

Evaluación en condiciones de campo de la vacuna inactivada de *Anaplasma marginale* denominada Plazvax

Julio Vicente Figueroa Millan*
Edmundo Enrique Rojas Ramírez*
Juan Alberto Ramos Aragón*
Gabriela Granjeno Colín*
Miguel Angel García Ortiz*
Germinal Jorge Canto Alarcón*,**
Carlos Santiago Valencia***
Fernando Parrodi****

Abstract

In order to determine the effectiveness of the Plazvax vaccine against bovine anaplasmosis, 32 susceptible bovines were used. A group of 24 animals was immunized against the rickettsia by inoculating them subcutaneously with 1 ml of the vaccine in two occasions, 21 days apart. Eight bovines remained as the control group and were not vaccinated. One month after the second immunization, all animals were taken to an endemic area of anaplasmosis to be challenged under field conditions. From day eight after introduction in the field (AIF) and until day 105, the bovines were monitored by recording rectal temperature (RT), packed cell volume (PCV) and percentage of parasitemia (PP). Three animals died of babesiosis, and the rest were monitored twice a week starting on day 42. After 52 days, the first *A. marginale* infected animals were detected. All of these animals belonged to the vaccinated group, and four of them were treated with oxitetracyclins. From day 84 AIF, the control group animals suffered from severe anaplasmosis with RT mean of 40.5⁰C, a PCV mean of 13.2% and PP mean of 9.4% the day of treatment (days 87-95). Vaccinated animals presented means of 40.2⁰C, 16.3% and 3.3% for RT, PCV and PP, respectively, which was evident on the day of treatment (days 95-105). Although there was a difference in PP between the control and vaccinated groups, all animals became infected and required treatment. In conclusion, the current presentation of Plazvax vaccine cannot be recommended to be used in Mexico. The addition of antigenic materials from one or more isolates of *A. Marginale* is therefore, suggested.

KEY WORDS: bovine anaplasmosis, *anaplasma marginale*, vaccination, plazvax.

Resumen

Para determinar la efectividad de la vacuna Plazvax[®] contra la anaplasmosis bovina, se utilizaron 32 novillos susceptibles a la enfermedad. Un grupo de 24 novillos fue inmunizado contra *Anaplasma marginale*, inoculando subcutáneamente 1 ml (dos veces, 21 días aparte) de la vacuna. Ocho animales fungieron como testigos sin vacunar. Un mes después de la segunda inmunización, los animales fueron trasladados a una zona endémica de anaplasmosis para ser desafiados naturalmente. A partir del día ocho posintroducción al potrero (PIP) y hasta el día 105 se realizó un seguimiento que incluyó observación de manifestaciones clínicas, temperatura rectal (TR), hematocrito (HT) y parasitemia (PP). Tres bovinos murieron de babesiosis y los 29 animales restantes tuvieron seguimiento dos veces por semana a partir del día 42 PIP. El día 52 PIP se detectaron los primeros animales infectados con *Anaplasma marginale* (6, todos del grupo vacunado), y cuatro fueron tratados con oxitetraciclinas (días 52-64 PIP). A partir del día 84 PIP los animales testigo presentaron anaplasmosis severa con TR promedio de 40.5⁰C, HT promedio de 13.2% y PP promedio de 9.4% hacia el día de tratamiento (días 87-95 PIP). Los animales vacunados presentaron los siguientes valores promedios de TR, 40.2⁰C; HT, 16.3%; y PP 3.3% en el día de tratamiento (días 93-105 PIP). A pesar de existir diferencia en PP entre los animales vacunados y testigos, todos padecieron anaplasmosis clínica, requiriendo tratamiento. En conclusión, en su forma

Recibido el 23 de noviembre de 1998 y aceptado el 4 de marzo de 1999.

*Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Apartado Postal 206, CIVAC, 62500, Jiutepec, Morelos, México.

**Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Querétaro, 16 de Septiembre Núm. 63 Ote., 76000, Querétaro, Querétaro, México.

***Campo Experimental "La Posta", Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Apartado Postal 898, Sucursal A, 91700, Veracruz, Veracruz, México.

****Mallinckrodt Veterinary, Periférico Pte. 4001, Cd. Granja, 04510, Zapopan, Jalisco, México.

actual la vacuna no es recomendable para usarse en México; se sugiere el empleo o introducción en la vacuna Plazvax, de material antigénico de uno o más aislados de *A. marginale* provenientes de distintas regiones geográficas de México y realizar estudios sobre su capacidad inmunoprotectora en bovinos.

