

Eficacia de dos vacunas, congelada y refrigerada, contra la tristeza parasitaria bovina

Efficacy of frozen and refrigerated vaccines against bovine tick fever

Cecilia Miraballes^{1,2*}, Stephanie Lara³, Eduardo Lorenzelli⁴, Ernesto Lemos², Franklin Riet-Correa^{1,2}

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Plataforma de Salud Animal. Ruta 5 Km 386, CP 45000, Tacuarembó, Uruguay.

²Programa de Posgrado en Salud Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

³PDU Instituto Superior de la Carne, Universidad de la República- Sede Tacuarembó, Uruguay.

⁴Laboratorio BioSur. Polo Tecnológico, Canelones, Uruguay.

*Autor para correspondencia: cmiraballes@inia.org.uy

Veterinaria (Montevideo) Volumen 54
Nº 209 - 2 (2018) 9-13

DOI: 10.29155/VET.54.209.2

Recibido: 23/12/2017

Aceptado: 10/03/2018

Resumen

La babesiosis y la anaplasmosis, son endémicas en Uruguay y producen pérdidas económicas de aproximadamente 14 millones de dólares anuales. Para prevenir estas enfermedades existen vacunas disponibles comercialmente en forma refrigerada o congelada. A pesar de la disponibilidad de vacunas, la cobertura de vacunación es muy baja. Las causas del bajo número de vacunas utilizadas pueden ser varias: falta de información por parte de los productores y veterinarios; dificultades en el manejo y conservación de las vacunas; y costos por dosis y aplicación. Con el objetivo de comparar la eficacia de la vacuna refrigerada con la congelada contra *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* fue realizado un ensayo en un establecimiento comercial ubicado en el departamento de Tacuarembó, donde 57 terneras raza Brangus fueron vacunadas con la vacuna refrigerada y 58 con la vacuna congelada. Para determinar la eficacia de ambas vacunas se realizaron las pruebas de inmunofluorescencia indirecta para *B. bovis* y *B. bigemina* y aglutinación en tarjeta para *Anaplasma* spp. al día 62 postvacunación. No existieron diferencias significativas entre la protección ofrecida por ambas vacunas ($p > 0,05$), encontrándose entre el 93% y 98,3% de los animales positivos para cada uno de los tres agentes. Este trabajo demuestra que ambas vacunas son eficientes para la profilaxis de la enfermedad y deben ser utilizadas para la protección de bovinos en áreas de inestabilidad enzoótica. Es necesario continuar con las tareas de extensión para aumentar la cobertura de vacunación a nivel nacional e investigar posibles fallas en la vacunación.

Palabras claves: Vacunas, Tristeza Parasitaria, Eficacia

Summary

Babesiosis and anaplasmosis, are endemic in Uruguay and produce economic losses of approximately 14 million dollars per year. To prevent these diseases, refrigerated or frozen vaccines are commercially available. Despite the availability of vaccines, vaccination coverage is very low probably due to several causes: the lack of information of farmers and veterinarians; difficulties in the management and conservation of the vaccines; and costs per dose and application. In order to compare the efficacy of the refrigerated vaccine with a frozen vaccine against *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* we conducted a trial in a commercial farm located in the department of Tacuarembó. Fifty-seven Brangus calves were vaccinated with the refrigerated vaccine and 58 with the frozen vaccine. The indirect immunofluorescence tests for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* and the card test for *Anaplasma* spp. were performed to determine the efficacy of both vaccines at day 62 post vaccination. There were no significant differences between the protection offered by both vaccines ($p > 0.05$), being between 93% and 98.3% of the animals positive for each of the three agents. These results show that both vaccines are efficient for the prophylaxis of the disease and should be used for the protection of bovines in areas of enzootic instability. It is necessary to continue with the extension tasks to increase the national coverage of vaccinated animals and to investigate possible vaccine failure.

