de microhematócrito; b) determinar la presencia de la rickettsia y c) cuantificar el porcentaje de eritrocitos infectados (PEI) en laminillas de sangre teñidas con colorante de Giemsa. Los muestreos se hicieron cada 24 horas desde el momento de la detección de la rickettsia por microscopía óptica.

También se procesaron muestras de suero por el ELISA para determinar la presencia de anticuerpos específicos.^{3,12} Antígeno de la cepa MEX31 se mezcló en volúmenes iguales con dodecilo sulfato de sodio al 0.1%, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se diluyó a una concentración final 1:200; los sueros problema se diluyeron 1:100, y la reacción se detectó con una antiinmunoglobulina G bovina (molécula completa) conjugada a la enzima fosfatasa alcalina.

* Donado amablemente por personal del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal de la Dirección General de Salud Animal de la Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural.

** Hugo Fragozo Sánchez, comunicación personal.

*** Azium®, amablemente donado por el doctor Jorge Luengo Creel, Laboratorios Schering Plough de México.

† Laboratorios Becton Dickinson de México.

Los valores se expresaron en unidades de densidad óptica (DO). Las medias de las variables se analizaron mediante la prueba *t* de Student y en donde se encontraron diferencias, éstas se corroboraron con la prueba no paramétrica U de Mann Whitney.¹³

Las variaciones de rickettsemia, VCA y la cinética de anticuerpos a lo largo del periodo experimental para los animales infectados con el aislado MEX15 y MEX31 se muestran en las Figuras 1A y 1B, respectivamente. El periodo de prepatencia fue similar entre los animales de ambos grupos (MEX15: 18 ± 7.3 y MEX31: 12.5 ± 1.9 días posinoculación [d.pi.]). Las medias de los valores del PEI más altos fueron de 23.1 ± 11.4 y de 8.5 ± 7.3 para los animales infectados con los aislados MEX-15 y MEX-31, respectivamente; diferencia que no fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Los cuatro bovinos del grupo MEX15 presentaron fiebre $> 40^{\circ}\text{C}$ un promedio de 5.2 ± 3.3 días y desarrollaron signos clínicos de anaplasmosis aguda (depresión, anorexia temporal, recumbencia y palidez de mucosas); en contraparte, ninguno de los bovinos del grupo MEX31 presentó fiebre, a pesar de que uno de ellos sí mostró signos clínicos, coincidentes con los valores máximos del PEI y mínimos de VCA.

El promedio inicial del VCA fue semejante estadísticamente para ambos grupos (MEX15: 32 ± 1.7 y MEX31: $31 \pm 3.8\%$) y fue considerado normal. El máximo decremento del VCA para el grupo MEX15 fue de $68.2 \pm 8.9\%$, significativamente mayor ($P < 0.05$) que $50.1 \pm 8.9\%$, del grupo MEX31. Los valores iniciales de DO al ELISA fueron negativos para ambos grupos (MEX15: 0.092 ± 0.023 y MEX31: 0.055 ± 0.044) y se consideraron como positivos entre los 28 y 37 d.pi. para el grupo MEX15 y entre los 32 y 34 d.pi. y para el grupo MEX31; estos periodos coincidieron con el inicio de la rickettsemia para ambos aislados (Figuras 1A y 1B). Un bovino infectado con la cepa MEX31 presentó un PEI ≤ 1 y valores negativos (D.O ≤ 0.113) al ELISA durante todo el periodo experimental.

Los presentes resultados muestran coincidencias y diferencias en algunos de los parámetros que reflejan la virulencia de los aislados estudiados. El periodo de incubación para ambas cepas fue relativamente largo, ya que aun cuando la rickettsia fue detectada al microscopio tempranamente (11-18 d.pi.) en la mayoría de los animales de los dos grupos, ésta no fue constante ni se incrementó desde ese momento (Figuras 1A y 1B) como se ha observado en otros estudios.^{4-7,11} La diferencia en la duración del periodo de incubación, relativa a publicaciones anteriores, no se puede explicar en función de la edad de los animales o dosis usadas, ya que en esos trabajos se han usado animales de menor o de la misma edad inoculados con dosis semejantes¹¹ o mayores (1.5×10^8 ei).⁶ Tampoco se pueden explicar en términos de la forma de activación de los organi-

mos, ya que en otros trabajos se han usado esquemas semejantes al usado aquí; es muy posible que se trate de una característica propia de estos aislados. Esta forma de comportamiento del aislado MEX31 se ha observado también al reactivarla para la producción de antígeno o para el desafío de animales vacunados.³

