

INMUNOLOGÍA E INMUNOPROFILAXIS DE LA ANAPLASMOSIS BOVINA

SERGIO DARÍO RODRÍGUEZ CAMARILLO
MIGUEL ANGEL GARCÍA ORTIZ RAMÓN
ABOYTES TORRES GERMINAL JORGE
CANTÓ ALARCÓN ROBERT BARIGYE

I. Introducción	124
II. Genoma y filogenia	128
1.Genoma	128
2.Proteínas de superficie	128

III. Mecanismos de inmunidad	132
1. Resistencia natural	132
2. Mecanismos de inmunidad adquirida	133
3. Anaplasmosis crónica	138
IV. Inmunoprofilaxis	139
1. Premunización	139
2. Vacunas atenuadas	139
3. Vacunas inactivadas	140
4. Desarrollo de un inmunógeno mexicano	141
5. Vacunas recombinantes	146
V. Conclusiones	147
Referencias	148

I. Introducción

La Anaplasmosis es una enfermedad infecciosa no contagiosa que afecta a los bovinos, ovinos, algunos rumiantes silvestres, equinos y aún al hombre. La enfermedad es causada por microorganismos del género *Anaplasma* (1,2) y en los bovinos

la anaplasmosis es ocasionada por las rickettsias *Anaplasma marginale* y *A. centrale*.

En los bovinos la rickettsia infecta los eritrocitos de los animales susceptibles, causando anemia severa y múltiples disturbios fisiológicos incluyendo abortos, depresión y la muerte. La anaplasmosis bovina tiene una distribución mundial, pero su presencia es de mayor importancia en las zonas tropicales y subtropicales (3). De las dos especies que ocasionan la enfermedad en los bovinos, *Anaplasma marginale* es la más patógena (4) y hasta el momento la única reportada en México (5). *Anaplasma marginale* tiene forma cocoide de 0.3 de diámetro (figura 1) y se caracteriza, como todas las rickettsias, por no tener su cromatina organizada en un núcleo con membrana limitante y por carecer de retículo endoplásmico. Recientemente ha sido agrupada con otras bacterias previamente conocidas como ehrlichias (1). Después de que la rickettsia entra en el bovino, inicia su multiplicación y durante los siguientes 15 a 45 días los animales no muestran signos de la enfermedad (4). En forma natural, la enfermedad se puede presentar en forma hiper aguda, con estados febriles de 41⁰ C, fallo cardio-pulmonar y muerte en períodos de 24 - 32 h; existe una forma aguda, con fiebre de 40⁰ C, anemia progresiva, aborto y muerte, también puede presentarse en forma crónica con ausencia de signos clínicos típicos. Esto último puede resultar después de una infección aguda o una infección inducida conocida también como premunización (6). Se piensa que los portadores crónicos asintomáticos, y algunos rumiantes silvestres, fungen como reservorios naturales y son los responsables de preservar el agente etiológico en la naturaleza (3).

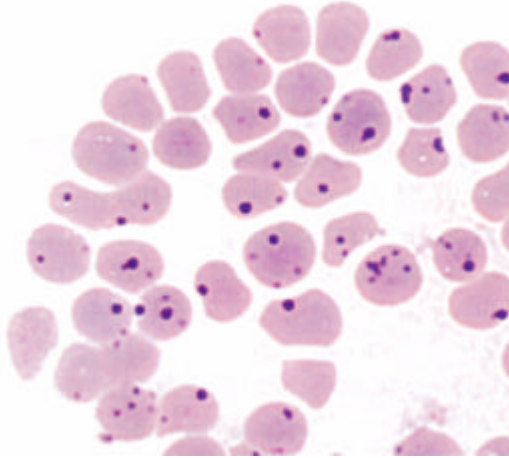


Fig. 1. Eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* teñidos con colorante de Giemsa.

La anaplasmosis se puede transmitir en forma biológica mediante garrapatas de los géneros *Boophilus spp.*, *Dermacentor spp.*, *Ixodes spp.*, y *Rhipicephalus spp.* (7, 8, 9, 10, 11, 12,13); la transmisión mecánica está dada por insectos hematófagos como moscas de establo, mosquitos de los géneros *Siphona spp.* y *Psorophora spp.* y tábanos (9, 10, 14,15); y por manipulaciones como castraciones, descornes y vacunaciones en las que los utensilios no han sido esterilizados adecuadamente.

A escala mundial, la enfermedad origina pérdidas incalculables por muertes, pérdida de peso de los animales, abortos, costos de tratamientos, medidas preventivas y de control de vectores. Además, los animales parasitados crónicamente recuperan su peso en períodos muy prolongados. En México, los estudios económicos al respecto estimaron pérdidas por más de tres mil millones de pesos tan sólo en 1980 (16), cifra que

actualmente representaría mas de 130 millones de dólares. Asimismo, en 1995 se le responsabilizó por el 26% de la mortalidad total registrada en bovinos de alto registro, manejados dentro del programa nacional de mejoramiento genético "Ganado Mejor" (17), esto sin incluir pérdidas no reportadas en animales fuera de estos programas gubernamentales. En estas condiciones, la producción de leche y particularmente la de carne decrece considerablemente y se desaprovecha el potencial de producción de las regiones tropicales donde la infección es comúnmente endémica y, particularmente en México, dificultando la introducción al trópico de ganado susceptible tipo europeo (*Bos taurus*), altamente sensible a la anaplasmosis (18,19).

La anaplasmosis es esencialmente una enfermedad del ganado adulto. En un área enzoótica, la mayoría de los becerros quedan infectados entre las 4 y las 294 semanas de vida; los cambios clínicos y patológicos en los mismos son leves y breves, quedando en general, protegidos para toda su vida; sin embargo, son portadores de la infección y en condiciones' de estrés pueden manifestar una recurrencia de la infección (19). Aunque en principio todas las razas de bovinos son igualmente susceptibles ala infección, las razas cebúes por ser relativamente resistentes ala infestación masiva por garrapatas, dan la impresión de que son resistentes a la anaplasmosis (5,20).

Los estudios serológicos señalan a las zonas tropicales y subtropicales del Sureste y del Golfo de México, con prevalencias superiores al 50% (21, 22, 23.) El mayor riesgo de infección se presenta en bovinos adultos procedentes de zonas libres o de baja frecuencia que son introducidos a zonas endémicas; asimismo los reportes de las asociaciones ganaderas consideran que la enfermedad es un problema aún, en zonas endémicas

donde existe estabilidad enzoótica (Rodríguez, datos no publicados).

La presente recopilación destaca ciertos aspectos de la filogenia y del genoma de la rickettsia, revisa el conocimiento de los mecanismos inmunológicos y las formas utilizadas para la inmunización de animales susceptibles que se han comprobado en la anaplasmosis bovina y los integra al marco teórico que se ha observado en las infecciones intracelulares.

II. Genoma y filogenia

1. Genoma

Se ha estimado el tamaño del genoma de *Anaplasma marginale* entre 1200 y 1260 kpb a través de electroforesis de pulso de los fragmentos de restricción obtenidos después de una digestión completa con *Sfi* I, asimismo se ha determinado la cantidad de G+C en 56% mol. Filogenéticamente se ha confirmado que este género se encuentra muy relacionado con los géneros *Ehrlichia* y *Cowdria* (24) y, recientemente se han incluido en la familia Anaplasmatacea a *Anaplasma (Ehrlichia) phagocitophila* que a su vez incluye a *Anaplasma (Ehrlichia) equi* y al agente de la ehrlichiosis granulocítica en humanos *Anaplasma (Ehrlichia) bovis* y *Anaplasma (Ehrlichia) platys* dentro de género además de comprender a *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, y *A. ovis* (1).

2. Proteínas de superficie

Anaplasma marginale es una de las rickettsias mejor estudiadas hasta la fecha. Actualmente se conocen cinco proteínas localizadas en la membrana celular de la rickettsia.

Estas proteínas, inicialmente descritas para el aislado Florida, han sido denominadas proteínas principales de superficie (major surface proteins, MSP) con números consecutivos del 1 al 5. La composición básica de ellas es como sigue.

