

EVALUACIÓN DE LA ANAPLASMOSIS EN BECERROS MESTIZOS HOLSTEIN NATURALMENTE INFECTADOS Y DESAFIADOS CON AISLADOS HOMÓLOGOS Y HETERÓLOGOS DE *Anaplasma marginale*

Evaluation of Anaplasmosis in Naturally Infected Crossbred-Holstein Calves Challenged with Homologous and Heterologous Isolates of *Anaplasma marginale*

Catalina Rey V.¹, Pedro María Aso² y Alfredo Coronado³

¹Programa de Veterinaria, Complejo Docente El Hatillo, Universidad Francisco de Miranda. Intercomunal Coro-La Vela, Coro 4101, estado Falcón. E-mail: rbitter@reacciun.ve, Telefax 0268 2778446. ²Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar. Valle de Sartenejas, Baruta, Caracas. ³Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Tarabana, Cabudare, estado Lara.

RESUMEN

A pesar de la característica endémica de la anaplasmosis en Venezuela, son pocos los estudios que se refieren a la protección cruzada entre los diferentes aislados venezolanos de *Anaplasma marginale*. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el desarrollo de la enfermedad en becerros mestizos Holstein infectados naturalmente con el aislado Lara y posteriormente desafiados con aislados homólogos y heterólogos de la rickettsia, en la búsqueda de protección cruzada. Para el logro de estos objetivos, se adquirieron becerros mestizos Holstein de una semana de nacidos en una finca del estado Lara, infectados de manera natural con *A. marginale*, y se dividieron en tres grupos de tres animales cada uno. A los seis meses de edad fueron re infectados con un inóculo de 5×10^8 eritrocitos infectados con *A. marginale* del aislado homólogo Lara (grupo I), aislados heterólogos Táchira (grupo II) y Zulia (grupo III). Desde el comienzo de los experimentos se tomaron muestras de sangre completa para evaluar parasitemia y hematocrito y se evaluaron los signos clínicos. Los tres grupos fueron diferentes en relación al período pre-patente, porcentajes de disminución de hematocrito y niveles de parasitemia después del desafío. Dos de los tres animales del grupo I resultaron protegidos contra el reto homólogo, al no manifestar características compatibles con la enfermedad, mientras que los animales de los grupos II y III presentaron evidencias clínicas de anaplasmosis. El grupo inoculado con el aislado de Zulia presentó mayor severidad clínica que el grupo desafiado con el aislado Táchira.

Palabras clave: Anaplasmosis, aislados venezolanos, protección cruzada.

ABSTRACT

Despite the endemic characteristic of anaplasmosis in Venezuela, there have been few studies that refer to cross protection among distinct Venezuelan isolates of *Anaplasma marginale*. The objective of this work was to evaluate the development of this illness in crossbred-Holstein calves naturally infected with the Lara isolate and then challenged by homologous and heterologous isolates of rickettsia in search of cross protection. In order to achieve this purpose, crossbred-Holstein calves of one week of age, naturally infected with *Anaplasma marginale*, were acquired from a farm in Lara State and then divided into three groups of three animals each. After six months, they were inoculated with 5×10^8 erythrocytes infected with *A. marginale* homologous Lara isolate (group 1), heterologous isolates Tachira (group 2) and Zulia (group 3). From the beginning of experiment trials, blood samples were taken to evaluate parasitaemia and packed cell volume, as well as clinical signs were checked. The three groups were different in relation to the pre-patent period, levels of packed cell volume and parasitaemia after challenge. Two of three group 1 animals were protected against homologous challenge when they did not manifest signs of the disease, while the animals in groups 2 and 3 presented clinical evidence of anaplasmosis. The group inoculated with Zulia isolate showed a higher clinical severity than the group inoculated with Tachira isolate.

Key words: Anaplasmosis, Venezuelan isolates, cross protection.

INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis bovina es una enfermedad causada por una rickettsia intraeritrocitaria, *Anaplasma marginale* [3, 26] y constituye uno de los principales factores limitantes en el desa-

rollo de la ganadería en América Latina. De manera similar a otras enfermedades causadas por hematozoarios, como tripanosomiasis o babesiosis, causa considerables pérdidas económicas debido a la pérdida de peso, disminución en la producción de leche y muerte de ganado importado o de animales nativos que se mantienen en estrictas condiciones de estabulación [9, 19, 22]. En muchas regiones del mundo donde la anaplasmosis es endémica, es difícil determinar las pérdidas debido a la carencia de estadísticas y a la ocurrencia simultánea de las otras enfermedades mencionadas [8, 28]. A pesar del impacto económico de la enfermedad en Venezuela, los escasos estudios sobre métodos de control inmunoproláctico se han basado, entre otros, en la utilización de cuerpos de *Anaplasma marginale* aislado Florida de Estados Unidos [15] y más recientemente, en la inoculación de vacunas vivas de *Anaplasma centrale* [14, 27]. Las diferencias antigénicas de los aislados venezolanos de *A. marginale* han sido identificadas parcialmente utilizando animales esplenectomizados inoculados con algunos aislados [7] o mediante anticuerpos monoclonales [12], y aunque las variaciones en morfología, virulencia, estructura proteica y la habilidad de inducir protección cruzada fueron demostradas entre aislados de *A. marginale* de Kenia, Israel, Estados Unidos [17], Australia [1] y en Brasil [19], no existen referencias al respecto en Venezuela. Por estas razones es necesario evaluar la respuesta de animales no esplenectomizados a inoculaciones de diferentes aislados y a desafíos homólogos y heterólogos, con el fin de establecer criterios parasitológicos y clínicos que permitan la aplicación a futuro de métodos inmunoprolácticos. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el desarrollo de la anaplasmosis en becerros infectados naturalmente con el aislado Lara y posteriormente desafiados con aislados heterólogos de la rickettsia, en la búsqueda de protección cruzada entre aislados venezolanos de *A. marginale*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Infección y desafío con aislados geográficos de *Anaplasma marginale*

