

ANAPLASMA MARGINALE: EVALUACION DE DOSIS MINIMA INFECTIVA*

Otoniel Vizcaino Gerdtz
Antonio Betancourt E.**

1. RESUMEN

El aislamiento de una cepa de *Anaplasma marginale* en el Centro Regional de Investigación "La Libertad" en Villavicencio, con características de atenuación natural, motivó una serie de ensayos orientados a obtener información sobre su patogenicidad, la protección que confiere y el estudio de la dosis mínima infectiva que fue el objetivo de este trabajo.

Utilizando dieciseis terneros holstein de ocho a trece meses de edad se conformaron cuatro grupos experimentales (I, II, III y IV) de cuatro animales cada uno, los cuales fueron inoculados por vía endovenosa respectivamente con 10^1 , 10^3 , 10^5 y 10^7 anaplasmas de la cepa aislada en Villavicencio en 1973. Con estos inóculos no hubo infección de anaplasmas en el grupo I; en el grupo II se infectaron tres de cuatro animales inoculados y en los grupos III y IV, todos los animales se infectaron. La parasitemia se detectó a partir del día 16 post-inoculación, un día después de haberse detectado incremento de la temperatura rectal en el 68,75% de los animales. El hematocrito y la hemoglobina tuvieron un moderado descenso desde el día 18 en los animales de los grupos III y IV sin llegar a valores subnormales aún en los días 22 a 25, período en el cual se observaron clínicamente mas afectados. La infección de anaplasmas se observó durante cinco semanas; no fue necesario tratar ningún animal y los valores del hematocrito y de la hemoglobina volvieron a los valores normales iniciales, 24 días después de comenzar la infección.

En este ensayo, la dosis mínima infectiva se consideró en 10^5 anaplasmas por cuanto a partir de esta dosis todos los animales inoculados se infectaron.

2. INTRODUCCION

La amplia distribución de la anaplasmosis bovina en Colombia, con las consecuentes pérdidas económicas que ocasiona, ha motivado la necesidad de realizar estudios básicos del *Anaplasma marginale*, orientados a conocer factores que sirvan para definir un método práctico para su control. Uno de los sistemas utilizados para el control de la anaplasmosis bovina ha sido el uso sistemático de productos químicos, para disminuir la población de vectores que transmiten el agente infeccioso que produce la anaplasmosis. Otro sistema menos práctico por su limitada cobertura, es la terapia con productos químicos específicos de casos ocasionales de anaplasmosis aguda. Pero quizás, un sistema mas razonable, es el de la inmuno-profilaxis por ser mas confiable y realizable.

Con el aislamiento de una cepa de *A. marginale* con características de atenuación natural en el Centro Regional de Investigaciones La Libertad de Villavicencio (13), se inicio una serie de ensayos orientados a obtener información sobre su patogenicidad (19), la protección que confiere (17) y el estudio de la dosis mínima infectiva (DMI) que son los resultados que se informan en este artículo.

3. REVISION DE LITERATURA

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa ocasionada por la rickettsia *A. marginale* (6). Su amplia distribución en los climas cálidos y medios de Colombia, ocasiona considerables pérdidas a la ganadería del país, localizada en áreas endémicas de anaplasmas (2, 3, 5, 15). En infecciones experimentales

* Contribución del Programa Nacional de Parasitología y Entomología Veterinaria, División Ciencias Veterinarias. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA.

** Respectivamente: Médico Veterinario, M.S., Programa de Parasitología y Entomología Veterinarias, Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias, LIMV. Apartado Aéreo 29743, Bogotá; Médico Veterinario, Ph.D., Laboratorio de Investigaciones Veterinarias de Enfermedades Tropicales LIVET-ICA, Apartado Aéreo 206 Montería, Colombia.

con anaplasmas y/o babesias, se ha probado que usando una DMI, los síntomas clínicos son más benignos y se obtiene buena protección (1, 4, 5, 14, 19) contra desafío.

En estudios realizados en el Valle del Cauca, Colombia, González *et al.* encontraron que la DMI de una cepa de *A. marginale* aislada en Montería, fue de 2×10^6 organismos inoculados por vía intravenosa (5).