- MSP1 es un heterodímero, es decir la proteína está compuesta de dos polipéptidos heterogéneos no relacionados, MSP1a, que está codificada por el gen *msp1a* y MSP1b codificado por al menos dos genes *msp1β 1* y *msp1B2* (25,26). El peso molecular aparente de MSP1a es de 105 kDa pero varía de acuerdo a un número variable de secuencias repetidas cada una de 28 a 29 aminoácidos, ubicadas en la parte variable de la proteína, lo que da como consecuencia, aislados geográficos diferentes; también se ha reportado que esta proteína contiene un epítipo sensible a la neutralización que se presenta en todos los aislados estudiados de los Estados Unidos, Israel y Kenia (27). La proteína MSP1b es polimórfica entre cepas y dentro de la misma población. Se ha reportado que la inmunización con el complejo MSP1 induce protección al desafío homólogo y en menor grado al desafío heterólogo, esto quizá se deba a que en estudios funcionales de este complejo se demostró que ambas fracciones fungen como adhesinas, es decir como receptores para los eritrocitos (28,29); más recientemente, se demostró también que este complejo tiene la capacidad de adherirse a células de garrapata en cultivo *in vitro* y células del intestino de *Dermacentor variabilis* (30). Por otro lado, el estudio de un aislado de *A. marginale* en cultivo no mostró que exista presión para que el organismo presente variabilidad en estas y otras proteínas de superficie (31).
- MSP2 es una proteína de aproximadamente 36 kDa (32) y en su estado nativo, es decir cuando se aísla de extractos

crudos de la rickettsia, es capaz de inducir una respuesta parcialmente protectora contra asilados homólogos y en menor grado contra aislados heterólogos, cuando se inocula a animales menores de un año (27). También, existe una contraparte de esta misma proteína en *A. centrale* y recientemente se han detectado proteínas homólogas en otras rickettsias como en *Anaplasma phagocytophila* (antes *Ehrlichia granulocytica*) (33,35). Esta proteína está codificada por una familia multigénica que permite la presentación de variantes durante los diferentes ciclos de rickettsemia presentes en un solo animal (36). Este polimorfismo está íntimamente relacionado con la permanencia de *A. marginale* en los animales portadores ya que aún cuando los animales se recuperan de una primo-infección, si la rickettsia no es eliminada entonces, surgen variantes de la misma (variantes de MSP2) que permiten a la rickettsia iniciar un nuevo ciclo de rickettsemia que no es reconocido por los anticuerpos específicos generados en el hospedero cuando se presentó la primo-infección y que será terminada abruptamente cuando se genera una nueva respuesta de anti cuerpos capaz de reconocer y eliminar las nuevas variantes (36,37), de esta forma se han determinado que surgen de 3 a 6 variantes de MSP2 cada 6 a ocho semanas en animales portadores, es decir cada ciclo de rickettsemia. La presentación de variantes se ha observado también durante la infección de la rickettsia a sus hospederos vectores, cuando se reproduce en células de intestino de garrapatas, sin embargo el perfil de la MSP2 que llega a la glándula salival del vector parece estar restringido a dos variantes en *Dermacentor andersoni*, de manera que al momento de alimentarse, siempre se transmiten al bovino dos variantes de MSP2 (salivary gland variant-1 SGV1 y SGV2) hablando de un mismo aislado, estas mismas

variantes son las que se presentan en la rickettsia que se desarrolla en forma aguda durante la primo-infección por garrapatas en el nuevo hospedero (38,39).

- MSP3, es una proteína de aproximadamente 86 kDa, que se presenta en forma polimórfica dentro de una misma infección y entre aislados. Los estudios genéticos de esta proteína han demostrado que está codificada por una familia multigénica que se expresan en forma cíclica en un solo animal, que comparte secuencias con MSP2, y con MSP4 y además se especula que parte de la variabilidad de MSP3 y MSP2 deriva de la posible recombinación. entre los genes que codifican por estas dos proteínas (40,41). Desafortunadamente no todos los sueros de animales infectados son capaces de reconocer esta proteína (42).
- MSP4 es una proteína de aproximadamente 31 kDa de peso molecular aparente, está codificada por un solo gene y los anticuerpos monoclonales reconocen el homólogo de esta en aislados de diferentes regiones geográficas distantes, pero no se han detectado homólogos en otras rickettsias (*A. ovis*, *Ehrlichia ruminantium* etc.) y no todos los sueros de animales infectados con *A. marginale* reconocen con la misma intensidad a esta proteína, por lo que se considera que no es un candidato adecuado para la inmunización de animales contra la anaplasmosis (43,44).
- MSP5 es una proteína de bajo peso molecular, aproximadamente 19 kDa, que se ubica en la superficie de la rickettsia, y está codificada por un solo gen, lo que indica que debe tener una función de importancia en la conservación de la especie; se ha reconocido su homólogo en todos los aislados geográficos hasta ahora probados y

estructuralmente se presenta en forma multimérica, y unida por puentes disulfuro que le ayudan a mantener su conformación terciaria (45), necesaria para su reconocimiento por anticuerpos de bovinos expuestos a la rickettsia, también se expresa en garrapatas infectadas, 10 que sirve para diagnóstico en bovinos y vectores (46). Dada su amplia presencia en todos los aislados hasta ahora estudiados (47), se ha usado con éxito en ensayos diagnósticos en diferentes partes del mundo (48, 49, 50).

III. Mecanismos de inmunidad

1. Resistencia natural

La resistencia de los animales a la anaplasmosis como en otras enfermedades se puede clasificar como resistencia natural, que a su vez puede ser dependiente del sexo, de la edad o aún de la raza, y como resistencia inducida o inmunidad adquirida. Dentro de estos procesos de resistencia natural que se han observado contra la anaplasmosis, el que ha sido documentado, es el de la resistencia natural a la presentación de signos clínicos en animales menores de 18 meses (51, 52). De la misma forma se considera que a menor edad la presentación del cuadro clínico será mas leve o aún, inconspicuo, sin embargo estos animales no son refractarios ala infección, lo que se ha probado mediante el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa, con la que se ha demostrado contundentemente que animales menores de 3 meses son portadores de la rickettsia aún cuando no presentan signos clínicos (22). Los mecanismos que evitan la presentación de los signos clínicos se desconocen ya que aún cuando se ha propuesto la mediación de factores solubles derivados de células T de terneras infectadas, estos factores no pudieron ser caracterizados en detalle (53). Mas recientemente se postuló que

la ausencia de células T (linfocitos cooperadores CD4 +) de bazo, ganglios linfáticos y sangre aunada a la timectomía, podría abrogar esta resistencia, sin embargo animales con estas características no presentaron signos clínicos cuando fueron infectados en forma experimental, sin embargo se pudo observar una rickettsemia transitoria junto con alteración en los valores de hematócrito (Valdez y col., 2002) (54). Estos resultados no eliminan la posibilidad de que otros mecanismos celulares no caracterizados, puedan contribuir a la inhibición de la presentación de los signos, como se ha observado para babesiosis, donde la rápida estimulación de interleucina (IL) 12, interferón γ y producción de ácido nítrico en el hígado contribuyen a la resistencia a la presentación de signos clínicos aún cuando tampoco se evita la infección (55). Fenómenos de resistencia relativos a la raza de los animales se han reportado, mas bien en términos de especie, es decir en animales *Bos taurus* (bovinos tipo europeo) o *Bos indicus* (tipo cebuino). A este respecto, tradicionalmente se ha considerado que animales cebuinos puros y sus cruza hasta en $\frac{3}{4}$ partes sangre cebú, son mas resistentes ala infección por anaplasmosis (56), pero este fenómeno no ha sido demostrado concluyentemente por otros trabajos (19, 57), aunque si se ha confirmado que los bovinos *Bos indicus* son mas resistentes a la infestación por garrapatas, lo que da la impresión de resistencia a anaplasmosis. La resistencia en relación al sexo se ha reportado mas en virtud del daño que la enfermedad ocasiona en sementales los cuales pierden su capacidad para reproducirse, que en términos de verdadera resistencia de un sexo sobre otro a la anaplasmosis.

2. Mecanismos de inmunidad adquirida

Para entender los mecanismos de inmunidad que intervienen en la resolución de la anaplasmosis, habrá que analizar los

eventos que ocurren durante el proceso inicial de la primoinfección y los eventos que ocurren en la resolución de exposiciones subsecuentes como las que suceden en animales que habitan zonas endémicas.

El proceso de infección por *Anaplasma marginale* en el bovino, comienza cuando los cuerpos iniciales de la rickettsia son inyectados por la garrapata a partir de formas que se alojan en las glándulas salivales (58), estas formas infectan al eritrocito sano, célula que carece de núcleo y de receptores correspondientes al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), hecho que las hace inmune a la acción de linfocitos citotóxicos CMH de clase I o clase II.