Animales: Los grupos experimentales se conformaron con nueve becerros raza mestizo Holstein, adquiridos en una finca cercana a la población de Duaca, estado Lara, y con edad aproximada de siete días. Esta explotación no introduce ganado foráneo, las gestaciones se logran a través de inseminación artificial y no aplican vacunas contra especies de *Anaplasma*. La finca tiene historia de brotes de anaplasmosis confirmados por extendidos sanguíneos, y se han observado bovinos positivos a *A. marginale* en las primeras 24-48 horas de vida.

En el momento de adquirir los becerros, éstos eran negativos a hemoparásitos a través de extendidos sanguíneos coloreados por tinción de Giemsa. Los animales fueron estabulados en becerrerías con protección contra vectores después de su adquisición.

Aislados geográficos de *Anaplasma marginale*: Los aislados geográficos de *A. marginale* se obtuvieron de sangre de bovinos infectados naturalmente en diversas zonas ganaderas del país (Táchira, Zulia y Lara), de fincas cerradas en las que no había incorporación de animales de otras regiones. El aislado Táchira proviene de un animal infectado de una hacienda situada en el municipio Panamericana, sector Los Pozones, estado Táchira; el aislado Zulia de una explotación situada en Machiques, distrito Perijá del estado Zulia; el aislado Lara de la misma finca donde se obtuvieron los becerros. Las muestras de campo positivas a *A. marginale* con un porcentaje de parasitemia de 5% o más se preservaron en frío [13, 21]. Posteriormente se inocularon bovinos esplenectomizados estabulados con un volumen de criopreservado que contenía como mínimo 10^9 eritrocitos infectados del aislado de interés, a fin de obtener suficientes eritrocitos parasitados para las infecciones del desafío. Cuando estos animales así inoculados presentaron elevaciones de parasitemia mayores de 30% y hematocrito superior a 12%, se extrajo la sangre para su utilización posterior en los desafíos.

Infección de los animales: Cuando los becerros tenían entre 17 y 30 días de nacidos presentaron parasitemia por *Anaplasma marginale*. Todo el grupo fue tratado con una sola dosis no esterilizante de 20 mg/kg peso vivo de oxitetraciclina L.A (Emicina L.A.®, Pfizer) en el momento en el que se detectó la rickettsemia. El día del tratamiento con oxitetraciclina se fijó como día cero para efectos del ensayo experimental y seguimiento de la infección. En consecuencia, todos los animales permanecieron infectados con un aislado Lara de *A. marginale* de manera natural.

Los nueve becerros fueron reunidos en tres grupos de tres animales cada uno por selección al azar. El grupo I se integró con los animales que serían desafiados con el aislado homólogo (Lara); el grupo II con el aislado heterólogo Táchira y el grupo III, desafiados con el aislado heterólogo de Zulia.

A los seis meses de edad (día 141 de la etapa experimental), según el grupo perteneciente, cada animal recibió un desafío con un criopreservado conteniendo 5×10^8 eritrocitos infectados con *A. marginale* [6, 11, 17] del aislado homólogo (Lara) o heterólogo, Táchira o Zulia. El inóculo se aplicó por vía intramuscular y endovenosa.

Evaluación del curso de la infección: El curso de la infección se evaluó mediante determinaciones de hematocrito, parasitemia, temperatura y signos clínicos de cada animal a primeras horas del día. Desde el día en que se adquirieron los becerros hasta antes del desafío se tomaron muestras de sangre cada quince días; desde el momento del desafío dos veces por semana hasta que el nivel de parasitemia sobrepasó el 1%, luego diariamente hasta que ésta retornó nuevamente a ese valor o menos. Para efectos de estimación de la parasitemia en campo se empleó la coloración de Giemsa; una vez que se estabularon los bece-

ros, este parámetro se estimó por el método de naranja de acridina y bromuro de etidio [2].

Criterios de tratamiento: Se establecieron criterios de tratamiento no esterilizante contra anaplasmosis a fin de no perder las unidades experimentales en casos críticos; cuando los niveles de hematocrito fueron inferiores o iguales a 15% durante dos días consecutivos, se aplicó una sola dosis de 20 mg/kg peso vivo de Oxitetraciclina A [21, 25].

Estimación de los períodos de la enfermedad

La etapa antes del desafío se dividió en periodo agudo, establecido desde que la parasitemia por infección natural se elevó sobre el 1% hasta que disminuyó a valores inferiores a 1%, simultáneamente con disminución del hematocrito; periodo de convalecencia, en el que no se observaron parásitos en sangre o los valores permanecían inferiores al 1% en extendidos de sangre teñidos con naranja de acridina y bromuro de etidio [2].

La etapa post-desafío se dividió a su vez en periodo pre-patente (lapso transcurrido entre el desafío y la aparición de parásitos en sangre), periodo agudo (niveles de parasitemia mayores al 1%) y periodo de convalecencia (parasitemias inferiores a 1%) [22, 28].