Asimismo, la intensidad de los signos clínicos fue proporcional a la de la rickettsemia y reducción de VCA; sin embargo, este fenómeno no se observa siempre, pues aunque también se observó al evaluar el aislado mexicano MEX17 del estado de Morelos,¹¹ el aislado australiano GP indujo un cuadro de anaplasmosis aguda, con menos de 10% de rickettsemia y 50% de reducción en el VCA.⁷ Se puede asumir, con cierta seguridad, que las variaciones observadas en los parámetros estudiados no son un efecto de la dosis a la que los aislados fueron inoculados, ya que el cuadro clínico inducido por el aislado GP a

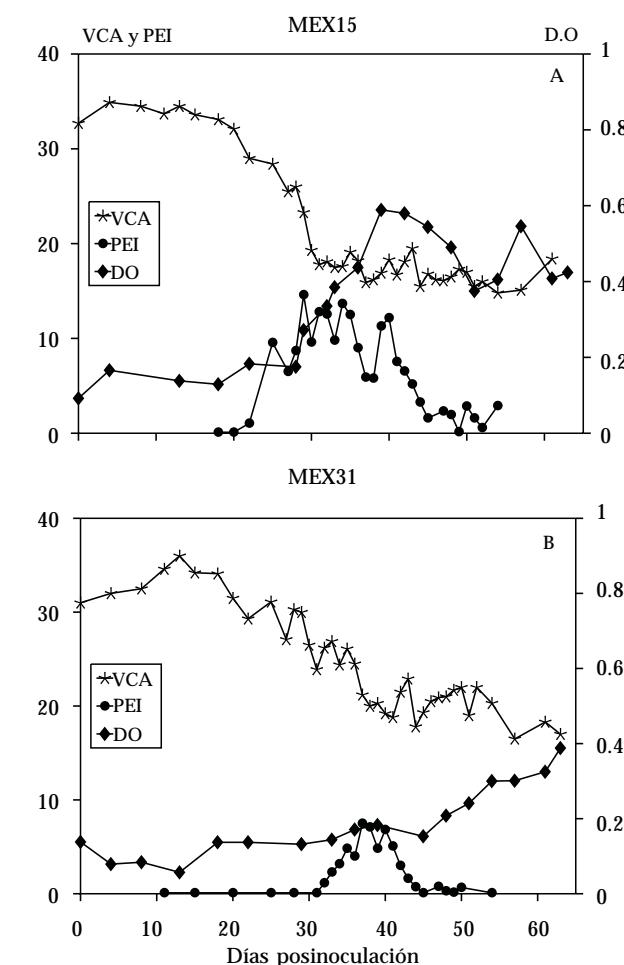


Figura 1. Infección experimental por *A. marginale*. Promedios por grupo por día del volumen celular aglomerado (VCA), porcentaje de eritrocitos infectados (PEI) y densidad óptica (DO) de los animales infectados con: A, aislado MEX-15-099 y B, aislado MEX-31-096. Los animales se infectaron con una dosis de 1×10^6 eritrocitos infectados y se permitió que la infección se resolviera sin quimioterapia.

diferentes dosis (1×10^6 , 1×10^8 o 1×10^{10} ei) es muy semejante, con una consecuente reducción en el periodo de la prepatencia,⁷ de la misma forma que el aislado MEX17, al ser usado como agente de confrontación a una dosis de 1×10^8 ei, conserva este patrón de infección³ o los aislados cubanos (1N, 2VP Y 3FR) que indujeron cuadros clínicos diferentes cada uno.⁶

Consistente con lo publicado antes¹¹ la temperatura rectal supera los 40°C durante la presentación del cuadro clínico sólo en algunos animales, por lo que el seguimiento de este parámetro no es útil para predecir la aparición del cuadro clínico en anaplasmosis como se ha sugerido.⁶ En contraparte, la reducción del VCA, como se observó en trabajos anteriores¹¹ y en el presente, se considera como el indicador más confiable para prevenir la presentación del cuadro clínico agudo (Figuras 1A y B), por lo que es altamente recomendable dar seguimiento a las variaciones del VCA en animales susceptibles introducidos a zonas endémicas.