El proceso de invasión del cuerpo inicial es mediado por las proteínas de superficie MSP1a y MSP1b, que funcionan como adhesinas (28, 29, 30). De estas dos proteínas la primera parece tener también un papel importante en la adherencia de los cuerpos iniciales en la garrapata, en contraste con la segunda que parece tener afinidad exclusivamente por el eritrocito (30), mas aun, esta misma proteína parece tener un papel relevante en la transmisión de ciertos aislados de la rickettsia a través de garrapatas (59).

Una vez en el interior del eritrocito, la rickettsia se multiplica por bipartición hasta alcanzar un número entre 2 y 7 cuerpos iniciales, que se agrupan en una forma de mayor tamaño conocida como cuerpo de inclusión (4). Posteriormente este cuerpo de inclusión libera los cuerpos iniciales que se multiplican secuencialmente en otros eritrocitos y se liberan sucesivamente hasta alcanzar porcentajes de infección altos. Los eritrocitos no son destruidos por la penetración o por la liberación de los cuerpos iniciales de la rickettsia. Teóricamente se espera que las modificaciones ocasionadas por la invasión del cuerpo inicial y su

replicación, induzca que los eritrocitos sean reconocidos por los macrófagos de los tejidos reticulares y de los sinusoides vasculares presentes en la pulpa roja del bazo. Inicialmente los mecanismos de captura son ineficaces por parte de los macrófagos, la actividad óptima se presenta hasta que se alcanzan concentraciones altas de eritrocitos infectados. La fagocitosis no específica ha sido demostrada en el bazo y puede explicar la esplenomegalia presente en las infecciones (60, 61, 62).

Una vez fagocitado el eritrocito infectado se inicia el procesamiento antigénico, el cual incluye la desnaturalización y la digestión parcial de las proteínas del *Anaplasma* (63), de tal manera que las proteínas se rompen en péptidos cortos. Posteriormente un número limitado de péptidos se relaciona de modo no covalente con las proteínas del CMH de clase II, los péptidos se transportan a la superficie del macrófago donde pueden ser detectados por células T cooperadoras CD4+ (Th CD4+). La activación de la célula Th CD4+ ocurre cuando se presentan dos señales, siendo la primera la unión del receptor del antígeno de la célula Th CD4+ al complejo antigénico péptido-CMH en la superficie del macrófago, y la segunda dada por otra proteína diferente transmisora de la señal a la cual debe tener contacto con la célula Th CD4+ en la superficie del macrófago. Al presentarse las dos señales, se induce en la célula Th CD4+ la producción de la interleucina 2 (IL 2) y la expresión de sus respectivos receptores en la superficie del propio linfocito Th CD4+; esta citosina es un factor mitógeno muy potente para los linfocitos Th, necesario para la proliferación de las células Th CD4+ activadas. La IL 2 tiene una semidesintegración muy corta fuera de la célula, razón por la cual solo actúa en la intermediación de las células que la secretan (64). El contacto entre el macrófago y el linfocito Th CD4+ estimula también al primero para liberar la interleucina 1 (IL 1), que actúa sobre el propio

macrófago para expresar las proteínas de CMH de clase II, así como varias moléculas adhesivas que refuerzan la fijación con la célula Th CD4+ y aumenta la presentación de antígeno. Asimismo la IL 1 estimula a la célula Th CD4 + para la secreción de una mayor cantidad de IL 2 y para la expresión de su respectivo receptor, de esta manera se potencializa la respuesta proliferativa de las células T. Los macrófagos producen mayor cantidad de IL 1 Y en menor cantidad una citocina más como es el factor de necrosis tumoral, que pueden presentar sinergia con la IL-1 (53, 60, 61, 65, 66).

Las células T cooperadoras que participan en la respuesta inmune incluyen células Th1, especializadas en la producción de IL 2 e interferón gamma, que estimulan la síntesis de IgM e IgG2 por las células B y activan a los macrófagos (67), sin embargo también se presenta una respuesta de células Th2 que secretan IL 4, IL6 e IL10, citocinas que estimulan también células B pero hacia la producción de IgG 1. Las células B se pueden activar al reconocer a un inmunógeno en su forma libre y no transformada, este reconocimiento lo realizan a través de sus receptores de antígeno o anticuerpos de superficie (63). Las células Th CD4+, tienen un radio de acción muy corto y activan a las células B a través de la IL2, o a través de contacto directo, por medio de sus proteínas de superficie. La combinación de fijación de antígeno y los factores cooperadores producen señales mitógenas más fuertes que cada estímulo por separado, de esta manera se multiplican los clones específicos a un antígeno dado (61, 66). Estudios acerca de las diferentes capacidades de los isotipos de las inmunoglobulinas G del bovino indican que IgG2 a diferencia de IgG 1, esta relacionada con la resolución de procesos infecciosos (68, 69), capacidad que se ha confirmado en el caso de anaplasmosis bovina ya que estos anticuerpos de animales inmunes son capaces de opsonizar eritrocitos

infectados y ser más rápidamente fagocitados (70), a diferencia de IgG 1 que no es capaz de mediar la fagocitosis por neutrófilos o monocitos (69). La importancia de la IgG2 en los procesos de inmunidad contra anaplasmosis se ha comprobado recientemente, ya que animales vacunados con extractos de membranas de la rickettsia, presentan una respuesta de IgG2 pero no de IgG 1 en los animales protegidos contra el desafío homólogo (63), lo que también sucede al vacunar animales con cuerpos iniciales purificados de la rickettsia y desafiados en forma heteróloga (Rodríguez y col. datos no publicados). Los antígenos responsables de esta estimulación han sido parcialmente definidos y entre ellos se encuentra principalmente la MSP2, la MSP3 (que comparte secuencias con MSP2) y otros antígenos no especificados (71). En estudios recientes en nuestro laboratorio, se han observado una serie de 10 antígenos que van de 32 a 209 kDa, y al desafío se presentan antígenos de van desde 25 hasta 209 con incremento en la intensidad en particular en las bandas de 39, 50, 68, 81 y 91 kDa, siendo reconocido de novo el de 25 kDa (Barigye y col., datos no publicados). La importancia de esos antígenos dentro de la respuesta inmune contra anaplasmosis está siendo estudiada en México en los laboratorios del INIFAP.

La opsonización aumenta la eficiencia de los macrófagos y hay una exacerbación en la respuesta de células T CD4+ (70, 71). A pesar de estas respuestas, una cuarta parte de los animales susceptibles no alcanzan a montar la respuesta inmune necesaria para controlar la infección y mueren.

Se ha observado reiteradamente que la destrucción de eritrocitos totales es mayor al porcentaje de eritrocitos infectados; este hecho se ha explicado como parte de un fenómeno autoinmune; sin embargo, en años recientes se ha discutido la

posibilidad de que algunos factores que intervienen en la respuesta inmune también participen en un proceso patológico. Este es el caso del óxido nítrico que liberan los macrófagos extracelularmente. En *Plasmodium falciparum* y *Babesia bovis* se ha observado que el estímulo antigénico a las células T puede propiciar que los macrófagos liberen óxido nítrico el cual sería responsable de los severos daños presentes en ambas infecciones (72, 73), esto también está respaldado por el hecho de que en la anaplasmosis bovina, el uso de un inhibidor de la síntesis del óxido nítrico, al parecer mejora el curso de la enfermedad (74). De ser cierto esto, la liberación de óxido nítrico extracelularmente, por parte de los macrófagos del bazo, podría contribuir en forma importante a la destrucción de eritrocitos sanos (60, 70, 71, 75).

3. *Anaplasmosis crónica*

Los animales sobrevivientes a la infección inicial se convierten en los principales portadores de la rickettsia; este fenómeno está bien documentado. Una vez resuelta la rickettsemia inicial, se detectan altos niveles de anticuerpos específicos para variantes de la MSP-2 y MSP-3 (36, 76). Existen dos variantes de MSP2 que se expresan también en las glándulas salivales de las garrapatas SVG 1 y SVG 2 (38, 39), sin embargo, posterior a este evento y a 10 días de ciclos de aproximadamente 6 semanas, surgen pequeños incrementos en el número de rickettsias circulantes que corresponden a la presencia de 2 a 3 variantes antigénicas de MSP2 (37), a las que se les atribuye la capacidad para evadir el sistema inmune. Una semana posterior al surgimiento de estas variantes, se presenta un nuevo pico de anticuerpos específicos para cada variante (77), y esta es muy probablemente la causa, por la que hayan fallado los experimentos encaminados a verificar la capacidad protectora del suero inmune de animales hiperinmunes (78).