Análisis estadístico

El análisis de varianza de una sola vía se realizó para comparar los valores de hematocrito y parasitemia observados entre los animales de cada uno de los grupos y para estimar las diferencias entre cada uno de los grupos desafiados. En algunos casos (diferencias entre dos grupos para parámetros como días de máxima parasitemia, periodo agudo y pre-patente) se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis [23, 24].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Periodo de infección natural

Con edades promedio de siete días, todos los animales resultaron negativos a *A. marginale* a través de frotis sanguíneo coloreados con Giemsa, pero cuando los becerros tenían entre 17 y 30 días de edad, se observaron parasitemias de hasta 3% por *A. marginale*. De acuerdo al plan experimental, los animales fueron tratados con oxitetraciclina en dosis no esterilizantes [21, 25]. De esta forma, continuaron infectados y desarrollaron un periodo de infección natural, con fases agudas y de convalecencia bien definidas.

La evolución de la anaplasmosis en los tres grupos de animales, considerando los parámetros parasitemia y hematocrito, desde el momento de su adquisición hasta que tenían aproximadamente ocho meses de edad, se muestra en las FIGS. 1, 2 y 3. En la FIG.1 se observa el desarrollo de la enfermedad en el grupo I, en el que los tres animales presenta-

ron elevaciones de la parasitemia en un lapso de 110 días durante la infección natural (etapa pre-desafío). En los otros dos grupos (FIGS. 2 y 3), los niveles de ricketsemia fueron inferiores a los del grupo I, aunque la mayoría de los animales sufrió más de una crisis de parasitemia con disminución del hematocrito. Sin embargo, no se apreciaron otros síntomas de anaplasmosis, como aumento severo de la temperatura o ictericia en la mayoría de los animales. Según la FAO [4] deben cumplirse ciertos parámetros para concluir que un animal presenta una manifestación clínica severa de la enfermedad. Estos son: a) parasitemia mayor de 5%; b) 50% de reducción del hematocrito durante dos días, calculada como la disminución entre el hematocrito obtenido el día de comienzo de la parasitemia y el valor mínimo observado durante la misma; c) aumento de la temperatura; d) ictericia. Según esta definición, los animales 006 y 009 del grupo I, que debieron ser tratados en el día de máxima parasitemia (días 101 y 99, respectivamente, FIG. 1),