Key words: Vaccination, Tick fever, Efficacy

Introducción

Las enfermedades transmitidas por la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, babesiosis, causadas por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, y anaplasmosis causada por *Anaplasma marginale*, son endémicas en Uruguay (Solari, 2006). Aunque la babesiosis es ocasionada por protozoarios y la anaplasmosis por una rickettsia, causan signos clínicos semejantes, formando parte de un complejo denominado tristeza parasitaria bovina (Rubino, 1946). Tanto *B. bovis* y *B. bigemina* son transmitidas únicamente por *R. microplus*, mientras que *A. marginale* puede ser transmitida tanto por este parásito como por vía iatrogénica y por otros vectores (tábanos) (Alonso y col., 1992; Hornok y col., 2008). En Uruguay, generalmente, los brotes de babesiosis y/o anaplasmosis no ocurren cuando más del 80% de los bovinos presentan anticuerpos por haber sido infectados durante los primeros 10 meses de vida. Esta situación es definida como de estabilidad enzoótica, la cual se logra cuando existe una elevada tasa de transmisión del parásito entre el vector y el hospedero. Cuando la tasa de inoculación no es lo suficientemente elevada para asegurar una transmisión continua, se encuentran anticuerpos en el 20% a 79% de los bovinos pudiendo ocurrir brotes, situación que se define como de inestabilidad enzoótica. Cuando menos del 20% de los bovinos tienen anticuerpos se considera que el rodeo está en estabilidad enzoótica y no ocurren brotes (Solari y col., 2013). Los brotes afectan principalmente a los bovinos adultos, causando elevadas pérdidas económicas, estimadas en 14 millones de dólares anuales, ocasionadas por costos de tratamientos, pérdidas de peso y muertes (Solari y col., 2013). Aunque la aparición de los brotes depende directamente de la edad en que el animal es infectado por primera vez, es importante considerar que el manejo, el estado nutricional del hospedero, la presencia de enfermedades intercurrentes y las condiciones del medio ambiente pueden contribuir a la ocurrencia de tristeza parasitaria (Guglielmo, 1995; Bock y de Vos, 2001).

La forma más adecuada de prevenir la tristeza parasitaria es erradicar la garrapata de los establecimientos y, en el caso de anaplasmosis, evitar también la transmisión iatrogénica (Suárez y Noh, 2011). Sin embargo, la erradicación del vector muchas veces es inviable y los tratamientos quimioterápicos para la tristeza parasitaria por sí solos no evitan las pérdidas productivas causadas por esta enfermedad (Guglielmo, 1995). En estas condiciones, la única alternativa disponible para prevenir brotes de tristeza parasitaria, en establecimientos con inestabilidad enzoótica, es el uso de la vacuna con organismos vivos atenuados de *Babesia* spp. y con *Anaplasma centrale* (heterólogo de *A. marginale*), que proveen inmunidad durante toda la vida de los bovinos (Solari y Quintana, 1994; Bock y de Vos, 2001). Además de Uruguay, estas vacunas han sido utilizadas también en Sudáfrica, Brasil, Israel y Argentina (de Castro, 1997; Bock y de Vos, 2001).

La División de Laboratorios Veterinarios Miguel C. Rubino (DILAVE) ha producido esta vacuna desde 1941 y la continúa pro-

duciendo (Rubino, 1946). En 1996, el Laboratorio BioSur inició la producción de otra vacuna refrigerada y una vacuna congelada (Biosur, 2017). Actualmente están disponibles en el mercado la vacuna refrigerada de DILAVE y la vacuna congelada de BioSur, ambas producidas en terneros esplenectomizados. A pesar de la disponibilidad de vacunas, la cobertura de vacunación es muy baja. En la actualidad hay aproximadamente dos millones de terneros en el área de control de garrapata (DICOSE-SNIG, 2017). Sin embargo, hasta 2008 se vendían en promedio 10.000 dosis anuales de la vacuna refrigerada y entre 2008 y 2016, con la presencia de una vacuna congelada en el mercado, el número aumentó a 22.000 dosis anuales aproximadamente (Miraballes y Riet-Correa, 2018). Las causas del bajo número de vacunas utilizadas pueden ser varias: falta de información por parte de los productores y veterinarios; dificultades en el manejo y conservación; y costos por dosis y aplicación. Hay productores que relatan casos o brotes de tristeza en animales vacunados, por lo que es necesario determinar si las posibles fallas de vacunación son debidas a errores en la conservación y aplicación de vacuna, al estado inadecuado de los animales después de vacunados por estrés, problemas nutricionales o enfermedades concomitantes o a fallas de eficiencia de las vacunas. Por otro lado, no hay publicaciones sobre la eficiencia comparada de las dos vacunas disponibles en nuestro país contra tristeza parasitaria. El objetivo de este ensayo experimental fue comparar la eficacia de la vacuna refrigerada con la vacuna congelada contra *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* en Uruguay.

