



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CONCENTRACION DE GLOBULOS ROJOS CON
ANAPLASMA MARGINALE EN DILUCIONES DE
CLORURO DE SODIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

CARLOS FERNANDO CORREA BUCIO

ASESORES: M. V. Z. RAMON MEZA BELTRAN

M. V. Z. HECTOR QUIROZ ROMERO

M. V. Z. RICARDO NAVARRO FIERRO

MEXICO, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

RESUMEN.	
INTRODUCCION.	1
MATERIAL Y METODOS.	4
RESULTADOS.	6
DISCUSION.	14
CONCLUSIONES.	16
BIBLIOGRAFIA.	21

RESUMEN:

CONCENTRACION DE GLOBULOS ROJOS CON Anaplasma marginale EN DILUCIONES DE CLORURO DE SODIO.

Carlos Fernando Correa Bucio

Asesores:

M.V.Z. Ramón Meza Beltrán

M.V.Z. Héctor Quiróz Romero

M.V.Z. Ricardo Navarro F.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Parasitología así como en la Sección de Infecciosas del Departamento de Producción Animal de Rumiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Con el objeto de determinar el grado de concentración de glóbulos rojos parasitados con Anaplasma marginale en diluciones de cloruro de sodio, se utilizó sangre de tres becerros esplenectomizados e inoculados con Anaplasma marginale con diferente grado de parasitemia.

Se colectaron muestras de sangre de cada becerro a los 21, 22 y 23 días de la inoculación, las que fueron sometidas a diferentes diluciones de cloruro de sodio con un rango de 0.00 a 1.00 g/100 ml.

Se mezclaron y centrifugación, el sedimento se resuspendió en 1 ml. de solución salina fisiológica, se hicieron frotis teñidos con Giemsa para cuantificar la proporción de glóbulos rojos parasitados.

La mayor concentración de glóbulos rojos parasitados se obtuvo en la solución 0.75 g/100 ml.

La diferencia observada con respecto a la concentración en los frotis realizados con sangre completa resultó significativa al utilizar la prueba T de Dunnett.

INTRODUCCION

Uno de los problemas con que se enfrenta el estudio inmunológico de las diferentes enfermedades, es el de no poder contar con la concentración adecuada de antígeno. El caso de la anaplasmosis no es una excepción.

Los porcentajes de parasitemia en esta enfermedad bajo condiciones experimentales generalmente se mantienen, entre 1.5 a 3%. En algunos casos se puede elevar hasta 20% o más (1,5,7), excepcionalmente llega al 50% de eritrocitos afectados.

En algunas infecciones de campo por Rickettsias, donde el porcentaje de parasitemia es inferior al 2%, como en el caso de Anaplasma marginale (6,7) resulta difícil el diagnóstico. Por lo que se ha intentado aumentar la concentración por pasajes seguidos en animales esplenectomizados (5); sin embargo, para la realización de esto hay que contar con varios becerros, cosa a veces difícil, y en ocasiones se expone a los animales a la muerte antes de la elevación de la parasitemia, con las consiguientes pérdidas económicas.

Algunos autores han logrado, con diferentes diluciones en solución salina, concentrar bebesias, logrando el mayor incremento con la solución 0.47 g/100 ml para el caso de Babesia bigemina (2) y con la solución 0.42 g/100 ml para Babesia argentina (2). En 1975 se logró un pequeño incremento en la concentración de 0.75% para Babesia divergens (4).

Se menciona lo referente a Babesia, porque se supone que el comportamiento es similar al de Anaplasma; no se encontraron trabajos en los que se intente concentrar Anaplasma; por lo que creemos importante el tratar de efectuar la concentración de Anaplasma marginale utilizando soluciones de cloruro de sodio.

JUSTIFICACION

Se considera la utilidad de poder concentrar los eritrocitos parasitados con Anaplasma marginale en muestras de sangre, con el fin de poder diagnosticar parasitemias muy bajas, lo que contribuiría a resolver el grave problema que presenta esta enfermedad en México.