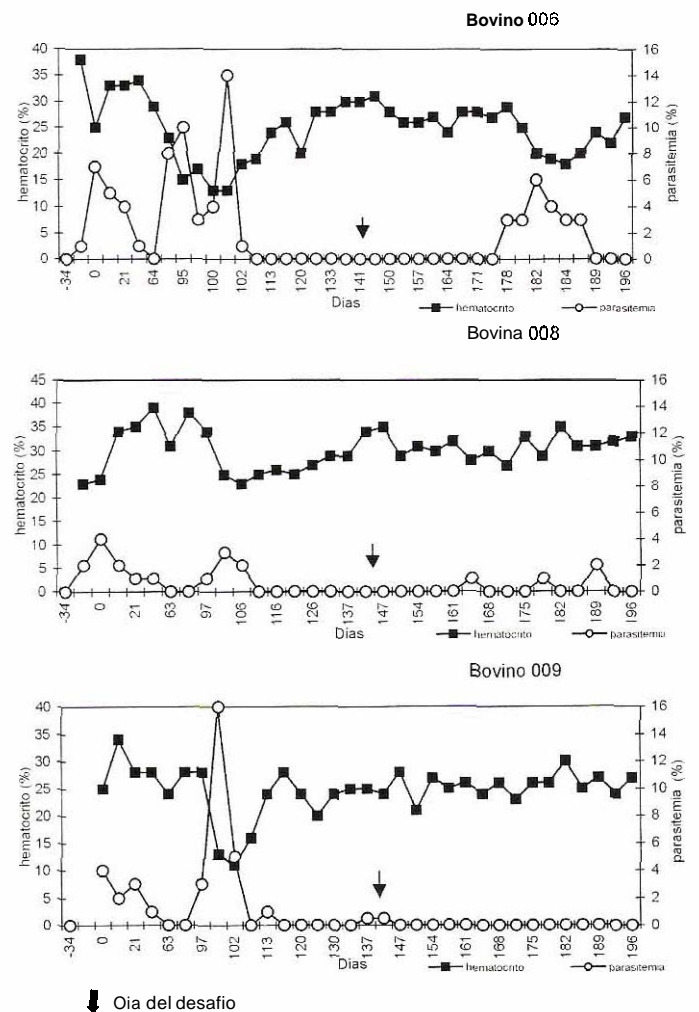
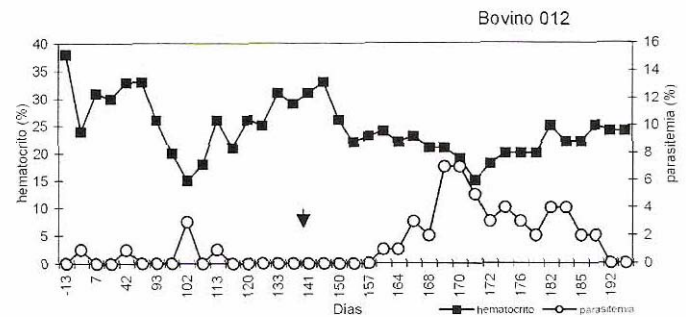
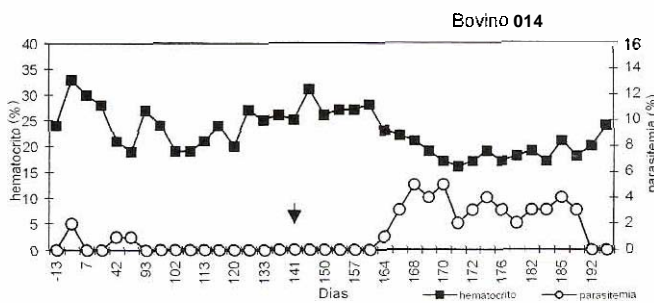
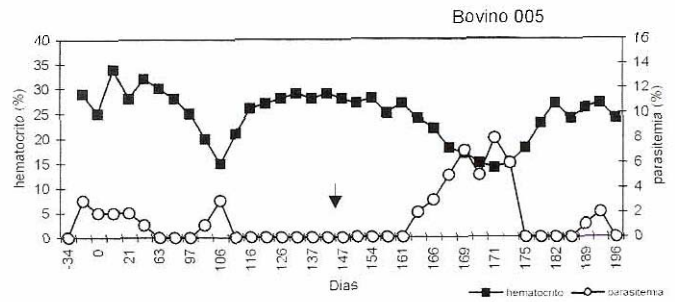
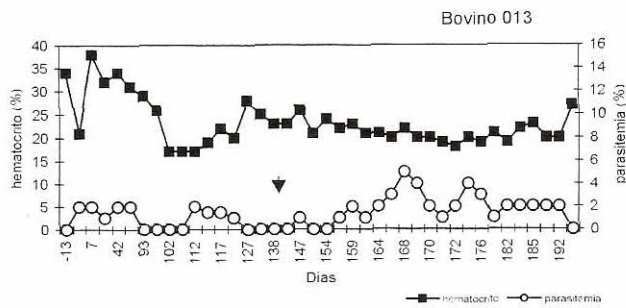
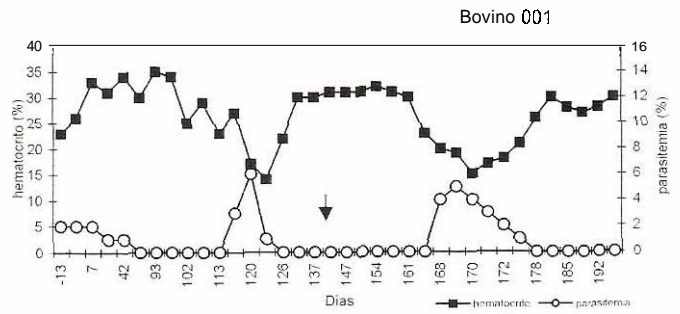
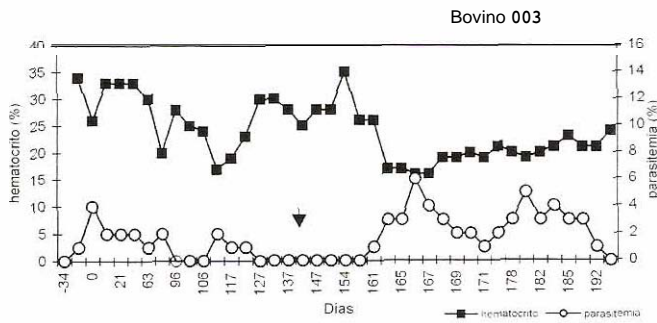


FIGURA 1. EVOLUCIÓN DE LA ANAPLASMOSIS EN BECERROS NATURALMENTE INFECTADOS CON Anaplasma marginale AISLADO LARA Y DESAFIADOS CON EL AISLADO HOMÓLOGO LARA (GRUPO I).



↓ Día del desafío

↓ Día del desafío

FIGURA 2. EVOLUCIÓN DE LA ANAPLASMOSIS EN BECERROS NATURALMENTE INFECTADOS CON *Anaplasma marginale* AISLADO LARA Y DESAFIADOS CON EL AISLADO HETERÓLOGO TÁCHIRA (GRUPO II).

FIGURA 3. EVOLUCIÓN DE LA ANAPLASMOSIS EN BECERROS NATURALMENTE INFECTADOS CON *Anaplasma marginale* AISLADO LARA Y DESAFIADOS CON EL AISLADO HETERÓLOGO ZULIA (GRUPO III).

y el animal 001 del grupo III (FIG. 3), presentaron manifestación severa de anaplasmosis durante el período de infección natural, mientras que el resto de los animales con porcentajes de disminución del hematocrito cercanos a 50% (003; 41% y 012; 38%) sufrieron una anaplasmosis moderada (TABLA I).

tuyendo el segundo período agudo observado durante el período de infección natural (TABLA I). Dos factores no excluyentes pueden haber influido en esta recrudescencia: a) el cambio de alimentación (leche y concentrado a pasto y heno) pudo haber contribuido a reducir la competencia inmune [11]; b) la ricketsemia cíclica que se observa en la anaplasmosis. Según Kieser y col. [10], los niveles del microorganismo varían a intervalos bimensuales de manera marcada en animales persistentemente infectados. Esta variación pudiera reflejar multiplicación cíclica de *A. marginale*, un evento consistente con la aparición de variantes antigénicas no reconocidas previamente por el sistema inmune del hospedero [18].