PALABRAS CLAVE: anaplasmosis bovina, anaplasma marginale, vacunación, plazvax.

Introducción

La anaplasmosis bovina, causada por la rickettsia *Anaplasma marginale* y transmitida por garrapatas y moscas hematófagas, se considera como una de las enfermedades infecciosas económicamente más importantes del ganado bovino ^{1,2}. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad aguda incluyen fiebre y una anemia progresiva (usualmente sin hemoglobinuria) asociada con la presencia de cuerpos de inclusión intraeritrocíticos ^{1,2}. Aunque la enfermedad tiene una distribución mundial, su mayor impacto se observa en las regiones tropicales y subtropicales, particularmente cuando bovinos adultos genéticamente mejorados pero altamente susceptibles a la infección, son introducidos a una región endémica para la anaplasmosis bovina. Las pérdidas económicas que la enfermedad produce a la ganadería bovina se estiman en aproximadamente 100 millones de dólares por año, tanto en los Estados Unidos de América ³ como en México ⁴, principalmente debidas a muerte del ganado, pérdida de peso, abortos, costo de tratamiento, costo de medidas preventivas y costo del control de vectores. Actualmente no existe una vacuna disponible en el mercado mexicano que prevenga la presentación de la anaplasmosis bovina. El presente estudio fue diseñado para evaluar una vacuna inactivada comercialmente disponible en los Estados Unidos de América, la cual está basada en cuerpos iniciales libres de *Anaplasma marginale* obtenidos a partir de un aislado estadounidense*, en bovinos vacunados en el altiplano en el rancho "GB", perteneciente al Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria del estado de Querétaro y trasladados a una zona endémica para la anaplasmosis bovina en Paso del Toro, Veracruz, México.

Material y Métodos

Animales experimentales

Veinticuatro bovinos tipo Europeo, intactos, de uno y medio años de edad, provenientes de un área libre de garrapata, en Chihuahua, México, y transportados al rancho "GB", fueron vacunados 2 veces por vía subcutánea, con 21 días de diferencia, con 1 ml de la presentación comercial de la vacuna de cuerpos iniciales de *A. marginale*. Ocho bovinos más, no inoculados y de la

misma procedencia fueron incluidos en el experimento y sirvieron como testigos no vacunados. Un mes después de la segunda vacunación, los animales fueron trasladados al Campo Experimental "La Posta", en Paso del Toro, Veracruz. Los bovinos fueron inmediatamente introducidos a los potreros para exponerse naturalmente a un desafío de campo vía infestación con la garrapata *Boophilus microplus* y otros insectos hematófagos. Para determinar la seroconversión de los animales a *A. marginale* debido a vacunación, se obtuvieron muestras de suero, quincenal o mensualmente, estas últimas fueron analizadas mediante la prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA)⁵.

Seguimiento clínico de animales experimentales

Libres en los potreros, los animales tuvieron seguimiento diariamente para observar semiótica de enfermedad clínica. Se registraron individualmente los valores de temperatura rectal y el volumen celular aglomerado (HT). Con este propósito se colectaron muestras de sangre a partir de la vena caudal de los bovinos usando tubos con vacío y con EDTA como anticoagulante. Las muestras de sangre se procesaron para realizar extensiones delgadas teñidas con colorante de giemsa y observación al microscopio óptico, el valor de HT se determinó esencialmente como se describió con anterioridad (6). Las muestras de suero se congelaron a -20°C hasta su análisis.

Resultados

Los animales tuvieron seguimiento clínicamente para detectar la presentación de babesiosis y anaplasmosis bovina desde el día 6 al 105 PIP, mediante la determinación de los valores de temperatura rectal (TR), volumen celular aglomerado o hematocrito (HT), y porcentaje de parasitemia (PP). Tres animales vacunados contra *A. marginale* murieron como consecuencia de babesiosis bovina entre los días 18-20 PIP, el resto de los animales (21 vacunados, 8 testigos) tuvieron seguimiento dos veces por semana desde el día 42 PIP en adelante.