IV. **Inmunoprofilaxis**

1. Premunización

En México y en muchos otros países incluyendo a los Estados Unidos, no existen alternativas comerciales para el control de la enfermedad (79), por lo que se continúa con prácticas empíricas para la protección del ganado. Una de las más comúnmente usadas es la premunización que se explica como el uso de sangre infectada proveniente de animales portadores o animales con infección aguda, para exponer a animales sanos. Sin embargo, este método se sigue aplicando a pesar de que existen datos que indican que los animales portadores presentan ciclos de rickettsemia aproximadamente cada 6 semanas (37). Esta práctica conlleva el riesgo de que la sangre no contenga el número adecuado de eritrocitos infectados para establecer la infección en los animales "vacunados", particularmente cuando la cantidad de sangre transferida es muy pequeña (80); además, el período para mostrar la infección puede ser tan largo que los animales son dejados a su suerte para sufrir la infección, en ausencia de monitoreo; por otro lado, cuando la sangre proviene de animales con un cuadro clínico agudo, la infección puede ser tan intensa y en un período tan corto, que en ausencia de monitoreo adecuado los animales pueden morir de una infección hiperaguda (6,81). Existe además de estos riesgos, la posibilidad de transmitir otros agentes patógenos en la sangre infectada, lo que puede conducir a desastres económicos y sanitarios (82).

2. Vacunas atenuadas

La vacunación contra anaplasmosis también contempla el uso de cepas vivas atenuadas sean de *A. marginale* como las que se han preparado al pasar una cepa de *A. marginale* en ovinos (83,

84), o aún en venados (85), o especies diferentes como *A. centrale*, considerada como de menor virulencia (86). Sin embargo estas vacunas a partir de cepas atenuadas, pueden ocasionar la enfermedad en animales adultos (87, 88), o en el caso particular de *A. centrale* como agente exótico, no está permitido su uso en México (89). Mas aún, la vacunación con este tipo de cepas, particularmente las de *A. centrale*, aunque ha sido muy exitosa, dependerá en gran medida de una supervisión gubernamental estricta (88,90). El uso de agentes vivos conlleva también el riesgo de transmisión de otros patógenos que pueden traer graves consecuencias a programas de control y/o erradicación a nivel nacional (82).

3. Vacunas inactivadas

Por otro lado ya desde hace muchos años, se ha intentado la inmunización con preparados inactivados derivados de sangre infectada o con sangre infectada adicionada con un adyuvante a desde mediados de siglo se registran los primeros esfuerzos por usar agentes inactivados para la prevención de la anaplasmosis (83,85,91) habiendo tenido éxito parcial, ya que la mayor de esos productos inducía una protección limitada al aislado con la que se produjo el inmunógeno y de poca importancia contra aislados heterólogos, además de inducir la producción de isoanticuerpos contra grupos sanguíneos de los animales vacunados, Con la consecuente presentación de los de isoeritrolisis neonatal en los terneros de madres vacunadas (92, 9).

Estudios con cuerpos iniciales prácticamente puros han mostrado que es posible la protección contra desafíos homólogos (94), y heterólogos, cuando se usan los cuerpos iniciales inactivados de la rickettsia y un adyuvante comercial (95, 96, 97) sin embargo, vacunas extranjeras que se han probado para su registro en México, no protegieron adecuadamente a desafíos

heterólogos contra aislados Mexicanos (89, 98). En México los estudios con cuerpos iniciales de cepas mexicanas, muestran la posibilidad de inducir protección en animales mayores a un año en forma homóloga contra la enfermedad (94). no se tiene claro si este inmunógeno será de uso nacional, o restringido a zonas endémicas delimitadas de donde provengan aislados con los que se elabore el inmunógeno específico.

4. Desarrollo de un inmunógeno mexicano

En los estudios reportados a continuación se usaron cepas de *A. marginale* de origen mexicano previamente caracterizadas de acuerdo a su virulencia en animales susceptibles (99, 100), y de las que se purificaron los cuerpos iniciales, obtenidos por lisis mediante ondas de ultrasonidos y centrifugación diferencial lo que permite eliminar en alto porcentaje la contaminación con detritos del eritrocito (101). Esta plenamente documentado que la protección inducida por la inoculación con un aislado protege adecuadamente al desafío homólogo, pero en forma limitada o nula contra el desafío heterólogo (87), de la misma forma que vacunas inactivadas tampoco protegen completamente contra desafíos heterólogos (89, 98). De esta forma en un primer trabajo se ensayó un inmunógeno compuesto de cuerpos iniciales de tres aislados mexicanos para definir la posibilidad de proteger en forma amplia contra la gama de aislados presentes en nuestro país, los aislados usados provinieron del sureste (Yucatán), y dos del centro del país (estados de México y Morelos). Los cuerpos iniciales se mezclaron con un adyuvante comercial (trehalosa dicorinomicolato; S-TDCM® en aceite Drake01 6 VR®; Ribi ImmunoChem Research Inc., Hamilton Montana, EE.UU. Donado amablemente por el Dr. Terry Ulrich), y se inocularon 3 grupos de 5 animales cada uno; otros tres grupos

pareados sirvieron como testigos que recibieron solamente un placebo. Para el desafío, los animales de los grupos vacunados y testigos recibieron paralelamente una dosis de 1×10^8 eritrocitos infectados de una de las cepas usadas como inmunógeno experimental. Los resultados de este experimento aunque no fueron concluyentes, mostraron que la inmunización de animales susceptibles usando cuerpos iniciales, indujo inicialmente un retraso y menor intensidad en la presentación de los signos clínicos, lo que se traduce en protección específica contra dos de los aislados usados en la vacuna como sigue: los animales vacunados y confrontados con la cepa MEX-17, presentaron rickettsemias máximas de 5%, mientras que los animales testigos presentaron rickettsemias que variaron entre 10 y 20, de la misma forma, se observó una mayor pérdida en el volumen celular aglomerado (VCA) de los animales testigos (figura 2, panel inferior). Tres de los animales testigos tuvieron que ser tratados para evitar la muerte. Para esta cepa se determinó un 100% de protección. Al desafío de los animales con la cepa MEX-15, se observó que los signos clínicos fueron típicos en todos los animales testigos y todos ellos tuvieron que ser tratados, a pesar de lo cual murió uno de ellos. En el caso de los animales vacunados, todos los animales presentaron signos clínicos y dos de ellos se trataron para controlar la enfermedad, sin embargo uno de ellos murió. A pesar de esto, en los promedios observados para el VCA existieron diferencias significativas entre los vacunados y los testigos (figura 2). Por otro lado, la confrontación con la cepa MEX-31 no indujo el cuadro clínico en ninguno de los animales por lo que no se pudo comprobar la protección. Estos resultados corroboran experiencias reportadas en Venezuela (95, 96, 97), y sirvieron como base para determinar que bajo las condiciones usadas, la protección es posible usando cepas mexicanas.

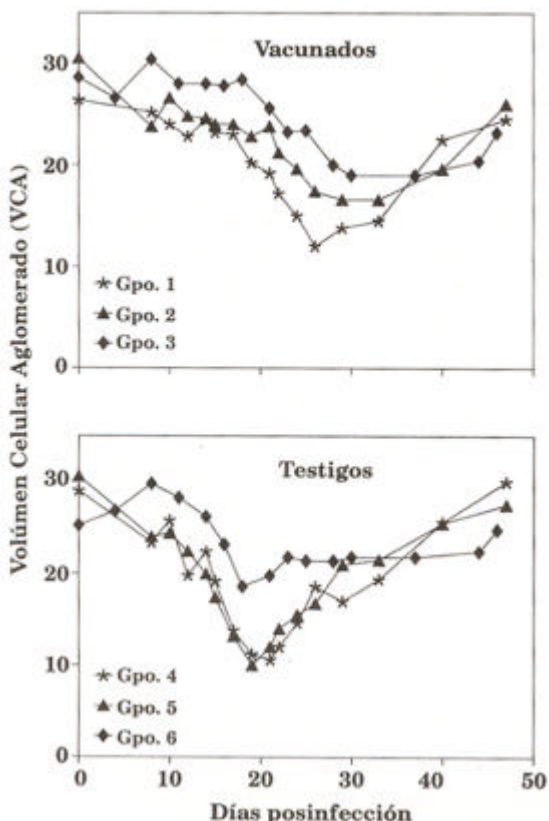


Fig. 2. Promedios por grupo del volumen celular aglomerado (VCA) de los animales vacunados y controles. Grupos 1 y 4 se desafiaron con cepa México; grupos 2 y 5 con cepa Morelos, grupos 3 y 6 con cepa Yucatán. El panel superior muestra los grupos vacunados con el inmunógeno experimental, el panel inferior muestra los grupos testigos.