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,01$) entre los niveles de parasitemia entre todos los animales, probablemente debido a las diferencias genéticas entre cada uno de ellos, a la proporción del microorganismo naturalmente recibido y al día de infección. Dado que la infección primaria fue de forma natural, el origen de la misma es incierto, existiendo la posibilidad de una transmisión transplacentaria [20, 21, 29] o por vectores previamente a la estabulación [5].

En seis (006; 008; 009; 001; 005; 012) de los nueve becerros, el día de máxima parasitemia se observó alrededor de cien días después del primer pico de parasitemia (día 0), cons-

Otros parámetros fueron tomados en cuenta para medir el efecto de la infección natural sobre los animales [4]. Entre ellos, el porcentaje de descenso del hematocrito, y los días que el animal tardó en alcanzar el valor mínimo de hematocrito (TABLA I). Se observaron diferencias entre los porcentajes de

INDICADORES DE ANAPLASMOSIS EN LOS BECERROS EXPERIMENTALES DURANTE EL PERÍODO DE INFECCIÓN NATURAL CON EL AISLADO LARA DE *Anaplasma marginale*

Número del animal por grupo

Indicador	Grupo I						Grupo II						Grupo III					
	006	008	009	003	013	014	001	005	012	006	008	009	003	013	014	001	005	012
Día de máxima parasitemia	101	100	99	0	0	42	120	106	102	101	100	99	0	0	42	120	106	102
Recaídas1 picos de parasitemia	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
Indicadores en cada recaída																		
Valor máximo de parasitemia ¹	7	14	4	3	4	16	4	2	2	2	1	2	6	3	3	1	3	
Hematocrito en el día de comienzo de la parasitemia ¹	38	29	23	34	25	28	34	24	21	17	19	23	27	29	20	24	15	
Valor mínimo de hematocrito ¹	25	13	23	23	25	8	20	17	21	17	19	23	14	25	15	15	15	
Descenso del hematocrito ¹	34	55	0	32	0	71	41	29	0	0	21	0	48	14	25	38	0	
Días en alcanzar el valor mínimo de hematocrito	13	7	0	7	4	3	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	
Diferencia en días entre la máxima parasitemia y el valor mínimo de hematocrito	0	1	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	5	0	0	

¹ En porcentaje

disminución de hematocrito entre los animales, los cuales variaron entre 14 a 71% con relación a su nivel inicial, posiblemente debido a la variación genética propia de cada animal y a los diversos valores de parasitemia en cada uno de ellos. En algunos de los animales (003; 013; 014; 005 y 012) se observó que el valor mínimo de hematocrito se alcanzó el día de máxima parasitemia, por lo que no hubo secuestro de eritrocitos post-pico de parasitemia (TABLA I).

Periodo post-desafío con aislados geográficos venezolanos

Según la FAO [4] los parámetros esenciales a medir para evaluar la protección a un desafío por *Anaplasma* sp. son: a) el periodo de incubación, definido como el número de días desde el desafío hasta el primer día de fiebre; b) el periodo pre-patente, calculado como el número de días desde el desafío hasta la aparición de los primeros parásitos en frotis de sangre periférica; c) máximo porcentaje de disminución del hematocrito por debajo de los valores promedio pre-desafío; d) días de anemia, definidos como la disminución de hematocrito mayor del 50% durante dos días consecutivos; e) duración de la parasitemia, día de máxima rickettsemia y porcentajes de la misma.

En las FIGS. 1, 2 y 3 se observa que cada uno de los grupos mostró un comportamiento diferente en el desarrollo de la parasitemia y la evolución del hematocrito después del desafío según el aislado.

En el grupo I (TABLA II), retado con el aislado homólogo Lara, dos de los tres animales no mostraron elevación significa-

tiva de ia parasitemia (008 y 009) ($P>0,05$), mientras que el otro animal (006) presentó una sola crisis, con un nivel máximo de 6% de eritrocitos infectados en el día 182 (día 38 post-reto con el aislado homólogo). El periodo agudo de a enfermedad en este animal se prolongó por siete días, en comparación con el becerro 008, que duró tres días y el 009, que no presentó valores de parasitemia durante este periodo. En el bovino 006, los valores de parasitemia retornaron a menos del 1% después del periodo agudo sin necesidad de tratamiento y así permanecieron hasta la finalización del periodo experimental. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kutler y col. [11] al desafiar bovinos portadores con aislados homólogos.

Los animales de este grupo no mostraron días de anemia de acuerdo a los criterios de FAO [4]. El animal 006 tardó seis días en alcanzar el valor mínimo de hematocrito y la recuperación del valor normal fue de 18 días; aunque presentó un periodo agudo después del desafío con valores de parasitemia sobre 5%, el porcentaje de disminución de hematocrito no alcanzó el 50% (TABLA II). Se encontraron diferencias significativas dentro del grupo cuando se consideraron los valores de hematocrito ($P<0,05$; F:19,62). Sin embargo, cuando se evaluaron estadísticamente sólo los animales 008 y 009, se encontró que entre ellos no existía diferencia significativa con respecto al parámetro evaluado.