HIPOTESIS

La concentración por centrifugación de glóbulos rojos parasitados con Anaplasma marginale ocurre en mayor grado al diluir la sangre en determinadas soluciones de cloruro de sodio.

OBJETIVO

Determinar entre 21 soluciones de cloruro de sodio en un rango de 0.0 a 1.0 g/100 ml, cuál da la mayor concentración de glóbulos rojos parasitados con Anaplasma marginale.

MATERIAL Y METODOS

Se esplenectomizaron tres becerros Holstein machos a los ocho días de nacidos por el personal de Cirugía del Departamento de Clínica de Grandes Especies. 23 días después se inocularon con una dosis de 3 ml de sangre infectada con Anaplasma marginale y congelada en nitrógeno líquido, con un 0.5% de parasitemia.

Los animales se mantuvieron alojados en la sección de Infecciosas del Departamento de Producción Animal de Rumiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de la U.N.A.M. y alimentados con paja de avena y agua Ad libitum.

Se les tomó una muestra de 10 ml de sangre a los 21, 22 y 23 días postinoculación. Cada muestra se dividió en 22 partes, una para analizarla como sangre completa y 21 para hacer una mezcla de una parte de sangre y 9 de cada una de las diluciones de cloruro de sodio en un rango de 0.00 a 1.0 g/100 ml, con incrementos de 0.05 g.

Las 21 partes diluidas se dejaron reposar 10 minutos a temperatura del laboratorio, posteriormente se centrifugaron a 600 de gravedad durante 10 minutos, el sobrenadante se retiró y el sedi-

mento se resuspendió en 1 ml de solución salina-fisiológica.

En todas las fracciones de cada muestra se realizaron frotis delgados fijados con alcohol metílico durante 3 minutos y teñidos con Giemsa por 35 minutos.

Utilizando el microscopio óptico y con el objetivo de inmersión (100 X) se contaron los glóbulos rojos en diez campos diferentes de cada frotis - en una estimación de 100 por cada uno; la parasitemia se determinó aproximadamente con un total de 1000 eritrocitos.

RESULTADOS

En los frotis estudiados con las diluciones de cloruro de sodio entre 0.00 y 0.55 g/100 ml, hubo lisis en todos los glóbulos rojos, encontrándose algunos parásitos libres.

En el becerro 1, el primer día de muestreo las parasitemias aparecen a partir de 0.70 g/100 ml, alcanzando en 0.75 la mayor proporción de glóbulos rojos parasitados. Para el segundo y tercer día las parasitemias manifiestan desde 0.60 logrando igualmente en 0.75 la mayor concentración como se muestre en el Cuadro 1 y en la Figura No. 1

Para los becerros 2 y 3, en la primera muestra, la parasitemia se observa a partir de 0.65 g/100 ml, siendo en 0.75 donde se concentra el mayor número de glóbulos rojos parasitados. El segundo y tercer día las parasitemias se detectan en 0.60 repitiéndose la situación de que en 0.75 se alcanza la mayor concentración, como se aprecia en Cuadros y Figuras 2 y 3. El resultado para cada tratamiento, en promedio para los 3 días se graficó en la Figura 4.

Los datos obtenidos se examinaron mediante un --
Análisis de Varianza de Parcelas Divididas con --
el siguiente modelo:

$$X_{ijk} = M + \alpha_i + \beta_j + \alpha_{ij} + \gamma_k + (\beta\gamma)_{jk} +$$

$$(\alpha\gamma)_{ik} + E_{ijk}$$

Los subíndices varían de:

$i = 1, 2, 3$ becerros

$j = 1, 2, 3$ muestras

$k = 1, \dots, 10$ diluciones.

donde:

M	=	Media general
α_i	=	Efecto del i -ésimo becerro
β_j	=	Efecto del j -ésimo días post--- inoculación
α_{ij}	=	Efecto de interacción del i -ési-- mo becerro y del j -ésimo día.
$(\beta\gamma)_{jk}$	=	Efecto de interacción del j -ésimo día y el k -ésimo tratamiento.
$(\alpha\gamma)_{ik}$	=	Efecto de interacción del i -ésimo becerro y el k -ésimo tratamiento.
E_{ijk}	=	Error aleatorio para cada observa- ción.