Materiales y métodos

El experimento fue realizado en un establecimiento comercial ubicado en la localidad de Cañas, en el departamento de Tacuarembó, Uruguay. Este establecimiento se caracteriza por convivir con la garrapata *R. microplus*, controlándola mediante el uso de tratamiento generacional (Cuore y col., 2012). Se realizó la aplicación de ivermectina al 3.15% en todo el rodeo el 01/08/2017, tratamiento correspondiente a la primera generación de garrapatas. Para la realización de este ensayo fueron utilizadas 115 terneras hembras de 10 meses de edad de raza Brangus. Al día 0 (16/8/2017) se separaron de forma aleatoria las 115 terneras en 2 grupos. En ese mismo día se tomaron muestras de sangre de 30 terneras de cada grupo para realizar serología de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*. Las muestras de sangre fueron extraídas de la vena coxígea con tubos vacutainer, sin anticoagulante, utilizando una aguja por animal.

El Grupo 1 (VR), con 57 terneras, fue vacunado con la vacuna refrigerada producida por DILAVE. El Grupo 2 (VC), con 58 terneras, fue vacunado con la vacuna congelada producida por el laboratorio BioSur. La aplicación de ambas vacunas se realizó siguiendo las recomendaciones de los fabricantes (Solari y Quintana, 1994; BioSur, 2017).

Al día 62 post vacunación (18/10/2017) se procedió nuevamente a la toma de muestras de sangre de las 115 terneras para medir la protección inducida por ambos tipos de vacunas mediante se-

rología.

Los procedimientos de extracción de sangre de los animales participantes del ensayo fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).

Para el análisis serológico se realizaron las técnicas de aglutinación en tarjeta para la detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. e inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* y *B. bigemina* (IICA, 1987). Se determinó cada suero problema como positivo para *A. marginale* cuando se observaban conglomerados macromoleculares visibles directamente, confrontados con un control positivo y un control negativo (Solari, 2006). Como criterio de positividad para la IFI se consideró cada suero problema como positivo cuando se observaba fluorescencia evidente sobre los glóbulos rojos parasitados, en el título de 1/25 para *B. bigemina* y 1/50 para *B. bovis*, confrontados con un control positivo y un control negativo para cada hemoparásito en el mismo título de positividad previamente definido (Ríos-Osorio y col., 2010).

Durante los 45 días posteriores a la vacunación, los animales fueron observados diariamente por el productor para constatar evidencias de signos clínicos: decaimiento, separación del rodeo, presencia de orina con sangre, agresividad o cualquier otra indicación de enfermedad. En el caso de la presencia de alguno de estos signos el productor debía tomar la temperatura rectal y tratar los animales con aceturato de diminazeno a la dosis de 1,2 mg/kg de peso vivo.

Para determinar si existían diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos grupos se realizó una prueba exacta de Fisher al día 0 y otra al día 62 (STATA, 2015).

Resultados

En ambos grupos ningún bovino manifestó signos clínicos por lo que no fue necesario registrar la temperatura ni realizar el tratamiento de los mismos durante el período de 45 días de observación.

Como se puede observar en el Cuadro 1 ambas vacunas confirieron inmunidad igual o mayor al 93% para los tres hemoparásitos, no observándose diferencias significativas entre las mismas.

Discusión

Este trabajo demuestra que ambas vacunas son eficientes para la profilaxis de la tristeza parasitaria y pueden ser utilizadas para la protección de bovinos en áreas de inestabilidad enzoótica. Uruguay está ubicado en un área marginal para el desarrollo de *R. microplus*, lo que lleva a que la mayoría de los establecimientos ubicados en la zona de control se encuentren en inestabilidad enzoótica debido a la tasa irregular de infestaciones, a menos que el establecimiento sea libre de garrapatas (Solari y col., 2013). En este caso, es necesario la adopción o mantención de estrictas medidas de bioseguridad para evitar la introducción del parásito. Otra alternativa viable para la prevención de la tristeza parasitaria podría ser controlar las poblaciones de garrapatas hasta mantener baja la tasa de inoculación, de forma tal que menos del 20% de los animales presenten anticuerpos (Nari, 1995). Si se decide por esta opción, hay que tener en cuenta que cualquier factor que pueda llevar a un aumento en la población de garrapatas (fallas de tratamientos por resistencia, factores climáticos, o que no se consiga tratar la totalidad del rodeo) puede llevar a brotes por hemoparásitos, con alta morbilidad y mortalidad. En establecimientos que por tener alta carga de *R. microplus* se encuentren en estabilidad enzoótica y el productor decida aplicar medidas de control para bajar esta carga, es recomendable comenzar con un plan de vacunación (Callow y col., 1997). Es conveniente determinar si el rodeo se encuentra en estabilidad o inestabilidad enzoótica previo a la vacunación mediante la realización de las técnicas serológicas (Solari, 2006). Ha sido demostrado que existen diferencias significativas en la ganancia de peso entre animales naturalmente infectados y libres de hemoparásitos, por lo que incluso en casos de establecimientos con estabilidad enzoótica la vacunación de los terneros puede ser económicamente rentable (Solari y col., 1992).