Estos resultados sugieren que la infección natural con el aislado de Lara de *A. marginale* protegió contra el desafío homólogo o reinfección, lo que coincide, independientemente del aislado, con la observación de que la premunición con un ais-

TABLA II
INDICADORES DE ANAPLASMOSIS EN LOS BECERROS DEL GRUPO I DURANTE EL PERÍODO POST-DESAFÍO CON EL AISLADO LARA DE *Anaplasma marginale*

Indicador	Número del animal			Promedio Grupo
	006	008	009	
Periodo pre-patente (días)	34	22	A	28 ± 8*
Periodo agudo (días) *1	7	3	A	5 ± 3*
Día de máxima parasitemia	38	45	A	42 ± 5*
Recaidas o picos de parasitemia *2	1	1	0	1*
Parasitemia máxima (%)	6	2	0	2,6 ± 3,0
Hematocrito en el día de comienzo de parasitemia(%)	29	28	A	29 ± 0,7*
Hematocrito minirno (%)	18	27	21	22 ± 4,5
Descenso del hematocrito (%)	38	4	0	
Días de anemia *3	0	0	0	0
Días en alcanzar el valor rminimo de hematocrito *4	6	0	0	
Días entre la máxima parasitemia y el valor minimo de hematocrito	2	0	0	
Días en recuperar el valor normal de hematocrito	18	3	0	
Días entre la máxima parasitemia y hematocrito normal	24	3	0	

Sólo 006 y 008; A: Ausente. *1. Desde el día en que se observó el 1% de parasitemia. *2. Veces que se elevó la parasitemia después de haber descendido a -1%. *3. Disminución del hematocrito igual o superior al 50% respecto a los valores promedio pre-desafío. *4. Tomado desde el día en que se observó parasitemia.

lado determinado protege a los animales contra un reto homólogo más no necesariamente contra uno heterólogo [11, 16].

En el grupo II (TABLA III), desafiados con el aislado proveniente del estado Táchira, los tres animales se comportaron de manera uniforme ($P > 0,05$). El máximo de parasitemia en el grupo fue de 6% (003) y el promedio de parasitemia del grupo fue de $5,3 \pm 0,6$. Durante el periodo post-desafío los becerros tuvieron de dos a tres recaídas con parasitemias entre 5 y 6%, con pocos días de intervalo, por lo que podría considerarse un periodo de parasitemia persistente. El periodo pre-patente en este grupo fue de 20 ± 2 días y el periodo agudo se prolongó por 30 ± 5 días en promedio. Giardina [7] observó que en animales esplenectomizados infectados con el mismo aislado de Táchira, el periodo de pre-patencia era de 20 días y la máxima parasitemia se presentaba el día 27, datos muy similares a los observados en este trabajo con animales no esplenectomizados. Aunque no fue necesario aplicar tratamiento a alguno de los tres bovinos experimentales, el periodo agudo fue muy largo, caracterizado por elevaciones y descensos de parasitemia a lo largo del periodo post-desafío. Aún cuando el declive del hematocrito no alcanzó el 50% ni se presentaron días de anemia, estos animales tardaron 33 días en promedio en recuperar el valor normal de hematocrito, en comparación con 18 días en el único bovino afectado del grupo I. En el caso del grupo experimental II, se sugiere que la infección con el aislado Lara no protegió totalmente contra el reto heterólogo Táchira; aunque los animales no presentaron manifestaciones severas de la

enfermedad, su recuperación fue tardía. Según Palmer y col. [18] el nivel de protección contra un desafío heterólogo puede variar marcadamente pero puede ser insuficiente para proteger totalmente contra una situación de morbilidad severa.

En el grupo III, constituido por los animales desafiados con el aislado de *A. marginale* proveniente del estado Zulia, el día de máxima parasitemia fue de 28 ± 1 , con una a dos crisis (TABLA IV). En estos animales, el periodo pre-patente fue unos pocos días mayor (22 ± 4) que en el grupo II que había sido retado con el aislado Táchira (20 ± 2). Giardina [7] señaló que en animales esplenectomizados inoculados con el mismo aislado de Zulia utilizado en este trabajo, el periodo prepatente era de 22 días y el día de máxima parasitemia el día 26, de manera semejante a lo observado para el grupo III. La parasitemia detectada en el grupo desafiado con el aislado de Zulia fue la mayor de los tres grupos, alcanzando valores de 8%, así como fue mayor (38%) el porcentaje de descenso del hematocrito (TABLA IV). Aún cuando pareciera que los animales de este grupo fueron más afectados por la anaplasmosis y de hecho, el bovino 005 fue tratado, el periodo agudo fue menos duradero (28 ± 0 días) que en el grupo I (30 ± 5 días). Así mismo, el hematocrito retornó a su valor normal en el grupo de Zulia en un promedio de 16 días, mientras que en los bovinos del grupo I este parámetro regresó a sus valores originales del día del desafío, 33 días después del comienzo de la parasitemia.

TABLA III
INDICADORES DE ANAPLASMOSIS EN LOS BECERROS DEL GRUPO II DURANTE EL PERÍODO POST-DESAFÍO CON EL AISLADO TÁCHIRA DE *Anaplasma marginale*

Indicador	Número del animal			Promedio Grupo
	003	013	014	
Periodo pre-patente (días)	19	19	22	20 ± 2
Periodo agudo (días) *1	30	35	25	30 ± 5
Día de máxima parasitemia	24	28	26	26 ± 2
Recaídas o picos de parasitemia *2	2	3	Continua	$2,5 \pm 0,7$
Parasitemia máxima (%)	6	5	5	$5,3 \pm 0,6$
Hematocrito en el día de comienzo de parasitemia (%)	26	22	23	24 ± 2
Hematocrito mínimo (%)	16	18	16	17 ± 2
Descenso del hematocrito (%)	39	18	30	29 ± 11
Días de anemia ^a	0	0	0	0
Días en alcanzar el valor mínimo de hematocrito *4	5	6	7	6 ± 1
Días entre la máxima parasitemia y el valor mínimo de hematocrito	0	6	3	3 ± 3
Días en recuperar el valor normal de hematocrito	37	31	32	33 ± 3
Días entre la máxima parasitemia y hematocrito normal	32	19	28	26 ± 7

*1 Desde el día en que se observó el 1% de parasitemia. *2. Veces que se elevó la parasitemia después de haber descendido a -1%.