Para la realización del análisis, los datos fueron reparametrizados mediante la siguiente función:

$$X'_{ijk} = \arcseno \sqrt{X_{ijk}}$$

Donde:

X_{ijk} = cada observación, expresada en fracción de uno.

X'_{ijk} = cada observación reparametrizada.

Se encontraron diferencias altamente significativas entre los días en que se tomaron las muestras, en los tratamientos y en la interacción día/tratamiento, como lo indica el Cuadro No. 4.

Se realizó la prueba T de Dunnett, para comparación con un testigo, considerándose la sangre sin diluir como control. Se encontró que la proporción de eritrocitos en la dilución de 0.75 g/100 ml de cloruro de sodio es superior a la del control, siendo la diferencia altamente significativa. Los resultados de la prueba se anotan en el Cuadro No. 5.

CUADRO No. 1

PORCENTAJE DE PARASITEMIA POR Anaplasma marginale EN EL BECERRO No. 1

Soluciones de Na Cl	P A R A S I T E M I A		
	Días post-inoculación Por el %		
	21	22	23
Sangre completa	0.4	0.8	4.5
1.00 g/100 ml.	0.0	0.0	0.2
0.95 " "	0.0	0.0	0.1
0.90 " "	0.0	0.0	0.5
0.85 " "	0.2	0.4	2.5
0.80 " "	0.1	0.3	2.8
0.75 " "	0.8	1.5	6.0
0.70 " "	0.2	0.3	2.0
0.65 " "	0.0	0.2	1.0
0.60 " "	0.0	0.1	0.5

CUADRO No.2

PORCENTAJE DE PARASITEMIA POR Anaplasma marginale EN EL BECERRO No.2

Soluciones de Na Cl	P A R A S I T E M I A		
	Días post-inoculación Por el %		
	21	22	23
Sangre completa	0.5	3.0	6.0
1.00 g/100 ml	0.0	0.0	0.3
0.95 " "	0.0	0.0	0.5
0.90 " "	0.0	0.1	0.6
0.85 " "	0.3	1.5	3.0
0.80 " "	0.2	2.3	3.5
0.75 " "	1.0	2.5	8.0
0.70 " "	0.2	1.5	3.0
0.65 " "	0.1	0.8	2.5
0.60 " "	0.0	0.1	0.8

CUADRO No.3

PORCENTAJE DE PARASITEMIA POR Anaplasma marginale
EN EL BECERRO No. 3

Soluciones de Na Cl	P A R A S I T E M I A		
	Días post-inoculación		
	Por el %		
	21	22	23
Sangre completa	0.5	3.0	6.0
1.00 g/100 ml.	0.0	0.0	0.3
0.95 " "	0.0	0.1	0.5
0.90 " "	0.0	0.5	1.2
0.85 " "	0.3	2.0	3.8
0.80 " "	0.2	2.8	4.0
0.75 " "	1.0	5.0	9.5
0.70 " "	0.3	1.8	4.0
0.65 " "	0.1	1.0	3.0
0.60 " "	0.0	0.2	1.0

CUADRO No.4

ANALISIS DE VARIANZA DE LAS PROPORCIONES DE ERI-
TROCITOS PARASITADOS CON Anaplasma marginale, **
USANDO LOS DATOS REPARAMETRIZADOS

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO CALCULADA.	F
B	2	0.025	0.0125	
D	2	0.2	0.1	40**
ERROR D	4	0.01	0.0025	
TOTAL	8	0.235		
T	9	0.248	0.2756	114.83**
TxD	18	0.029	0.0016	6.67**
ERROR T	54	0.013	0.00024	
B x T x D	36	0.007		
BxT	18	0.006		
TOTAL	89	0.525		

Donde: B - Becerros
D - Soluciones usadas en la dilu-
ción.