En este trabajo se observó que el porcentaje de la parasitemia es proporcional al número de organismos inoculados y que el período prepatente se reduce inoculando dosis altas de organismos. Teniendo en cuenta la anterior consideración, el uso de vacunas (8, 9, 16, 17) o la aplicación de inóculos estandarizados en el número de anaplasmas y en los cuales se ha preservado su viabilidad durante largos períodos (estabilizados) (7, 11, 12), resultan en una alternativa más práctica que la premunición tradicional en la lucha contra la anaplasmosis bovina.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. ANIMALES EXPERIMENTALES

Dieciséis terneros holstein de ocho meses de edad, obtenidos en la estación experimental de Tibaitatá (2.555 m.s.n.m.; 13°C), conformaron cuatro grupos experimentales (I, II, III y IV) de cuatro animales cada uno, los cuales fueron inoculados por vía endovenosa, respectivamente con 10^1 , 10^3 , 10^5 y 10^7 anaplasmas de la cepa aislada en Villavicencio.

4.2. ORGANISMO EXPERIMENTAL

Para inocular los grupos experimentales (I, II, III y IV) con la cepa de *A. marginale* Villavicencio 73, se preservó este organismo en nitrógeno líquido durante tres meses antes de la inoculación congelando la sangre infectada con anaplasmas según la técnica descrita en el Manual de Técnicas del Programa de Parasitología y Entomología Veterinarias (10). Para inocular las dosis de 10^1 , 10^3 , 10^5 y 10^7 anaplasmas, se descongeló la sangre y se hicieron diluciones con solución salina buferada de fosfato (PBS).

4.3. PARAMETROS DE ESTUDIO

Se determinaron dos veces por semana durante el período prepatente y tres veces durante el período patente los parámetros siguientes: Temperatura rectal en °C; el % de parasitemia; el % del hematocrito y los valores de la hemoglobina en g/dl de sangre. Antes de la inoculación de las dosis de anaplasmas se hicieron tres determinaciones de cada uno de los parámetros.

4.4. ANALISIS ESTADISTICOS

Se hizo análisis de varianza observando la diferen-

cia mínima significativa (DMS), para comparar la patogenicidad de la infección de las distintas dosis inoculadas, tomando de los parámetros, los valores mínimos del hematocrito y de la hemoglobina y los valores máximos de la parasitemia y de la temperatura.

5. RESULTADOS

Las fluctuaciones de los valores concernientes a los parámetros en estudio y efectos clínicos en los grupos experimentales inoculados (I, II, III y IV) se resumen en la tabla 1. Los valores promedios y estadísticamente significativos de los mismos parámetros se consignan en la tabla 2; 3; 4; y 5, desde la iniciación del período patente hasta los días más críticos de la infección. Sólo se observó infección en los grupos II, III y IV (Tablas 1 y 5). En un animal del grupo II no se observó anaplasma, mientras que en los grupos III y IV todos los animales se infectaron (Tabla 1).

La parasitemia se detectó a partir del día 16 post-inoculación, un día después de haberse detectado incremento de la temperatura rectal en el 68,75% de los animales (Tablas 1, 2).

El hematocrito tuvo un moderado descenso el día 18 post-inoculación, sin llegar a valores sub-normales aún en los días 22 a 25 período en el cual por incremento de la parasitemia y disminución del hematocrito, los animales se observaron clínicamente más afectados.

La infección de los grupos II y III se presentó moderada y la reacción clínica fue inaparente. En el grupo IV la parasitemia tuvo mayor incremento (Tablas 1 y 5) y los animales se observaron ligeramente afectados durante cuatro días, pero no fue necesario tratar ningún animal. La infección por anaplasma se observó durante cinco semanas en los grupos infectados (II, III y IV) y los parámetros volvieron a los valores normales iniciales 24 días después de comenzar la infección.

6. DISCUSION

La condición de una franca infección, producida por el *Anaplasma marginale*, se basa en el criterio de la presentación de un estado febril acompañado de la multiplicación del microorganismo en la sangre y de cambios inmunohematológicos sensibles o moderados, dependiendo de la patogenicidad del anaplasma, del número de microorganismos inoculados y/o de la susceptibilidad del animal. No obstante, inóculos muy bajos en número de anaplasmas o cepas atenuadas pueden producir infecciones benignas y difícilmente apreciables (4; 16; 19). Estas reacciones benignas o inaparentes pueden algunas veces no producir una fuerte inmunidad. Pero cuando la infección por anaplasmas se detecta observando el organismo en niveles

TABLA 1. Efectos Clínicos y Hematológicos en los grupos experimentales post-inoculación 10^1 ; 10^3 ; 10^5 y 10^7 anaplasmas.