En un experimento subsiguiente, se ensayaron dosis crecientes del inmunógeno para determinar si existía una dosis óptima que indujera una protección más sólida al desafío homólogo. Tres dosis crecientes con incrementos del 100% de cuerpos iniciales de cada aislado en cada una, mezclados con el mismo adyuvante, se inyectaron vía subcutánea a grupos de 5 animales, un grupo pareado

permaneció como testigos no vacunados. Los grupos vacunados recibieron el inmunógeno en un calendario semejante al anterior y todos los grupos se confrontaron con la cepa MEX-15. Los resultados de estos experimentos mostraron que excepto por un individuo, los animales vacunados con cualquiera de las dosis usadas, presentaron un cuadro sub-clínico que fue casi inadvertido ala confrontación con la cepa MEX-15. La figura 3A muestra la cinética del VCA donde se aprecia cómo, a pesar de que se presenta un decremento en este parámetro en los grupos vacunados, este decremento es de menor intensidad y estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al observado en el grupo testigo. Asimismo, es estadísticamente significativa ($p < 0.01$) la diferencia entre la rickettsemias (figura 3B) observadas para los grupos vacunados en los cuales el promedio mas alto fue menor al 5%, comparado contra una media superior al 25% para los testigos. De los animales vacunados sólo el que murió, presentó fiebre de 40° C por varios días, mientras que en los testigos todos presentaron fiebre y también un animal murió. Los resultados mostraron también que la vacuna es capaz de inducir anticuerpos específicos al ensayar los sueros de los animales contra antígeno de la cepa Mex-31. La inducción de estos anticuerpos fue detectable 10 días posteriores a la primera vacunación, con un incremento notable coincidente con la segunda vacunación, que alcanzó su máximo (D.O. 1) alrededor de los 40 días pos-vacunación, comenzando a disminuir alrededor del día 60 pos-vacunación para estabilizarse 20 días después en 0.4. Al desafío, se observa que estos anticuerpos tienen un incremento notable para el día 10 pos-desafío. La vacunación de estos animales no previene que los animales dejen de ganar peso durante el cuadro desarrollado por la confrontación, sin embargo si evita que la pérdida de éste sea significativa como se observa en la figura 3C. En este experimento, se observó que sin tomar en cuenta la muerte del animal del grupo II, los animales perdieron 12.8 ± 9.0 kg durante el periodo critico, comparado con los animales testigos que sufrieron una pérdida promedio de 35.3 ± 10.7 kg que fue estadísticamente diferente ($p < 0.01$) de la primera (94).

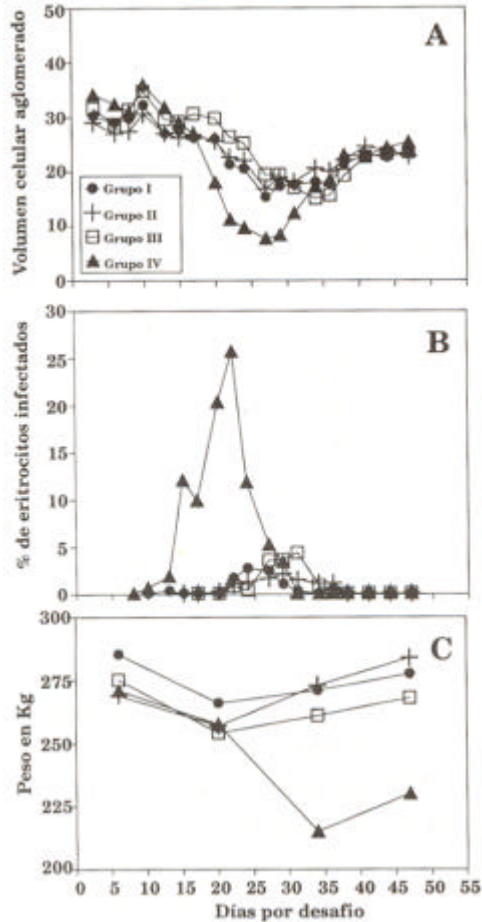


Fig. 3. Parámetros críticos pos-desafío. Bovinos vacunados con dosis crecientes con un inmunógeno inactivado de cuerpos iniciales de *A. marginale*, dosis baja (grupo I), media (grupo II), dosis alta (grupo III) y controles no vacunados (grupo IV). Los animales en todos los grupos se desafiaron con una dosis de 1×10^8 eritrocitos infectados de una rickettsemia ascendente de la cepa MEX-15. **A:** volumen celular aglomerado por grupo; **B:** porcentaje de eritrocitos infectados por grupo y **C:** peso en Kg por grupo.

5. Vacunas recombinantes

El enorme avance en el conocimiento de la respuesta inmune del bovino hacia esta rickettsia, el minucioso análisis de las proteínas de superficie de la rickettsia hasta ahora conocidas y el uso de preparados inactivados, han mostrado que es posible inducir protección en animales susceptibles, sin embargo no hay todavía una vacuna recombinante que induzca una protección sólida y de larga duración. Entre las proteínas de superficie ya caracterizadas, se mencionan como candidatos el complejo MSP1, proteína que varía entre aislados, aunque en si no presenta variación (mutación) durante los ciclos de rickettsemia en animales infectados o en garrapatas infectadas (102) y que además presenta mucha semejanza entre grupos geográficos de cepas de la rickettsia (103, 104). De este complejo MSP1a, se presenta como la mas importante porque posee epítomos de tipo Th1 que están presentes en la secuencia carboxi-terminal conservada en varios aislados (105), deseables en una vacuna recombinante, aunque la vacunación con esta proteína en forma de acido deoxirribonucleico, favorece preferiblemente una respuesta de tipo Th2 asociada a una repuesta de IgG1 (106). Un segundo candidato es la MSP2, que a pesar de ser altamente variable durante los ciclos de rickettsemia observados' en animales portadores (36, 38, 107), también posee varios epítomos tipo Th en secuencias conservadas en varios aislados de *A. marginale* y *A. centrale* (63, 71, 108, 109) y de la cual se ha contemplado solicitar una patente para la elaboración de una vacuna (Palmer, comunicación personal). Otras proteínas (MSP3 y MSP4 y MSP5) no han presentado gran potencial más alla de servir como elementos diagnósticos (47, 48, 50, 109). *Anaplasma marginale*, rickettsias y ehrlichias en general, representan entonces un reto para microbiólogos e inmunólogos por igual, en virtud de la gran capacidad que tienen para evadir el sistema

inmune de los bovinos y de los hospederos. Otras proteínas de superficie de la rickettsia que han estimulado la respuesta tipo Th1/IgG2 no han sido caracterizadas (71) o están en proceso de ser caracterizadas (Rodríguez, datos no publicados), además, el uso de IL-12 también favorece la inducción de una respuesta de este tipo (110), así todo esto indica que hacen falta estudios dirigidos a experimentar combinaciones de proteínas, las ya conocidas y otras por conocer, mezcladas con adyuvantes que estimulen preferiblemente una respuesta de tipo Th1/IgG2 con la consecuente secreción de IFN y TNF a.