** - La diferencia es altamente sig-
nificativa.

CUADRO No. 5

PRUEBA T DE DUNNETT, PARA COMPARACION CON UN TESTIGO

$$T_{9,54}, \alpha = 3.138$$

$$T \sqrt{\frac{CME}{ra}} = 3.138 \quad \sqrt{\frac{.00024}{(3)(3)}} = .0162 \quad (\alpha = .01)$$

DIA 21
MEDIA

DIA 22
MEDIA

Sangre			Sangre		
Completa	0.0683		Completa	0.1460	
Tratamiento		Significancia	Tratamiento		Significancia
1.00	0.0000	*	1.00	0.0000	*
0.95	0.0000	*	0.95	0.0333	*
0.90	0.0000	*	0.90	0.0343	*
0.85	0.0517	*	0.85	0.1093	*
0.80	0.0407	*	0.80	0.1250	*
0.75	0.0967	**	0.75	0.1693	**
0.70	0.0483	*	0.70	0.1043	*
0.65	0.0213	*	0.65	0.0783	*
0.60	0.0000	*	0.60	0.0363	*

* Significativo $\alpha = .05$

** Altamente significativo ($\alpha .01$)

CUADRO No. 5

TEST, PARA COMPARACION CON UN TESTIGO

$$T_{9,54, \alpha} = 3.138$$

$$\sqrt{\frac{.00024}{(3)(3)}} = .0162 \quad (\alpha = .01)$$

DIA 22			DIA 23		
MEDIA			MEDIA		
gre			Sangre		
Completa	0.1460		Completa	0.2360	
tratamiento		Significancia	tratamiento		Significancia
1.00	0.0000	*	1.00	0.0517	*
0.95	0.0333	*	0.95	0.0580	*
0.90	0.0343	*	0.90	0.0863	*
0.85	0.1093	*	0.85	0.1763	*
0.80	0.1250	*	0.80	0.1857	*
0.75	0.1693	**	0.75	0.02823	**
0.70	0.1043	*	0.70	0.1723	*
0.65	0.0783	*	0.65	0.1443	*
0.60	0.0363	*	0.60	0.0870	*

01)

DISCUSION

No se pudo encontrar en la literatura mundial -- trabajos relacionados en la concentración de Anaplasma sp por este método, por lo que se reco--- mienda seguir trabajando con otros métodos, como es el de diluciones de glicerina o el de cultivo in vitro del Anaplasma marginale.

El volver a resuspender el sedimento en solución salina fisiológica altera los glóbulos rojos así como la tinción, siendo preferible resuspender en otros medios, como pudiera ser plasma del mismo animal.

El análisis de Varianza con los datos reparametrizados indica que hay diferencias significativas ($\alpha = 0.01$) entre el día en que se tomó la muestra, el tratamiento y la interacción día/tratamiento.

En la dilución 0.75 g/100 ml se observó la mayor concentración de glóbulos rojos parasitados, la Prueba T de Dunnett demostró que la diferencia es significativa ($\alpha = 0.01$) con respecto a la sangre completa en todos los días.

Comparando los resultados con el trabajo de Meza (4), se puede ver la similitud de comportamiento entre Babesia sp Anaplasma sp.

CONCLUSIONES

En 0.75 g/100 ml de las soluciones de cloruro de sodio, fué en donde se logró la mayor concentración de glóbulos rojos con Anaplasma siendo la diferencia altamente significativa con respecto a la sangre completa.

De 0.00 a 0.55 g/100 ml se lisaron todos los glóbulos rojos, encontrándose algunos parásitos libres.