OBSERVACIONES	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
	10^1 Anaplasmas	10^3 Anaplasmas	10^5 Anaplasmas	10^7 Anaplasmas
Período prepatente (días)	*	16	16	16
Animales infectados/inoculados	0/4	3/4	4/4	4/4
\bar{X} Temperatura máxima ($^{\circ}\text{C}$) Días más críticos (día 22 a 25)	38,5 \pm 0,1	39,8 \pm 0,1	40,6 \pm 0,3	40,7 \pm 0,5
\bar{X} Parasitemia % de anaplasma	*	0,1 \pm 0,2 (0,01 - 1,0)**	0,5 \pm 0,7 (0,01 - 2,3)**	0,8 \pm 1,2 (0,01 - 5,0)**
\bar{X} Hematocrito/hemoglobina el día de la inoculación (día 0)	$\frac{32,5 \pm 3,0}{9,8 \pm 0,6}$	$\frac{34,0 \pm 1,6}{10,3 \pm 0,7}$	$\frac{33,3 \pm 2,9}{9,8 \pm 1,0}$	$\frac{33,3 \pm 1,6}{9,9 \pm 0,4}$
\bar{X} Mínimos hematocrito/ hemoglobina días más críticos (día 22 a 25)	$\frac{32,3}{9,7 \pm 0,1}$ - 30,0)**	$\frac{29,8}{9,1 \pm 0,5}$ (31,2 - 28,3)**	$\frac{24,3}{7,8 \pm 0,1}$ (24,8 - 23,8)**	$\frac{22,1}{7,5 \pm 0,5}$ (24,0 - 20,1)**
% Reducción del hematocrito	2,1	4,7	10,9	13,6
% X Hematocrito final día 55 post-inoculación	32,5 \pm 1,0	30,8 \pm 1,0	30,8 \pm 1,0	30,3 \pm 1,7

* No se observó anaplasma

** Fluctuación

TABLA 2. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$): valores absolutos promedios y significancia estadística en los días 16 a 27 post-inoculación de *Anaplasma marginale* Villavicencio/73.

Día post-inoculación de <i>A. marginale</i>	GRUPOS EXPERIMENTALES				Significancia
	I	II	III	IV	
16	38,2	38,5	38,4	39,3	0,2100 NS
18	38,2	38,7	39,3	39,4	0,0208*
20	38,2	39,0	39,7	40,3	0,0001**
22	38,5	39,9	40,9	41,0	0,0004**
25	38,6	39,8	40,4	40,3	0,0006**
27	38,3	39,4	40,0	40,1	0,0005**

* $0,01 < PR \leq F \leq 0,05$

** $PR \leq F \leq 0,01$

NS $0,05 < PR \leq F$

TABLA 3. Hematocrito (%): valores absolutos promedios y significancia estadística en los días 16 a 27 post-inoculación de *Anaplasma marginale* Villavicencio/73

Día post-inoculación de <i>A. marginale</i>	GRUPOS EXPERIMENTALES				Significancia
	I	II	III	IV	
16	33,3	34,0	33,3	33,8	0,9607 NS
18	33,0	32,8	30,5	30,6	0,3406 NS
20	32,8	31,3	27,8	27,8	0,0193*
22	32,3	31,3	24,8	24,0	0,0011**
25	32,3	28,3	23,8	20,3	0,0001**
27	32,5	31,5	25,0	25,0	0,0003**

* $0,01 < PR > F \leq 0,05$

** $PR > F \leq 0,01$

NS $0,05 < PR > F$

TABLA 4. Hemoglobina (g/dl): valores absolutos promedios y significancia estadística en los días 16 a 27 post-inoculación de *Anaplasma marginale* Villavicencio/73

Día post-inoculación de <i>A. marginale</i>	GRUPOS EXPERIMENTALES				Significancia
	I	II	III	IV	
16	10,2	10,4	10,3	10,1	0,9652 NS
18	10,1	9,9	9,01	9,0	0,1417 NS
20	10,0	9,5	8,6	8,5	0,0063**
22	9,6	9,4	7,8	7,8	0,0023**
25	9,8	8,7	7,7	7,1	0,0002**
27	9,9	9,7	7,7	8,0	0,0002**

* $0,01 < PR > F \leq 0,05$

** $PR > F \leq 0,01$

NS $0,05 < PR > F$

TABLA 5. Parasitemia (%): valores absolutos promedios y significancia estadística en los días 16 a 27 post-inoculación de *Anaplasma marginale* Villavicencio/73