*3. Disminución del hematocrito igual o superior al 50% respecto a los valores promedio pre-desafío. *4. Tomado desde el día en que se observó parasitemia.

TABLA IV
INDICADORES DE ANAPLASMOSIS EN LOS BECERROS DEL GRUPO III DURANTE EL PERÍODO
POST-DESAFIO CON EL AISLADO ZULIA DE *Anaplasma marginale*

Indicador	Número del animal			Promedio Grupo
	001	005	012	
Periodo pre-patente (días)	26	22	19	2214
Período agudo (días) * ¹	28		28	2810
Día de máxima parasitemia	27	29	27	28 ± 1
Recaídas o picos de parasitemia ²	1	2	Continua	
Parasitemia máxima (%)	5	8	7	7 ■ 2
Hematocrito en el día de comienzo de parasitemia (%)	23	24	24	2411
Hematocrito mínimo (%)	15	14	15	15 t l
Descenso del hematocrito (%)	35	42	38	38 ± 4
Días de anemia * ³	0	1	1	
Días en alcanzar el valor mínimo de hematocrito * ⁴	6	7	10	8 ■ 2
Días entre la máxima parasitemia y el valor mínimo de hematocrito	1	0	2	1 ± 1
Días en recuperar el valor normal de hematocrito	13	14	21	16 ± 4
Días entre la máxima parasitemia y hematocrito normal	6	7	13	914

*1 Desde el día post-desafío en que se observó el 1% de parasitemia. *2. Veces que se elevó la parasitemia después de haber descendido a -1%. *3. Disminución del hematocrito igual o superior al 50% respecto a los valores promedio pre-desafío. *4. Tomado desde el día en que se observó parasitemia. *5. Tratado el día 29 post-desafío.

Debido a la severidad clínica observada en los animales del grupo III, es posible que al aislado Zulia esté antigénicamente más alejado del aislado Lara que el de Táchira, por lo que deberían comprobarse las reacciones cruzadas entre estos dos aislados. Sin embargo, la duración del período agudo fue mayor en el grupo desafiado con Táchira así como la recuperación post-período agudo (TABLAS III y IV). La repercusión sobre la producción podría ser más grave en el grupo II por la lentitud en alcanzar el estado normal. En las infecciones por *A. marginale*, se ha propuesto que la resistencia del ganado a la enfermedad clínica es también dependiente de su habilidad para reemplazar los eritrocitos perdidos, y por tanto, sobrevivir a la infección antes de que comience una respuesta inmune protectora [6]. Debe enfatizarse que aunque las variaciones en los diversos parámetros evaluados dentro de cada grupo fueron mínimas, entre los tres grupos se apreciaron diferencias estadísticas altamente significativas, lo que sugiere que cada uno de los aislados del desafío influyó de manera diferente en el desarrollo de la enfermedad.

CONCLUSIONES

Al evaluar los hallazgos en este trabajo es evidente que:

a) Todos los animales presentaron períodos agudos y de convalecencia bien definidos durante el período de infección

natural, con diferencias debidas probablemente al origen de la infección inicial y a las variaciones genéticas entre ellos.

b) Los animales del grupo I sí resultaron protegidos contra el desafío homólogo, como se demostró por la mínima parasitemia post-desafío en dos de los tres animales, y en un período pre-patente mayor que en cualquiera de los otros dos grupos en el único animal afectado.

c) El aislado de Zulia ocasionó mayor severidad clínica en los animales, de acuerdo a los niveles de parasitemia observados, ligeramente superiores a los de Táchira, y a un porcentaje de disminución del hematocrito más alto. Sin embargo, su recuperación del estado agudo fue más rápida que en el grupo desafiado con el aislado de Táchira.

d) Los tres grupos fueron diferentes en relación a período pre-patente, período agudo de la enfermedad después del desafío, porcentajes de disminución del hematocrito y niveles de parasitemia, lo que amerita una evaluación sobre las consecuencias en la producción en animales infectados con estos aislados a nivel de campo.