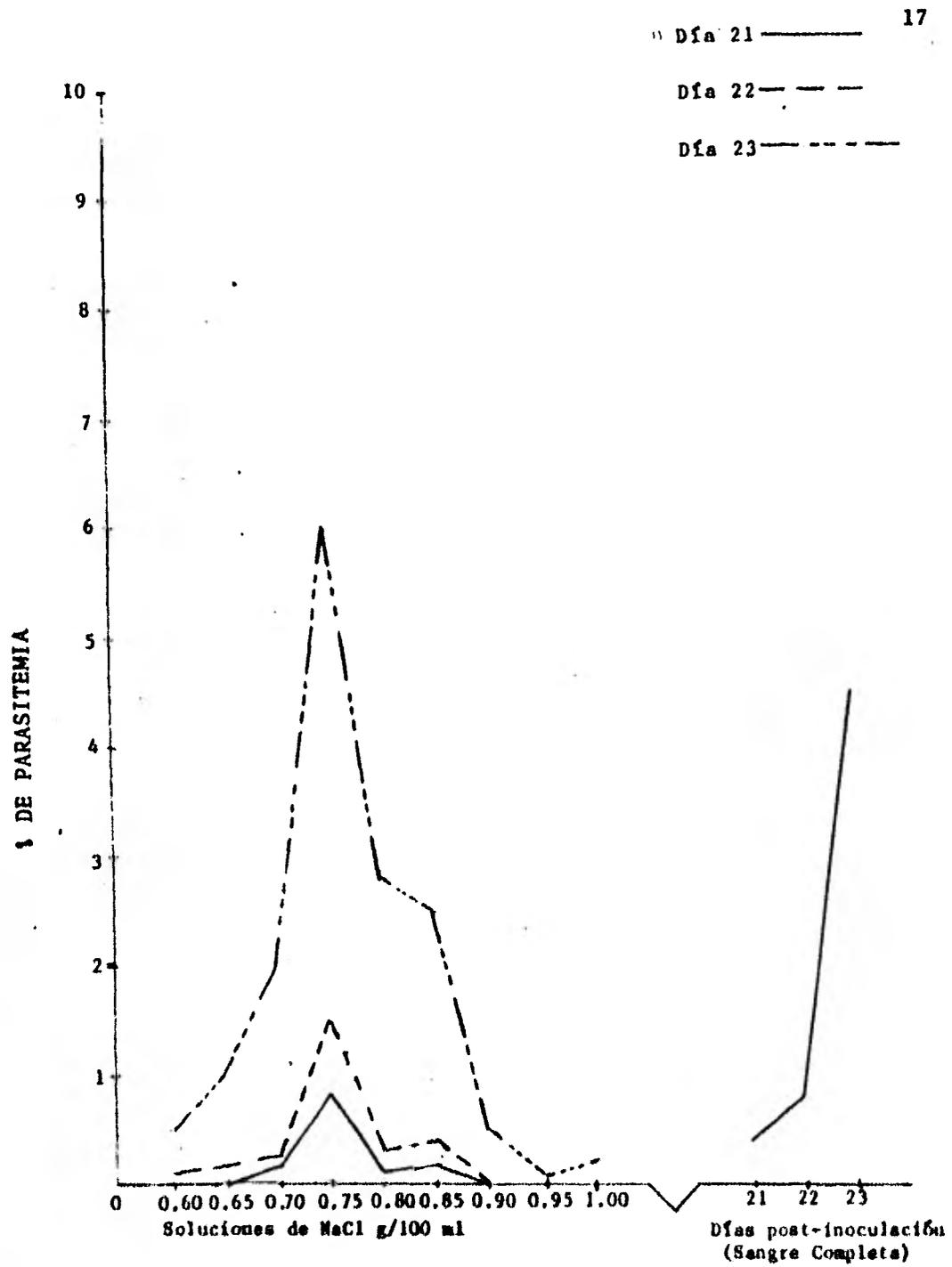


Fig. 1. PARASITEMIA DEL BECERRO 1