Hacia el día 52 PIP, seis animales del grupo vacunado mostraron semiótica de anaplasmosis clínica (debilidad, depresión, anorexia, deshidratación, palidez de mucosas y postración), con TR promedio de 40°C , HT promedio de 16%, y parasitemia promedio de 1.2%. Los animales se trataron con oxitetraciclinas (30 mg/kg peso) para evitar la

*Plazvax, Mallinckrodt Veterinary

muerte, entre los días 52-64 PIP. Los animales testigo se enfermaron clínicamente de anaplasmosis bovina a partir del día 80 PIP. Los valores de temperatura rectal comenzaron a elevarse a partir del día 80 PIP, observándose picos promedio de 39.7 °C durante los días 86-87, 91, y 95 PIP (Figura 1). Una reducción notable en el valor de HT fue observada en los animales testigo hacia el día 88 PIP, determinándose la reducción más drástica (valor de HT promedio de 13%) en el día 93 PIP (Figura 2). Con respecto al PEP, el valor promedio más elevado y determinado para los animales testigo en un solo

día fue de 3.37% (Figura 3). Sin embargo, cuando ajustado al día de tratamiento de los animales, se determinó un PP promedio de 9.3% (Cuadro 1). De manera similar los animales testigo tuvieron un promedio de 40.5 °C, y 13.2% en los valores de TR y HT, respectivamente, cuando se instauró el tratamiento contra la infección por *A. marginale* durante los días 87-95 PIP (Cuadro 1). Con respecto al grupo de animales vacunados, éstos mostraron el máximo incremento en TR (valor promedio de 39.6-39.7 °C) durante los días 86, 91, 93, y 95 PIP (Figura 1); la máxima reducción en el valor de HT

Cuadro 1							
DATOS CLÍNICOS DE ANIMALES EXPERIMENTALES AJUSTADOS AL DÍA DE TRATAMIENTO							
VALORES BASEALES			VALORES POSINTRODUCCIÓN A POTRERO				
No. ID	TEMP. (°C)	HT (%)	TEMP. (°C)	HT (%)	PEP	TRATAMIENTO	
GRUPO A			DÍAS PIP				
2	39.6	31	40.1	14	3.7		95
4	39.2	28	40.7	10	3.0		93
32	39.2	35	40.1	13	4.3		93
7	38.5	30	40.4	20	1.5		101
10	39.0	32	40.5	14	1.2		95
13	39.0	29	40.6	16	5.1		93
9	39.2	36	MUERTO	Babesiosis			18
33	39.6	32	39.5	16	0.6		64
39	39.0	38	40.5	14	7.5		93
22	38.5	44	40.0	12	3.9		95
40	39.5	36	MUERTO	Babesiosis			20
42	38.9	28	39.5	15	1.0		52
23	39.1	30	39.4	14	1.7		58
24	39.4	37	39.7	12	3.6		91
45	39.3	39	41.5	19	1.4		56
1	38.7	33	39.9	16	7.8		93
27	39.0	38	39.5	24	0.2		94
30	39.1	34	40.6	20	1.4		97
16	39.0	36	40.2	18	1.7		95
19	39.2	34	39.6	12	1.9		95
34	39.2	38	40.6	18	1.3		96
12	38.6	34	MUERTO	Babesiosis			19
17	39.0	38	41.5	14	6.5		93
28	39.4	33	39.4	15	1.0		105
PROMEDIO			40.2	16.3	3.3		
GRUPO B							
14	39.7	29	41.6	14	2.6		87
31	38.7	37	39.5	12	4.1		92
11	39.7	35	41.3	12	37.4		92
21	39.1	35	40.3	12	11.5		91
26	38.9	37	41.2	12	12.3		95
44	38.8	30	40.7	12	3.1		87
29	39.0	35	40.3	16	5.8		93
37	36.8	35	39.7	16	8.0		95
PROMEDIO			40.5	13.2	9.4		
PEP= PORCENTAJE DE ERITROCITOS PARASITADOS							

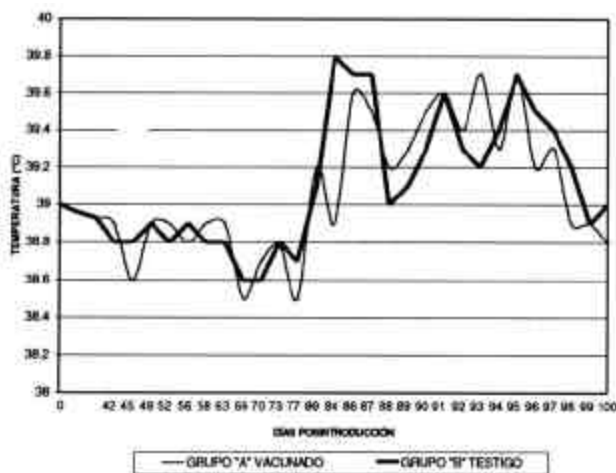


Figura 1. Valores de temperatura rectal promedio graficados en función de días posintroducción al potrero para 24 bovinos vacunados contra *Anaplasma marginale* (grupo A) y 8 bovinos testigo (grupo B).