A pesar de que se ha comprobado que una sola dosis de esta vacuna induce inmunidad eficiente que dura toda la vida productiva de los animales (Bock y De Vos, 2001), pueden existir fallas en la vacunación debidas a problemas de inmunogenicidad de la vacuna, insuficiente respuesta inmunitaria de los animales o a variaciones en el genotipo de las cepas de campo en relación con las cepas vacinales (Bock y de Vos, 2001; Palmer y McElwain, 1995). En Uruguay no se han investigado las posibles fallas de

Cuadro 1. Número y porcentaje de bovinos con anticuerpos para *B. bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma* spp. al día 0 y 62 postvacunación

Día	Grupo	n	<i>B. bovis</i>	p	<i>B. bigemina</i>	p	<i>Anaplasma</i> spp.	p
0	1(VR)*	30	3 (10%)	0.500	8 (26,7%)	0.139	9 (30%)	0.105
	2(VC)*	30	2 (6,7%)		13 (43,3%)		4 (13,3%)	
62	1(VR)	57	56 (98,2%)	0.748	53 (93%)	0.331	55 (96,5%)	0.348
	2(VC)	58	57 (98,3%)		56 (96,5%)		54 (93,1%)	

vacunación, ni las variaciones genóticas de *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. Ambos aspectos deberán ser estudiados en el caso de que se registren sospechas de tristeza parasitaria en animales vacunados.

Para el uso correcto de ambas vacunas es necesario que los veterinarios responsables de la vacunación cumplan con las recomendaciones de manejo y conservación, teniendo en cuenta que las vacunas refrigeradas deben ser aplicadas hasta 72 hs después del envío, manteniéndolas en todo momento refrigeradas (Solari y Quintana, 1994). En el caso de la vacuna congelada se debe conservar en nitrógeno líquido y descongelar en baño maría entre 37 °C y 38 °C teniendo en cuenta que una vez descongelada, la validez de uso es por 6 hs, debiendo mantenerse refrigerada durante la inoculación y no se pueden volver a congelar (BioSur, 2017). El mayor problema para la aplicación de la vacuna congelada por parte de los veterinarios es el manejo en nitrógeno líquido. Actualmente, los comercios veterinarios que venden esta vacuna ofrecen el servicio de vender la vacuna ya preparada para aplicar. También algunas veterinarias alquilan los termos con nitrógeno líquido para facilitar la adopción de esta medida de prevención por parte de los veterinarios. Es importante considerar que la vacuna debe ser empleada en invierno, cuando las poblaciones de garrapatas son bajas, o utilizando potreros seguros, para no ocurra una sobreinfección por cepas de campo antes del día 60 (Solari y Quintana, 1994).

Sin duda que la baja cobertura de vacunación es una de las principales causas de las altas pérdidas económicas causadas por la tristeza parasitaria en el Uruguay. Una tarea fundamental para controlar estas pérdidas es aumentar la tasa de vacunación, continuando con las tareas de extensión iniciadas recientemente por la Comisión interinstitucional de extensión para el control de la garrapata y tristeza parasitaria (IICA, 2017). A modo de ejemplo, en Australia, con una población similar de bovinos en el área enzoótica (7 millones), se comercializan 800.000 dosis anuales (Bock y de Vos, 2001). Como ambas vacunas son producidas en animales esplenectomizados sería conveniente comenzar a producir estas vacunas en cultivos celulares como forma de evitar posibles transmisiones de otras enfermedades y considerar el bienestar animal (Callow y col., 1997).