Día post-inoculación de <i>A. marginale</i>	GRUPOS EXPERIMENTALES				Significancia
	I	II	III	IV	
16	0,0	0,003	0,003	0,005	0,5174 NS
18	0,0	0,03	0,03	0,05	0,1608 NS
20	0,0	0,05	0,6	2,1	0,0216*
22	0,0	0,2	1,1	2,4	0,0197**
25	0,0	0,4	1,6	1,9	0,046 **
27	0,0	0,1	0,9	1,2	0,0137*

* $0,01 < PR > F \leq 0,05$

** $PR > F < 0,01$

NS $0,05 < PR > F$

apreciables o indirectamente por serología existe mayor seguridad de que en el animal infectado se forma un estado protectorio a reinfecciones posteriores (5; 16; 17; 18).

En este experimento de DMI, se consideró en 10^5 anaplasmas por cuanto sólo a partir de esta dosis todos los animales se infectaron. Como con esta dosis de 10^5 anaplasmas hubo incremento de la temperatura y cambios hematológicos moderados (Tabla 1), se asume también que en algún grado los animales se estimularon inmunológicamente. Si además consideramos que la dosis mas alta utilizada de 10^7 anaplasmas produjo una infección ligeramente mas marcada que la dosis de 10^5 anaplasmas, indica esta condición que los síntomas y cambios hematológicos se incrementan a medida que el número de organismos inoculados se aumenta. Pero el hecho de que con la dosis mas alta inoculada en este trabajo no fue necesario tratar ningún animal, da lugar a pensar que la DMI se encuentra dentro de un adecuado margen de seguridad. Como estudio complementario al presente trabajo es indispensable determinar la dosis mínima protectoria (DMP), la cual tendrá gran aplicación en la preparación de "estabilizados" (Dosis estandarizadas de organismos preservados por congelación en medios crioprotectores).

En esta forma se obtiene infección en la totalidad de los animales, se logra generalmente sincronizar el período (1; 4; 14; 17), las reacciones clínicas y hematológicas son mas benignas (14; 19) y el conocimiento previo de los días críticos, si se presentan, permitirá tratar oportunamente los animales.

Se considera que la atenuación natural de la cepa de *A. marginale* Villavicencio 73, puede deberse a factores de dilución o reducción de la viabilidad debido a la congelación ya que los parámetros estudiados se incrementaron o disminuyeron en relación directa al número de organismos inoculados (Tabla 1).

7. CONCLUSIONES

1. La cepa de *A. marginale* 73, utilizada por vía endovenosa desde la dosis de 10^5 anaplasmas y preservadas previamente por congelación en nitrógeno líquido, es una dosis segura para producir infección.

2. Con una dosis de 10^7 anaplasmas que fue la dosis mas alta utilizada, los síntomas fueron ligeramente moderados y no fue necesario tratar ningún animal para contrarrestar la infección.

3. Incluyendo la dosis mínima infectiva (DMI), se recomienda estudiar desde que número de anaplasmas esta cepa confiere protección.

8. SUMMARY

Anaplasma marginale: Evaluation of minimum infective dose.

The isolation made at "La Libertad" experiment Station in Villavicencio of an *Anaplasma marginale* strain with some characteristics of natural attenuation, stimulated trials aimed to gather information on its pathogenicity, the protection conferred and its minimum infective dose, the latter being the objective of this paper.

A total of sixteen, eight to thirteen months old Holstein calves formed four experimental groups (I, II, III and IV) of four calves each, which were inoculated intravenously with 10^1 , 10^3 , 10^5 and 10^7 *Anaplasma* organisms (Villavicencio isolate) respectively. *Anaplasma* organisms were observed after inoculation in none of the calves in group I; in three of the calves in group II and in all calves in groups III and IV. Parasitemia was first detected on day sixteen post-inoculation, one day following a rectal temperature raise in 68.75% of the cattle.

Packed Cell Volume (PCV) and Hemoglobine (HB) decreased lightly from day 18 onwards in groups III and IV. However, from days 22 to 25 when the calves in these groups seemed slightly more affected, neither the PCV nor the HB reached sub-normal values. *Anaplasma* infection was observed for five weeks; treatment was not required for any of the calves and the PCV and HB reached their initial values twenty four days after the onset of the infection. A number of 10^5 organisms was therefore considered as minimum infective dose in this trial since that was the minimum dose apparently ensuring infection in all the calves.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BISHOP, J.P. Immune response of cattle inoculated with irradiated *Babesia bigemina* Ph. D. Thesis. Texas A. & M University, Texas, 136 p. 1971
2. CORRIER, D.E. La epidemiología de Anaplasmosis y Babesiosis bovina en las tierras bajas tropicales de Colombia. Seminario Internacional sobre Hematozoarios. CIAT, Cali, Colombia. 1975