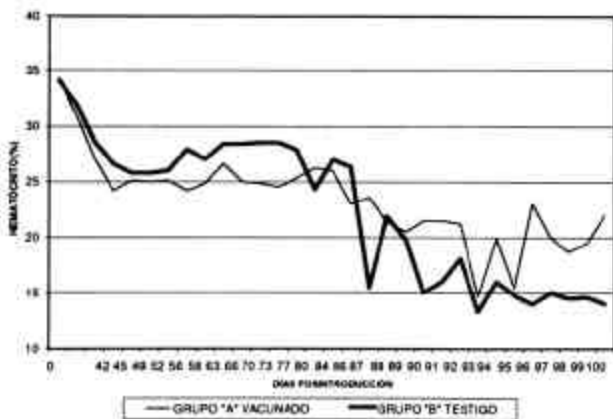


Figura 2. Valores de hematocrito promedio graficados en función de días posintroducción al potrero para 24 bovinos vacunados contra *Anaplasma marginale* (grupo A) y 8 bovinos testigo (grupo B).

(valor promedio de 15%) en los días 93-95 PIP; y el máximo valor en PP (1.95%) el día 98 PIP. Debido a la manifestación de anaplasmosis clínica severa (Figura 4), los animales vacunados también tuvieron que ser tratados contra la infección por *Anaplasma marginale* para evitar su muerte. Ajustados al día de tratamiento, los valores promedio de TR, HT y PP (40.2 °C, 16.3%, y 3.3%, respectivamente), fueron determinados durante los días 93-105 PIP (Cuadro 1).

Respecto de los resultados de serología, algunos animales vacunados mostraron seroconversión al antígeno de *A. marginale* a los 7 días posvacunación inicial. Sin embargo, no es hasta los 30 días posvacunación inicial (7 días después de la segunda inmunización) cuando se observa un incremento en los niveles de anticuerpos anti-*A. marginale*. Los niveles de anticuerpos sufren un marcado incremento a partir del día 21 PIP, probablemente cuando los animales entran en contacto con el aislado de campo de *A. marginale*, y continúan

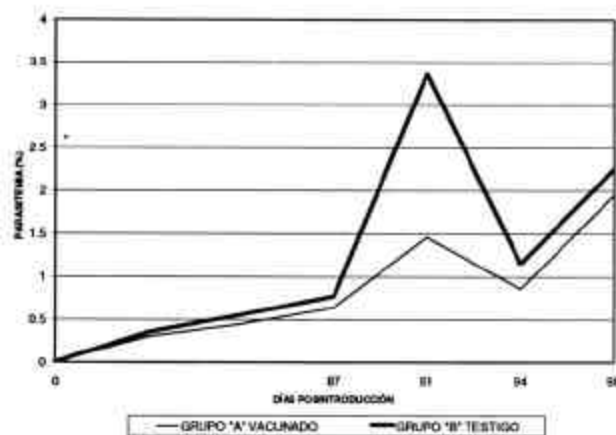


Figura 3. Valores de parasitemia promedio graficados en función de días posintroducción al potrero para 24 bovinos vacunados contra *Anaplasma marginale* (grupo A) y 8 bovinos testigo (grupo B).

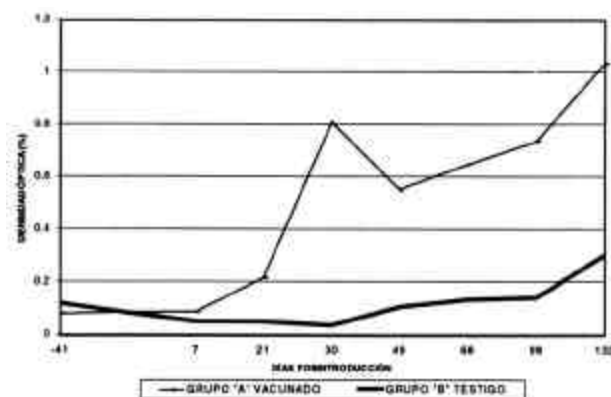


Figura 4. Valores en ELISA graficados en función de días posvacunación para 24 bovinos vacunados contra *Anaplasma marginale* (grupo A) y 8 bovinos testigo (grupo B).

incrementándose hasta la finalización del experimento. (Figura 4).