AGRADECIMIENTO

Al Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, por su apoyo invaluable en la fase de campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BOCK, R.E.; DE VOS, A.J. Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust. Vet.J.* 79: 832-839. 2001
- [2] CABALLERO, H. A rapid-sensitive, simple and economical method for detection of *Anaplasma marginale* by fluorescent microscopy with acridine orange and ethidium bromide. Proceedings of the Ninth International **Veterinary Hemoparasite Disease** Conference. Mérida 6-9/10, México: 33. 1993.
- [3] DRANCOURT, M., RAOULT, D. Taxonomic position of the Rickettsiae: Current knowledge. *FEMS Microbiology Reviews* 13:13-24. 1994
- [4] FAO. Protocolo para evaluar la seguridad y eficacia de los inmunógenos contra la anaplasmosis y babesiosis bovina. RLAC/94/05-GAN-47. Red de Cooperación Técnica entre laboratorios de Investigación y Diagnóstico Veterinario, Programa de Hemoparásitos (Ed.). Santiago de Chile. 42 pp. 1994.
- [5] FOIL, L.D.; GORHAM, J.R. Mechanical transmission of disease agents by arthropods. En: **Medical Entomology**. B.F. Eldridgey J.D. Edman (Eds.). Kluwe Academic Pub. The Netherlands: 461-514 pp. 2000.
- [6] GALE, K.R.; GARTSIDE, M.G.; DIMMOCK, C.M.; ZAKRZEWSKI, H.; LEATCH, G. Peripheral blood lymphocyte proliferative responses in cattle infected with or vaccinated against *Anaplasma marginale*. *Parasitol. Res.* 82: 551-562. 1996.
- [7] GIARDINA, S. Caracterización bioquímica e inmunológica de aislados de *Anaplasma marginale* procedentes de diferentes zonas de Venezuela. Informe Final **CONICIT**, Proyecto S1-1912. (Mimeografiado). 161 pp. 1992.
- [8] GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Vet. Parasitol.** 57:109-119. 1995.
- [9] JAMES, M.A.; CORONADO, A.; LÓPEZ, W.; MELÉNDEZ, R.; RISTIC, M. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 17: 9-18. 1985.
- [10] KIESER, S.T.; ERIKS I.S.; PALMER, G.H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Inf. Imm.* 58:1117-1119. 1990.
- [11] KUTLER, K.L.; ZAUGG, J.L.; JOHNSON, L.W. Serologic and clinical responses of preimmunized, vaccinated and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. *Am. J. Vet. Res.* 45: 2223-2226. 1984.
- [12] LEAL, M.; NODA, A.; REYNA-BELLO, A.; CASAS, B.; PRECIGOUT, E.; ASO, P.M.; GORENFLOT, A.; GONZATTI, M.Y. Identification and characterization of corpuscular, soluble and secreted antigens of a Venezuelan isolate of *Anaplasma marginale*. **Vet. Parasitol.** 1957:1-15. 2000.
- [13] LOVE, J.N. Cryogenic preservation of *Anaplasma marginale* with dimethyl sulfoxide. *Am. J. Vet. Res.* 33: 2557-2560. 1972.
- [14] MELENDEZ, F. Evaluación de una vacuna de *Anaplasma centrale* contra la anaplasmosis bovina. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. (Trabajo de Maestría). 110 pp. 2001.
- [15] MONTENEGRO-JAMES, S.; JAMES, M.A.; TORO BENÍTEZ M.; LEÓN E.; BAEK, B.K.; GUILLÉN, A.T. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasitol. Res.* 77:93-101. 1991.
- [16] PALMER, G.H. *Anaplasma* vaccines. En: *Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines*, I.G. Wright, Ed. CRC: 1-29 pp. 1989.
- [17] PALMER, G.H.; BARBET, A.; MUSOKE, A.; KATENDE, J. M.; RURANGIRWA, F.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; DAVIS, W.; MCGUIRE, T.C. Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenya and the United States. *Int. J. Parasitol.* 18: 33-38. 1988.
- [18] PALMER, G.H.; RURANGIRWA, F.R.; KOCAN, K.M.; BROWN, W. C. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol. Today* 15:281-286. 1999.
- [19] PATARROYO, J.H.; HENCKEL, D.J.; PRATES, A.A.; MAFRA, C.L. Antigenic profile of a pure isolate of *Anaplasma marginale* of Brazilian origin, using a Western blot technique. **Vet. Parasitol.** 52: 129-137. 1994.
- [20] POTGIETER, F.T.; VAN RENSBURG, L. The persistence of coistral *Anaplasma* antibodies and incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54:557-560. 1987.
- [21] REY, C. Reacciones inmunes homólogas y heterólogas contra aislados geográficos de *Anaplasma marginale*. Universidad Simón Bolívar. (Tesis Doctoral). 170 pp. 1999.
- [22] RIVERA, M. Anaplasmosis. En: *Hemoparasitosis bovinas*. Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas. 237 pp. 1996.
- [23] ROHLF, F.J.; SOKAL, R.R. *Statistical Tables*. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 253 pp. 1969.
- [24] SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. *Biometry*. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 776 pp. 1969.

- [25] SWIFT, B.L.; THOMAS, G.M. Bovine anaplasmosis: Elimination of the carrier state with injectable long-acting oxytetracycline. *J. A. V. M. A.* 183: 63-65.1983.
- [26] THEILER, A. *Anaplasma marginale*. The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. En: **Report** of the Government **Veterinary** Bacteriologist **1908-1909**. Theiler, A. (Ed.), Transvaal Department of Agriculture, Transvaal, South Africa: 6-64 pp. 1910.
- [27] TORO, M. Epizootiología y métodos de control de la anaplasmosis. En: Memorias del Taller sobre Agentes Hemotrópicos. *El Vigía*. 19-20/03. Venezuela: 1-4 pp. 1997.
- [28] WANDURAGALA, L.; RISTIC, M. Anaplasmosis. En: **Rickettsial** and chlamydial **diseases** of **domestic animals**. Z. Woldehiwet and Ristic, M. (Eds.). Pergamon Press, Great Britain: 65-87 pp. 1993.
- [29] ZAUGG, J.L. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *Am. J. Vet. Res.* 46: 570-572. 1985.