V. Conclusiones

La anaplasmosis bovina es una infección intracelular. A la fecha se ha demostrado la participación de mecanismos que pertenecen a la inmunidad celular y humoral, que trabajan en forma coordinada y sus estímulos determinan el control de la infección. Durante la infección, intervienen varias proteínas de superficie de *Anaplasma marginale*. Es notoria la participación de los macrófagos como células fagocitarias y como células presentadoras de antígenos; asimismo, es muy importante la participación de los linfocitos cooperadores Th1 CD4+. Las principales citocinas que intervienen en la respuesta inmune son la interleucina-2, IFN γ , interleucina-1 y el TNF α . Por parte de las inmunoglobulinas, se ha asociado a la Ig G2 con la inmunoprotección, debido a la opsonización de los eritrocitos infectados y de los cuerpos iniciales libres de la rickettsia. El óxido nítrico posiblemente participa también como parte de un proceso patológico, al liberarse extracelularmente en el bazo. Existe un mayor número de factores que intervienen en la relación hospedero-parásito que en un futuro se esclarecerán. Las herramientas moleculares han ayudado a explicar todo este proceso y con mucha certidumbre se podrá contar algún día,

con una vacuna nativa o recombinante, sin embargo, a la fecha no se ha seleccionado la fracción idónea que confiera protección ante desafíos heterólogos, razón por la cual, para controlar en este momento la infección en animales susceptibles introducidos a zonas endémicas, es necesario el desarrollo de vacunas regionales, así como evaluar otras proteínas de superficie de la rickettsia.

Referencias

1. **Dumber, JS, Barbed, AF, Beaker, CP., Dash, GA, Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., and Rurangirwa, F.R.:** Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (Pt 6): 2145-65, 2001.
2. **Drancourt, M., and Raoult, D.:** Taxonomic position of the rickettsiae: current knowledge. *FEMS-Microbiol-Rev.* 13 (1): 13-24, 1994.
3. **Ristic, M.:** Anaplasmosis. In: *Bovine Medicine and Surgery* ed. by H.I. Amstutz, Am. Veterinary Publications, Inc. 2nd Ed. Vol. 1 Sta Barbara, Cal., pp 324-348, 1980.
4. **Ristic M., and Kreier J P.:** *Anaplasma*, In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. N.R. Kreig and J.B. Holt. (eds.) Vol. I Baltimore, William & Wilkins pp. 719-722, 1984.

5. **Osorno, B. M. and Ristic, M.:** Anaplasmosis bovina, con énfasis en control, diagnóstico, distribución de la enfermedad y uso de la vacuna atenuada de *A. marginale*. *Vet. Méx.* 8: 85-89, 1977.
6. **Lotze, J.e.:** Variables and constants in bovine anaplasmosis and their relationship to chemotherapy. *Am. J. Vet. Res.* 8:267-274, 1947.
7. **Sieber, H.:** Uber *Anaplasma marginale*. *Ber. Tieraztl. Wschr.* 50: 993-998, 1910.
8. **Theiler, A.:** The marginal points in the blood of cattle suffering from specific diseases. *Rep. Gov. Vet. Bact. Transv.* : 7, 1910.
9. **Ristic, M.:** Anaplasmosis, In: *Blood diseases of Man and animals*. Vol. 2, Weinmand., Ristic, M. (eds). Academic Press., Inc., New York, N.Y. pp474-537, 1968.
10. **Yeruham, I., and Braverman, Y.:** The transmission of *A. marginale* to cattle by blood-sucking arthropods. *Refuah. Vet.* 38 (1-2): 37-44, 1981.
11. **Potgieter, F.T., Kocan, K.M., McNew, R.W., and Ewing, S.A.:** Demonstration of colonies of *Anaplasma marginale* in the midgut of *Rhipicephalus simus*. *Am. J. Vet. Res.* 44 (12): 2256-2261, 1983.
12. **Zaugg, J.L., Stiller, D., Coan, M.E., and Lincoln, S.D.:** Transmission of *Anaplasma marginale* (Theiler) by males of *Dermacentor andersoni* (Stiles) fed on Idaho field-infected chronic carrier cow. *Am. J. Vet. Res.* 47: 2269-2271, 1986.
13. **Kocan, K.M., Holbert, D., Edwards, W., Ewing, S.A., Barron, S.J., and Hair, J.A.:** Longevity of colonies of *A. marginale* in

- midgut epithelial cells of *Dermacentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.* 47:1657-1661, 1986.
14. **Lotze, J.C.:** Carrier cattle as a source of infective material for horsefly transmission of anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 5: 164-165B, 1944.
 15. **Howell, D.E.:** Transmission of anaplasmosis by arthropods. In: *Proceedings 3rd National Research Conference on Anaplasmosis in Cattle*, Manhattan, Ks. pp14-16, 1957.
 16. **Delegación Mexicana.:** Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. *Bull. Off. Int. Epiz.* 93 (5-6): 903-905, 1981.
 17. **García, O., M. A., Ángeles, O., L. E., Hernández, S., G., García, T., D, Aboytes, T., R, Rodríguez, C., S. D.:** Caracterización de la virulencia de un aislado mexicano de *Anaplasma marginale*. *Tec. Pecu. Méx.* 36 (3):197-202,1998.
 18. **Álvarez, J.A.:** Generalidades sobre manejo de programas de Salud animal bajo condiciones de clima tropical. *Simposium sobre ganadería tropical. 20 Cicio de Conferencias sobre Bovinos de Doble Propósito.* Centro de Investigaciones Pecuarias Golfo-Centro, INIF AP-SARH, Veracruz, Ver. 1986.
 19. **Bock, R.E, de Vos, A.J.:** Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust. Vet. J.* 79 (12): 832-839,2001.
 20. **Otim, C., Wilson, A.J. and Campell, R.S.F.:** A comparative study of experimental anaplasmosis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Aust. Vet. J.* 56: 262-266, 1980.

21. **Fragoso, S. H.:** La anaplasmosis bovina en México. Garrapatas y enfermedades que transmiten. *Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal*. México, 1991.
22. **Cossio- Bayúgar, R., Rodríguez, S.D., García-Ortiz, M.A., García- Tapia, D. y Aboytes- Torres, R.:** Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, México. *Prev. Vet. Med.* 32 (3-4): 165-170, 1997.
23. **Aboytes, R., Buening, G. M., Figueroa, J. V. y Vega, C. A.:** El uso de sondas de AND para el diagnóstico de hemoparásitos. *Rvta. Cub. Cienc. Vet.* 22 (3): 173-181, 1991.
24. **Barbet, A. F.:** Recent developments in the molecular biology , of anaplasmosis. *Vet. Parasitol.* 57 (1-3): 43-49, 1995.
25. **Barbet, A.F., Palmer, G.H., Myler, P.J., and McGuire, T.C.:** Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infect. Immun.* 55 (10): 2428-2435, 1987.
26. **Viseshakul, N., Kamper, S., Bowie, M.V., and Barbet, A.F.:** Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. *Gene* 253 (1): 45-53, 2000.
27. **Palmer, G.H., Barbet, A.F., Musoke, A.J., Katende, J.M., Rurangirwa, F., Shkap, V., Pipano, E., Davis, W.C., McGuire, T.C.:** Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenya and the United States. *Int. J. Parasitol.* 18: 33-38, 1988.

28. **McGarey, D. J. and Allred, D.R.:** Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infect. Immun.* 62 (10): 4587-4593, 1994.
29. **McGarey, D.J., Barbet, A.F., Palmer, G.H., McGuire, T.C. and Allred, D.R.:** Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect. Immun.* 62 (10): 4594-4601, 1994.
30. **De la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.e., Blouin, E.F. and Kocan, K.M.:** Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1 b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *Int J Parasitol.* 31 (2): 145-53,2001.
31. **Barbet, A.F., Blentlinger, R., Vi, J., Lundgren, A.M., Blouin, E.F. and Kocan, K.M.:** Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick Cell culture, tick salivary glands, and cattle. *Infect. Immun.* 167 (1): 102-107, 1999.
32. **Tebele, N., McGuire, T.C. and Palmer, G.H.:** Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect. Immun.* 59 (9): 3199-3204, 1991.
33. **Murphy, C.I., Storey, J .R., Recchia, J., Doros- Richert, L.A., Gingrich-Baker, C., Munroe, K., Bakken, J .S., Coughlin, R. T. and Beltz, G.A.:** Major antigenic proteins of the agent of human granulocytic ehrlichiosis are encoded by members of a multi gene family. *Infect. Immun.* 6 (8): 3711-3718, 1998.
34. **Caspersen, K., Park, J.H., Patil, S., and Dumler, J.S.:** Genetic variability and stability of *Anaplasma phagocytophila* msp2 (p44). *Infect. Immun.* 70 (3): 1230-1234,2002.