Es difícil comparar los presentes resultados en otros sentidos con los de trabajos que se han enfocado en aspectos como la transmisibilidad por garrapatas⁹ o la caracterización mediante anticuerpos monoclonales⁸ y policlonales.^{10,14} El modelo de evaluación usado en el presente trabajo incluye un prototipo de animal susceptible y una dosis determinada, de manera que futuros trabajos de caracterización de aislados mexicanos de esta rickettsia sean comparables. La razón por la que el aislado MEX31, estimado como "patógeno" se comportó casi avirulento se desconoce, aunque su manejo en animales esplenectomizados y adultos intactos pudieron tener un efecto de atenuación, como en el caso de *Babesia bovis*,¹⁵ o los pases en ovinos usados para otras cepas de *A. marginale*;¹⁶ alternativamente, la patogenicidad puede ser una apreciación no fundamentada dada las enormes dosis inoculadas a bovinos adultos para la producción de sangre infectada. Bajo las condiciones de este estudio, las observaciones anteriores muestran una mayor virulencia para el aislado MEX15 que se puede considerar semejante a la del aislado MEX-17, previamente evaluado.¹¹

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación en México, A.C., y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Proyecto # 26128B. Se agradece al Dr. Jorge Luengo Creel la donación de Azium®, y al Laboratorio Pfizer de México, por la donación de Emicina® usada para tratar a los animales usados en la reactivación de las cepas MEX15 y MEX31. Se agradece también la asistencia de los estudiantes del CBTIS 166, en Jiutepec, Morelos, México.

Referencias

1. Ristic M. Anaplasmosis. In: Amstutz HI, editor. Bovine medicine and surgery. Vol 1. Sta. Barbara (Ca): American Veterinary Publications Inc, 1980:324-348.
2. Osorno BM, 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 Méx 1977;8:85-98.
3. Rodríguez-Camarillo SD, García-Ortiz MA, Cantó-Alarcón GJ, Hernández-Salgado G, Santos-Cerda N, Aboytes-Torres R. Ensayo de una vacuna experimental inactivada contra *Anaplasma marginale*. Téc Pecu Méx 1999;37;1-12.
4. Lotze JC. Variables and constants in bovine anaplasmosis and their relationship to chemotherapy. Am J Vet Res 1947;8:267-274.
5. Kuttler KL, Zaugg JL, Johnson LW. Serologic and clinical responses of preimmunized, vaccinated, and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. Am J Vet Res 1984;45:2223-2226.
6. Alonso M, Blandino T, Sánchez A. Caracterización de cepas de *Anaplasma marginale*. Rvta Cub Cienc Vet 1989;20:71-78.
7. Gale KR, Leatch G, DeVos AJ, Jorgensen WK. *Anaplasma marginale*: effect of challenge of cattle with varying doses of infected erythrocytes. Int J Parasitol 1996;26:1417-1420.
8. McGuire TC, Palmer GH, Goff WL, Johnson MI, Davis WC. Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. Infect Immun 1984;45:697-700.
9. Eriks IS, Stiller D, Goff WL, Panton M, Parish SM, McElwain TF, Palmer GH. Molecular and biological characterization of a newly isolated *Anaplasma marginale* strain. J Vet Diagn Invest 1994;6:435-441.
10. Goff WL, Winward LD. Detection of geographic isolates of *Anaplasma marginale* using polyclonal bovine antisera and microfluorometry. Am J Vet Res 1985;46:2399-2400.
11. García-Ortiz MA, Ángeles-Ojeda LE, Hernández-Salgado G, García-Tapia D, Aboytes-Torres R, Rodríguez-Camarillo SD. Caracterización de la virulencia de un aislado mexicano de *Anaplasma marginale*. Téc Pecu Méx 1998;36:197-202.
12. Amerault TE, Roby TO. Preparation and characterization of a soluble *Anaplasma marginale* antigen. Am J Vet Res 1967;28:1067-1072.
13. Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. Ames (Ia): The Iowa State University Press, 1980.
14. Goff WL, Winward LD. Detection of geographic isolates of *Anaplasma marginale*, using polyclonal bovine antisera and microfluorometry. Am J Vet Res 1985;46:2399-2400.
15. Callow LL, Mellors LT. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomized calves. Austr Vet J 1966;42:464-465.
16. Vizcaino O, Carson CA, Lee A, Ristic M. Efficacy of attenuated *Anaplasma marginale* vaccine under laboratory and field conditions in Colombia. Am J Vet Res 1978;39:229-233.