Discusión

Como se indicó anteriormente, la infección con *A. marginale* fue lo suficientemente severa, pues todos los animales afectados tuvieron que ser tratados con oxitetraciclinas. En la mayoría de los casos se hizo necesario realizar un segundo tratamiento con oxitetraciclinas debido al mal estado general de los animales y cuando la parasitemia aún era detectable. Sin embargo, lo que no queda claro de los resultados presentados en este estudio, es la importancia de la garrapata *Boophilus microplus* en la transmisión de la infección por *A. marginale* a los animales experimentales, particularmente cuando se considera el prolongado periodo transcurrido entre la introducción de los bovinos al potrero (e inmediata exposición a la garrapata) y el comienzo de la presentación clínica de la enfermedad, observado en la mayoría de los animales. Periodos prepatentes de 41 días en promedio, han sido descritos

en la literatura para la enfermedad causada por *A. marginale* (2). No obstante, la presentación de la enfermedad hasta los 80 días posteriores a la introducción de los bovinos en un potrero infestado con la garrapata *Boophilus*, no necesariamente elimina la posible transmisión de *A. marginale* por este artrópodo. Las moscas hematófagas han sido también incriminadas como vectores mecánicos en la transmisión de *A. marginale* al ganado (1,3). Sin embargo, en este estudio no se llevó a cabo un seguimiento detallado de los potenciales vectores de *A. marginale*. Será necesario conducir más estudios para demostrar la capacidad vectorial de la garrapata *B. microplus* en la transmisión de *A. marginale* al ganado, por lo menos bajo las condiciones de campo en México.

Los resultados de serología indican que existió un buen reconocimiento a algunos de los antígenos presentes en el aislado de campo, ya que se observó una buena respuesta secundaria a partir del día 21 PI. El reconocimiento parcial de la estructura antigénica de la rickettsia, probablemente causó la presencia de una menor parasitemia en los animales vacunados. Sin embargo, los antígenos reconocidos, no parecen ser relevantes en la inducción de protección ya que todos los animales necesitaron tratamiento específico. Aunado a lo anterior, la falta de protección que se presentó con la vacuna comercial en el presente estudio, también pudo ser debido a la presencia de antígenos diferentes entre el aislado de confrontación y los antígenos presentes en la vacuna. En este sentido, la literatura informa de la existencia de variaciones antigénicas entre aislados de *Anaplasma marginale* de diferentes regiones geográficas (6,7).

En conclusión, aun cuando se ha demostrado la efectividad de la vacuna Plazvax® en bovinos confrontados con aislados de *A. marginale* de otro origen geográfico (8), la vacuna en su presentación actual no puede ser recomendada para su uso en México. Sin embargo, se considera que si se introdujera material antigénico proveniente de uno o más aislados de *A. marginale* de México a la vacuna Plazvax®, un producto comercial con tales características podría proporcionar

mejor protección a los bovinos vacunados y desafiados mediante exposición a los aislados virulentos de México.

Referencias

1. Callow LL. Protozoan and rickettsial diseases. In: Australian Bureau of Animal Health, editor. Canberra, Australia: Australian Government Publishing Services, 1984;5:121-216.
2. Ristic M. Anaplasmosis. In: Weinman D. & Ristic M, editors. Blood diseases of man and animals. New York: Academic Press, 1968;2:474-537.
3. Delegación Mexicana. Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. Bull Off Intern Epizoot 1981;93:903-905.
4. Barajas-Rojas JA, Riemann HP, Franti CE. Application of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for epidemiological studies of diseases of livestock in the tropics of Mexico. Rev Sci Tech Off Intern Epizoot 1993;12:717-732.
5. Schalm OW, Jain NC, Carrol EJ. Materials and methods for the study of the blood, including brief comments on factors to be considered in interpretation. In: Schalm OW, editor. Veterinary hematology. 4th ed. Philadelphia, Lea & Febiger 1986;15-81.
6. Kuttler KL, Winward LD. Serologic comparison of *Anaplasma* isolates as measured by the complement fixation test. Vet Microbiol 1984;9:181-186.
7. Vizcaino O, Corrier DE, Terry MK, Carson CA, Lee AJ, Kuttler KL, et al. Comparison of three methods of immunization against bovine anaplasmosis: evaluation of protection afforded against field challenge exposure. Am J Vet Res 1980;41:1066-1068.
8. Parrodi F. Experiencias sobre el uso de vacunas contra *Anaplasma marginale*. Memorias de la Cuarta Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo de Sanidad Animal; 1995 noviembre 14-17; México (DF). México (DF): Consejo Consultivo de Sanidad Animal 1995:452-467.