35. **Ohashi, N., Zhi, N., Zhang, Y., Rikihisa, Y.:** Immunodominant Major Outer Membrane Proteins of *Ehrlichia chaffeensis* are encoded by a polymorphic multigene family. *Infect. Immun.* 66: 132-139, 1998.
36. **French, D. M., McElwain, T. F., McGuire, T. C. and Palmer, G. H.:** Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during cyclic rickettsemia. *Infect. Immun.* 66 (3): 12001207, 1998.
37. **Kieser, S. T., Eriks, I. S. and Palmer, G. H.:** Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect. Immun.* 58 (4): 1117-1119, 1990.
38. **Rurangirwa, F .R., Stiller, D., French, D.M.and Palmer, G .H.:** Restriction of major surface protein 2 (MSP2) variants during tick transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (6): 3171-3176,1999.
39. **Barbet, A.F., Yi, J., Lundgren, A.M., McEwen, B.R., Blouin, E.F. and Kocan, K.M.:** Antigenic variation of *Anaplasma marginale*: major surface protein 2 diversity during cyclic transmission between ticks and cattle. *Infect. Immun.* 69 (5): 3057-3066,2001.
40. **Alleman, A.R. and Barbet, A.F.:** Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen *J. Clin. Microbiol.* 34: 270-276, 1996.
41. **Alleman, A.R. Palmer, G.H., McGuire, T.C., McElwain, T.F., Perryman, L.E. and Barbet, A.F.:** *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multi gene family. *Infect. Immun.* 65 (1):156-63,1997.

42. **McGuire, T. C., W. C. Davis, A. L. Brassfield, T. F. McElwain, and G. H. Palmer.**: Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP-3. *J. Clin. Microbiol.* 29: 788-793, 1991.
43. **Oberle, S.M., Barbet, A.F.**: Derivation of the complete msp4 gene sequence of *Anaplasma marginale* without cloning. *Gene* 136: 291-294,1993.
44. **Oberle, S. M., Palmer, G. H. and Barbel, A. F.**: Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 61 (12): 5245-5251,1993.
45. **Visser, E. S., McGuire, T. C., Palmer, G. H., Davis, W. C., Shkap, V., Pipano, E. and Knowles, D. P.**: The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19 kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.* 60 (12): 5139-5144, 1992.
46. **Knowles, D., Torioni de Echaide, S., Palmer, G., McGuire, T., Stiller, D. and McElwain, T.**: Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J. Clin. Microb.* 34 (9): 2225-2230, 1996.
47. **Munodzana, D., McElwain, T. F., Knowles, D. P. and Palmer, G. H.**: Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface - exposed B-cell epitopes. *Infect. Immun.* 66 (6): 2619-2624, 1998.
48. **Reyna-Bello, A., Cloeckert, A., Vizcaino, N., Gonzatti, M.I., Aso, P.M., Dubray, G. and Zygmunt, M.S.**: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major

- surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5 (2): 259-262, 1998.
49. **Shkap, V., Bin, H., Ungar-Waron, H. and Pipano E.:** An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. *Vet. Microbiol.* 25: 45-53, 1990.
 50. **Torioni de Echaide, S., Knowles, D.P., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Suarez, C.E. and McElwain, T.F.:** Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J. Clin. Microbiol.* 36 (3): 777-82, 1998.
 51. **Jones, E. W., I. O. Kliever, B. B. Norman, and W. E. Brock.:** *Anaplasma marginale* infection in young and aged cattle. *Am. J. Vet. Res.* 29: 535-544, 1968.
 52. **Roby, T. O., D. W. Gates, and L. O. Mott.:** The comparative susceptibility of calves and adult cattle to bovine anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 22: 982-985, 1961.
 53. **Wyatt, C.R., Davis, W.c., Knowles D.P., Goff, W.L., Palmer, G.H. and McGuire, T.C.:** Effect on intraerythrocytic *Anaplasma marginale* of soluble factors from infected calf blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* 64 (11): 4846-4849, 1996.
 54. **Valdez, R.A., McGuire, T.C., Brown, W.C., Davis, W.C., Jordan, J.M. and Knowles, D.P.:** Selective *in vivo* depletion of CD4+ T lymphocytes with anti-CD4 monoclonal antibody during acute infection of calves with *Anaplasma marginale*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9 (2): 417-424, 2002.

55. **Goff, W.L., Johnson, W.C., Parish, S.M., Barrington, G.M., Tuo, W. and Valdez, R.A.:** The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunology* 23 (9), 463-471,2001.
56. **Parker, R.J., Shepherd, R.K., Trueman, K.F., Jones, G.W., Kent, A.S. and Polkinhorne, I.G.:** Susceptibility of *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. *Vet. Parasitol.* 17: 205-213, 1984/85.
57. **Bock, R.E., Kingston, T.G. and de Vos, A.J.:** Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Anaplasma marginale* transmitted by *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* 77: 748-751,1999.
58. **Kocan, K.M., Wickwire, K.B., Ewing, S.A., Hair, J .A. and Barron, S.J.:** Preliminary studies of the development of *Anaplasma marginale* in salivary glands of adult, feeding *Dermacentorandersoni* ticks. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1010-1013, 1988.
59. **De la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., McEwen, B.R., Clawson, D. and Kocan K.M.:** Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. *Int. J. Parasitol.* 31 (14): 1705-14,2001.
60. **Palmer, G. H., Rurangirwa, F. R., Kocan, K. M. and Brown, W. C.:** Molecular basis for vaccine development against the Ehrlichial Pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitology Today* 15 (7): 281-286, 1999.

61. **Stites, D.P., Terr, A.I. y Parslow, T.G.:** Inmunología básica y clínica. *El Manual Moderno*, 9a edición, México, D.F. 1998.
62. **Nemi, C.J.:** Schalm's Veterinary Hematology. *Lea & Febiger*, fourth edition. U.S.A. 1986.
63. **Brown, W. C., Shkap, V., Zhu, D., McGuire, T. C., Tuo, W., McElwain T.F. and Palmer, G. H.:** CD4+ T-Lymphocyte and Immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infec. Immun.* 66 (11): 5406-5413,1998.
64. **Weiss, A.:** T lymphocyte activation. In: *Fundamental Immunology*, Paul W. editor, Raven Press. pp. 467-504. 1993.
65. **Gale, K.R., Gartside, M.G., Dimmock, C.M., Zakrzewski, H. and Leatch, G.:** Peripheral blood lymphocyte proliferative responses in cattle infected with or vaccinated against *Anaplasma marginale*. *Parasitol. Res.* 82 (6): 551-562, 1996.
66. **Preston, P. M. and Jongejan, F.:** Protective immune mechanisms to ticks and tick-borne diseases of ruminants. *Parasitology Today* 15 (7): 255-258,1999.
67. **DeFranco, A.L.:** B lymphocyte activation. In: *Fundamental Immunology*, Paul W. editor, Raven Press. pp. 505-529, 1993.
68. **McGuire, T. C., Musoke, A. J. and Kurtti, T.:** Functional properties of bovine IgG 1 and IgG2: interactions with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology* 38: 249-256. 1979.
69. **McGuire, T.C. and Musoke, A.J.:** Biologic activities of bovine IgG subclasses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 137: 359-66,1981.

70. **Cantor, G. H., Pontzer, C. H. and Palmer, G. H.:** Opsonization of *Anaplasma marginale* mediated by bovine antibody against surface protein mspl. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37 (3-4): 343-350, 1993.
71. **Brown, W.C., Zhu, D., Shkap, V., McGuire, T.e., Blouin, E. F., Palmer, G.H. and Kocan, K.M.:** The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4+ T-Lymphocyte clones from protectively immunized cattle is diverse and includes Major Surface Protein 2 (MSP-2) and MSP-3. *Infect. Immun.* 66: 5414-5422, 1998.
72. **Fritsche, G., Larcher, C., Schennach, H. and Weiss, G.:** Regulatory interactions between iron and nitric oxide metabolism for immune defense against *Plasmodium falciparum* infection. *J. Infect. Dis.* 183 (9): 1388-94,2001.
73. **Stich, R. W., Shoda, L. K. M., Dreewes, M., Adler, B., Jungi, T. W. and Brown, W. C.:** Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. *Infect. Immun.* 66 (9): 4130-4136, 1998.
74. **Gale, K.R., Leatch, G., Dimmock, C.M. and Wood, P.R.:** *Anaplasma marginale*: effect of the treatment with an interferon - neutralizing monoclonal antibody or the nitric oxide synthetase inhibitor aminoguanidine on the course of infection. *Parasite Immunol.* 19: 411-417, 1997.
75. **Goff, W.L., Johnson, W.C., Parish, S.M., Barrington, G.M., Elsasser, T.H., Davis, W.C. and Valdez, R.A.:** IL4 and IL10 inhibition of IFN- γ and TNF α dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes

exposed to *Babesia bovis* merozoites. *Vet. Immunol. Immunoparasitol.* 84: 237-251, 2001.