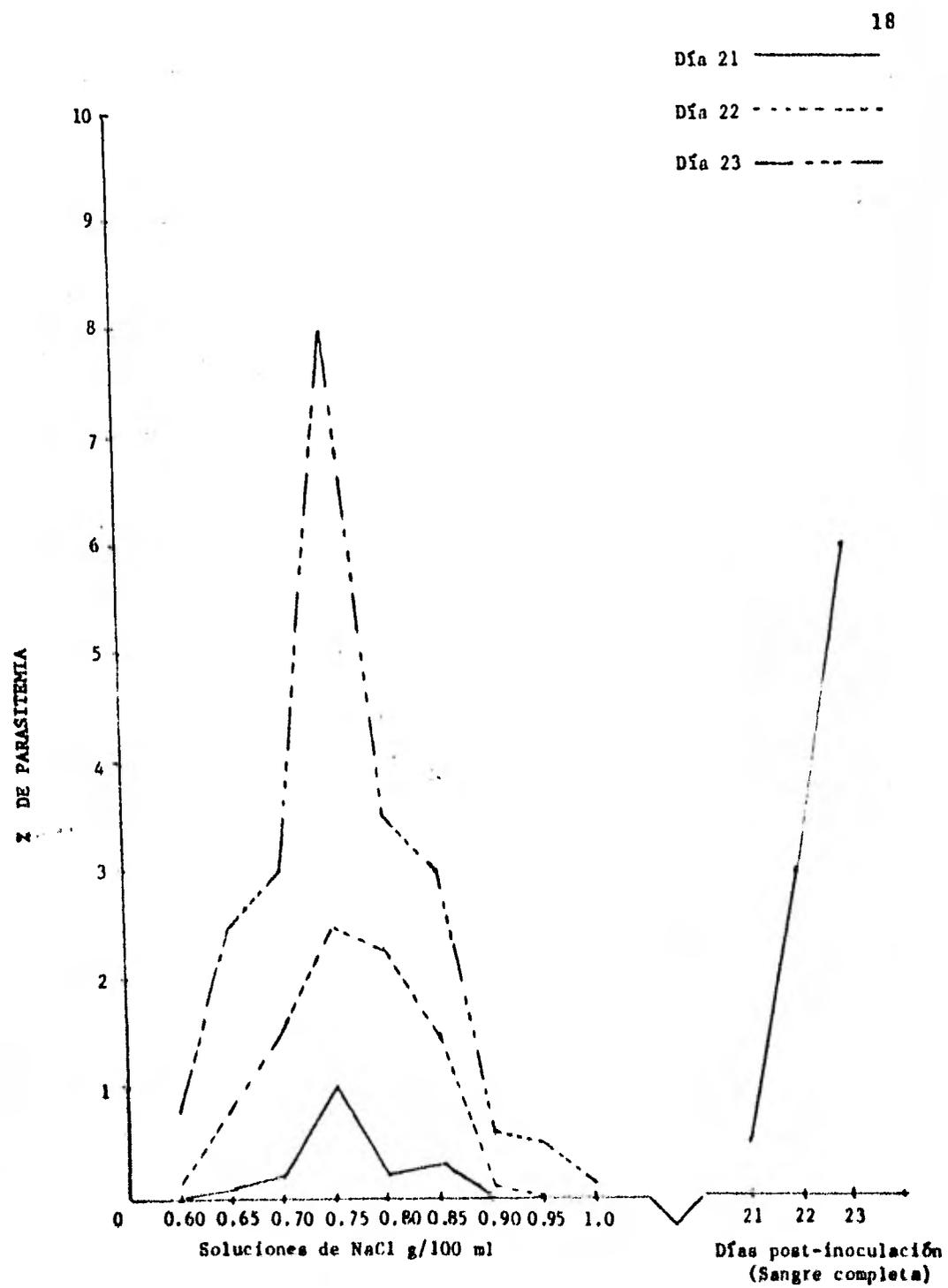


Fig. 2. PARASITEMIA DEL BECERRO 2