Conclusiones

Se concluye que las vacunas para tristeza parasitaria disponibles en Uruguay son eficaces e inocuas en terneros y que es necesario ampliar la cobertura de vacunación en el área enzoótica para disminuir las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad. En casos de que ocurran fallas en la vacunación, es necesario investigar las causas.

Agradecimientos

Al propietario del establecimiento por ceder los animales y el predio para realizar este ensayo experimental. Ensayo financiado por INIA proyecto “Determinación de la situación actual de la garrapata *Rhipicephalus microplus* y de la tristeza parasitaria y control integrado de ambas enfermedades”.

Bibliografía

1. Alonso M, Arellano-Sota C, Cereser VH, Cordoves CO, Guglielmone AA, Kessler R, Mangold AJ, Nari A, Patarroyo JH, Solari MA, Vega CA, Vizcano O, Camus E. (1992). Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 11: 713-713.
2. BioSur (2017). Manejo de la vacuna HemoVac C en ganado adulto. Disponible en: <https://www.biosur.com.uy/material-informativo>
3. Bock RE, de Vos AJ. (2001). Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust Vet J* 79: 832-839.
4. Callow LL, Dalgiesht RJ, De Vos AJ. (1997). Development of effective living vaccines against bovine babesiosis - The longest field trial? *Int J Parasitol* 27(7):747-767.
5. Cuore U, Altuna M, Cicero L, Fernández F, Luengo L, Mendoza R, Nari A, Pérez Rama R, Solari MA, Trelles A. (2012). Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48:5-13.
6. de Castro JJ. (1997). Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet Parasitol* 71:77-97.
7. DICOSE-SNIG (2017). Datos abiertos basados en la Declaración jurada anual de existencias. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/institucional/datos-abiertos/xml/2017>.
8. Guglielmone AA. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol* 57: 109-119.
9. Hornok S, Földvári G, Elek V, Naranjo V, Farkas R, de la Fuente J. (2008). Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 154: 354-359.
10. IICA. (1987). Técnicas para el diagnóstico de Babesiosis y Anaplasmosis bovina. Comité de expertos sobre hema-

- tozoarios del área Sur del IICA. San José, Costa Rica. pp. 1-79.
11. IICA. (2017). Inicia la campaña de otoño contra la garrapata y la tristeza parasitaria: La Comisión interinstitucional aprueba el Plan de Acción de este período. Disponible en: <http://www.iica.int/es/prensa/noticias/inicia-la-campa%C3%B1a-de-oto%C3%B1o-contra-la-garrapata-y-la-tristeza-parasitaria>
 12. Miraballes C, Riet-Correa F. (2018). One century of research and control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and tick fever in Uruguay. *Vet Parasitol Reg Stud Rep* (en prensa).
 13. Nari A. (1995). Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet Parasitol* 57: 153-165.
 14. Palmer GH, McElwain TF. (1995). Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet Parasitol* 57: 233-253.
 15. Ríos-Osorio LA, Zapata-Salas R, Reyes J, Mejía J, Baena, A. (2010). Estabilidad enzoótica de babesiosis bovina en la región de Puerto Berrío, Colombia. *Revista Científica* 20:485-492.
 16. Rubino MC. (1946). Garrapata – tristeza – premunición. En: Rubino MC. *Compilación de trabajos científicos del Dr. Miguel C. Rubino*. Montevideo, Uruguay, Ed. Imp. Uruguaya, pp. 113- 131.
 17. Solari MA, Nari A, Cardozo H. (1992). Impact of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* on the production of beef cattle in Uruguay. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*: 143-149.
 18. Solari MA, Quintana S. (1994). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (*Babesia* sp. y *Anaplasma*) en el Uruguay. En: Nari A, Fiel C. *Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos: Bases epidemiológicas para su prevención y control*. Montevideo, Uruguay, Ed. Hemisferio Sur, pp. 497-506.
 19. Solari MA. (2006). Epidemiología y perspectivas en el control de hemoparásitos. En: XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, CMVP, pp. 36-40.
 20. Solari MA, Dutra F, Quintana S. (2013). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en el Uruguay. En: Fiel C, Nari A. *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control*. Montevideo, Uruguay, Ed. Hemisferio Sur pp. 657-688.
 21. STATA (2015). *Stata Statistical Software: Release 14*. Stata Corp LP, College Station, TX.
 22. Suárez CE, Noh S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet Parasitol* 180: 109-125.