76. **Eid, G., French, D. M., Lundgren, A. M., Barbet, A. F., McElwain, T. F. and Palmer, G. H.:** Expression of major surface protein 2 antigenic variants during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect. Immun.* 64: 836-841, 1996.
77. **French, D.M., Brown, W.C. and Palmer, G.H.:** Emergence of *Anaplasma marginale* Antigenic variants during persistent rickettsemia *Infect. Immun.* 67: 5834-5840, 1999.
78. **Gale, K.R., Leatch, G., Gartside, M. and Dimmock, C.M.:** *Anaplasma marginale*: failure of sera from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. *Parasitol. Res.* 78: 410-415, 1992.
79. **Rodríguez, S.D., García Ortiz, M.A, Aboytes Torres, R. y Cantó Alarcón G.J.:** Inmunoprofilaxis en Anaplasmosis Bovina En: *IV Volumen de Tópicos en Parasitología Veterinaria: Protozoarios.* Facultad de Ciencias Agropecuarias, S.D. Rodríguez, Cruz Vázquez C., Fernández Ruvalcaba M. pp. 57 - 69, 2002.
80. **Franklin, T.E. and Huff J.W.:** A proposed method of immunizing cattle with minimum inocula of *Anaplasma marginale*. *Res. Vet. Sci.* 8: 415-418, 1967.
81. **Mott, L.O.:** The nature of anaplasmosis. *Proc. 3rd Nat. Anaplasmosis Conf.* 1-9, 1957.
82. **Rogers, R.J., Dimmock, C.K., de-Vos, A.J., and Rodwell, B.J.T.I.:** Bovine leucosis virus contamination of a vaccine

produced *in vivo* against bovine babesiosis and anaplasmosis.

Aust. Vet. J. 65 (9): 285-287, 1988.

83. **Vizcaino, O., Corrier, D.E., Terry, M.K., Carson, C.A., Lee, A.J., Kuttler, K.L., Ristic, M. and Trevino G.S.:** Comparison of three methods of immunization against bovine anaplasmosis: evaluation of protection afforded against field challenge exposure. *Am. J. Vet. Res.* 41 (7): 1066, 1980.
84. **Henry, E.T., Norman, B.B., Fly, D. E., Wichmann, R.W. and York, S. M.:** Effects and use of a modified live *Anaplasma marginale* vaccine in beef heifers in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183 (1): 66-69, 1983.
85. **Zaraza, H. and Kuttler, K.L.:** Comparative efficacy of different immunization systems against anaplasmosis. *Trap. Anim. Hlth. Prod.* 3: 77-82, 1971.
86. **Pipano, E.:** Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trap. Anim. Hlth. Prod.* 29 (4 Suppl): 86S-90S, 1997.
87. **Kuttler, 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.
88. **Pipano, E., Mayer, E. and Frank, M.:** Comparative response of Friesian milking cows and calves to *Anaplasma centrale* vaccine. *Br. Vet. J.* 141: 174-178, 1985.
89. **CONASA:** Experiencias sobre el uso de vacunas contra *Anaplasma marginale*. *Memorias de la IV Reunión Anual.* 1417 de nov. México D.F. pp. 79-81, 1995.

90. **Pipano., E., Krigel, Y., Frank, M., Markovics, A. and Mayer E.:** Frozen *Anaplasma centrale* vaccine against anaplasmosis in cattle. *Br. Vet. J.* 142 (6): 553-6, 1986.
91. **McHardy, N. and Simpson, R. M.:** Attempts at immunizing cattle against anaplasmosis using killed vaccine. *Trap. Anim. Hlth. Prod.* 5: 166-173, 1973.
92. **Dennis, R.A., O'Hara, P.J., Young, M.F. and Dorris, K.D.:** Neonatal immunohemolytic anemia and icterus of calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 156 (12):1861-1869,1970.
93. **Dimmock, C.K. and Bell, K.:** Hemolytic disease of the newborn in calves. *Aust. Vet. J.* 46: 44, 1970.
94. **Rodríguez, C., S. D., García, O., M. A., Cantó, A., G. J., Hernández S., G, Santos, C., N. y Aboytes T., R.:** Ensayo de un inmunógeno experimental inactivado contra *Anaplasma marginale*. *Téc. Pec. Méx.* 37: 1-12,1999.
95. **Montenegro, S., James, M.A., Benitez, M. T., Leon, E., Baek, B.K. and Guillen, A.T.:** Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as vaccine against anaplasmosis. *Parasitol. Res.* 77: 93-101, 1991.
96. **Hart, L.T., Todd, W.J., Luther, D.G., Hoyt, P.G., Morris, N. G., McDonough, K.C. and Hoyt M. J.:** Progress toward an improved vaccine for anaplasmosis. *Louisiana Agriculture* 31: 3-6, 1987.
97. **Luther, D.G., Hart, L.T., Todd, W.J., Morris, N.G., Taylor, N.D. and McRae, J.W.:** Field study of an experimental Anaplasmosis vaccine on pregnant cows and neonatal

isoerythrolysis. *Proceedings: Eight National Veterinary Hemoparasite Disease Conference*. pp. 559-562, 1989.

98. **Figueroa Millán, J.V., Cantó Alarcón, G.J., Ramos Aragón, J.A., Rojas Ramírez, E.E., Santiago Valencia, C., Granjeno Colin, G., García Ortiz, M.A. and Parrodi, E:** Evaluación en condiciones de campo de la vacuna inactivada de *Anaplasma marginale* denominada Plazvax. *Vet. Méx.* 30 (3): 221-225,1999.
99. **García, O. M. A., Ángeles, O. L. E., Hernández, S. G., García, T. D., Aboytes, T. R., Rodríguez, C., S. D.:** Caracterización de la virulencia de un aislado mexicano de *Anaplasma marginale*. *Tec. Pecu. Méx.* 36 (3): 197-202, 1998.
100. **García, O. M. A., Aboytes, T. R., Hernández, S. G., Cantó, A. J.G., Rodríguez, S. D.:** *Anaplasma marginale*: Diferentes grados de virulencia en dos aislados mexicanos. *Veterinaria México.* 31 (2): 157-160,2000.
101. **Palmer, G. H. and McGuire, T. C.:** Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J. Immun.* 133 (2): 1010-1015,1984.
102. **Bowie, M.V., de la Fuente, J., Kocan, K.M., Blouin, E.F. and Barbet, A.F.:** Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. *Gene* 282 (1-2): 95-102, 2002.
103. **De La Fuente, J., García-García, J.C., Blouin, E.F., Rodríguez, S.D., García, M.A., and Kocan, K.M.:** Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Anim. Health Res. Rev.* 2 (2): 163-73,2001.

104. **De la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., Kocan, K.M.:** Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Vet. Parasitol.* 97 (1): 65-76,2001.
105. **Brown, W.C., Palmer, G.H., Lewin, H.A. and McGuire, T.C.:** CD4(+) T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. *Infect. Immun.* 69 (11): 6853-62,2001.
106. **Arulkanthan, A., Brown, W.e., McGuire, T.C. and Knowles, D.P.:** Biased Immunoglobulin G 1 response induced in cattle with DNA expressing *msp 1a* of *Anaplasma marginale*. *Inf. Immunity.* 67: 3481-3487, 1999.
107. **Palmer, G.H., Brown, W.C., Rurangirwa, F.R.:** Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes Infect.* 2 (2):167-76, 2000.
108. **Brown, W.C., McGuire, T.C., Zhu, D., Lewin, H.A., Sosnow, J. and Palmer GH.:** Highly Conserved regions of the immunodominant Major Surface Protein 2 of the Genogroup II ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* are rich in naturally derived CD4(+) T lymphocyte epitopes that elicit strong recall responses. *J. Immunol.* 166 (2): 1114-1124, 2001.
109. **Shkap, V., Molad, T., Brayton, K.A., Brown, W.C. and Palmer, G.H.:** Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccinates. *Infect. Immun.* 70 (2): 642-8, 2002.

110. **Tuo, W., Palmer, G.H., McGuire, T.e., Zhu, D. and Brown, W.C.:** Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 68 (1): 270-280, 2000.