3. -----; GONZALEZ, E.F. y BETANCOURT, A. Current information on the epidemiology of bovine Anaplasmosis and Babesiosis in Colombia. Proceedings. Conference on tick bovine diseases and their vectors. Sep. 26-30, University of Edinburgh, Scotland. 1976.
4. FRANKLIN, T. and HUFF, J.W. A proposed method of Premunizing cattle with Minimum Inocula of *Anaplasma marginale*. Res. Vet. Sci., 8: 415-418. 1967.
5. GONZALEZ, E.F.; CORRIER, D.E.; TODOROVIC, R.A.; LOPEZ, V.G. Epidemiología de la Anaplasmosis y Babesiosis Bovina en el Valle geográfico del Río Cauca. Rev. ICA. 12 (2): 349-356. 1978 .
6. KREIR, J.P. AND RISTIC, M. Organism of the family Anaplasmataceae in the forth coming 8th Edition of Bergey's Manual. Proceedings sixth National Anaplasmosis Conference, Las Vegas, Nev. 1973 .
7. LOVE, J.N.; VALENTINE, B.L. and SCALES, J.W. Effect of temperature and time on the infectivity of *Anaplasma marginale* after treatment with protective additives. Amer. J. Vet. Res. 28: 51-54. 1967 .
8. OSORNO, B.M.; SOLANA, M.P. and RISTIC, M. Study of an attenuated *A. marginale* Vaccine in Mexico. I. Challenge of Immunity by a Virulent Endemic Anaplasma Strain. Proceedings sixth National Anaplasmosis Conference, Las Vegas, Nev. 1973 .
9. OSORNO, B.M.; SOLANA, M.P.; PEREZ, J.M. and TRUJILLO, R. Study an Attenuated *Anaplasma marginale* Vaccine in Mexico Natural challenge of immunity in an Enzootic Area. AM. J. Vet. Res. 36 (5): 631-633. 1975 .
10. PARRA, D.G.; VIZCAINO, O. Manual de Técnicas del Programa de Parasitología y Entomología Veterinaria, Instituto Colombiano Agropecuario. 1979 .
11. SUMMERS, W.A. Infectivity of *Anaplasma marginale* in bovine blood after prolonged freezing. Am. J. Vet. Res., 28 (124): 880-882. 1967 .
12. VALENTINE, B.L. Preservation of dimethylsulfoxidetriated *Anaplasma marginale* with liquid nitrogen. J. Bacteriology. 91: 2, 385-1966 .
13. VIZCANO, G.O. 1973. Aislamiento de una cepa de *Anaplasma marginale* de Colombia con características aparentes de atenuación natural. Trabajo sometido a la consideración del X Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Medellín, 1976 .
14. VIZCAINO, G.O. Caracterización de los antígenos de *Babesia argentina* y *Babesia bigemina* por los métodos de fijación del complemento, inmunodifusión inmunolectroforesis e inmunidad cruzada, Rev. ICA, 10 (1): 77-85. 1975 .
15. -----, Anaplasmosis et Babésiose Epidemiologie et a lutte en Colombie. Bull Off. Int. Epiz., 85 (5-6): 657-673. 1976.
16. -----; CARSON, C.A.; LEE, A.J. and RISTIC, M. Efficacy of attenuated *Anaplasma marginale* vaccine Under Laboratory and Field Conditions in Colombia. Am. J. Vet. Res. 39 (2): 229-233. 1978.
17. -----: CORRIER, D.E.; TERRY, M.K.; CARSON, C.A.; LEE, J.A. KUTTLER, K.L.; RISTIC, M. y TREVIÑO, G.S. Comparison of three methods of immunization against bovine anaplasmosis: Evaluation of protection afforded against field challenge, Am. J. Vet. Res. v. 1 no. 7, p. 1066-1068. 1980.
18. WELTER, C.J. and WOODS, R.D. Preliminary Evaluation of an Attenuated *Anaplasma marginale* Vaccine in cattle. Vet. Med. Sm. Anim. Clin., 68 798-802. 1963.
19. ZARAZA, H.; PARRA, D. Estudio de la Patogenicidad de dos cepas de *Anaplasma marginale* de Colombia. Rev. ICA 12 (4): 457-471. 1977.