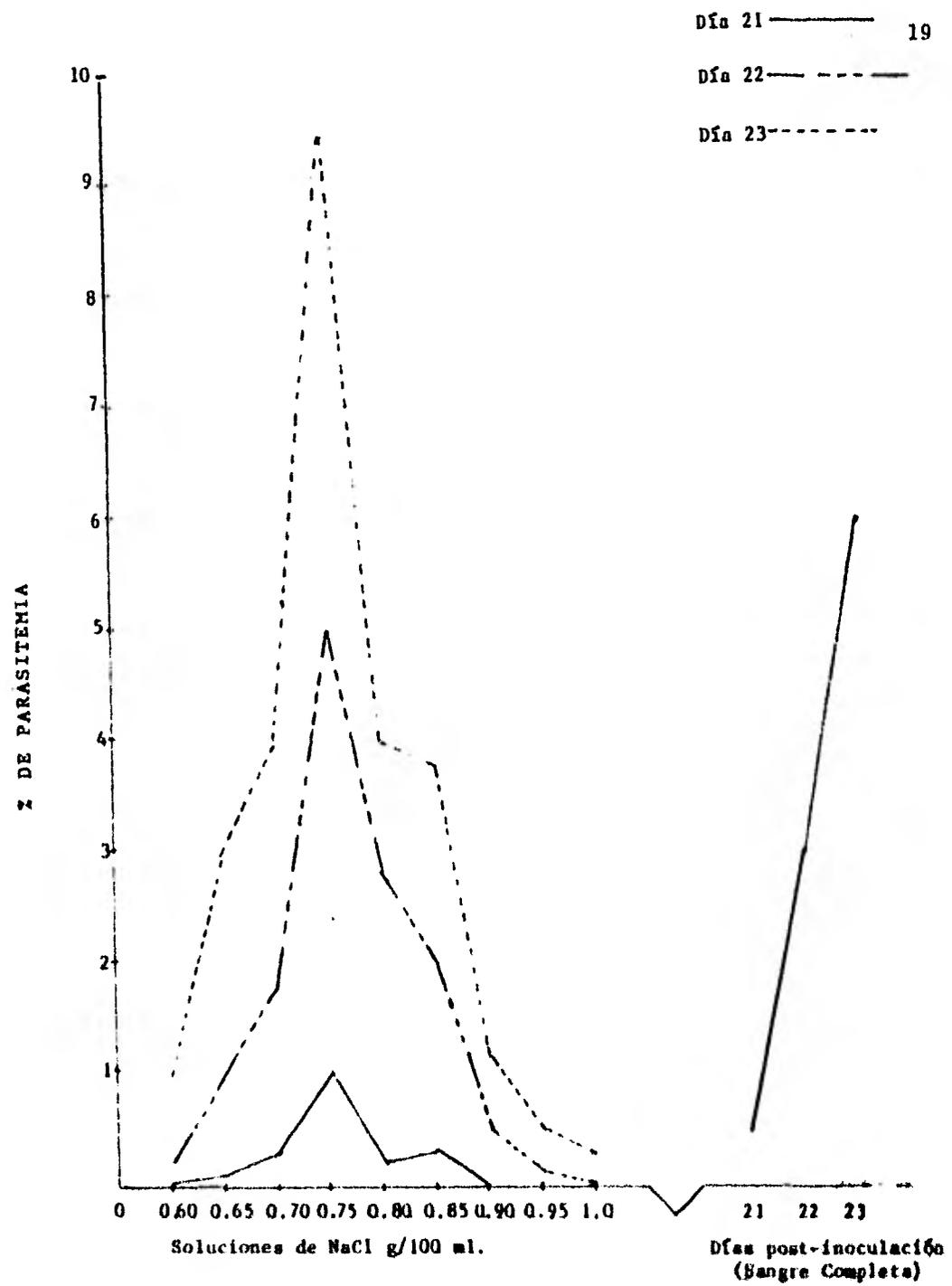


Fig. 3. PARASITEMIA DEL BECERRO 3

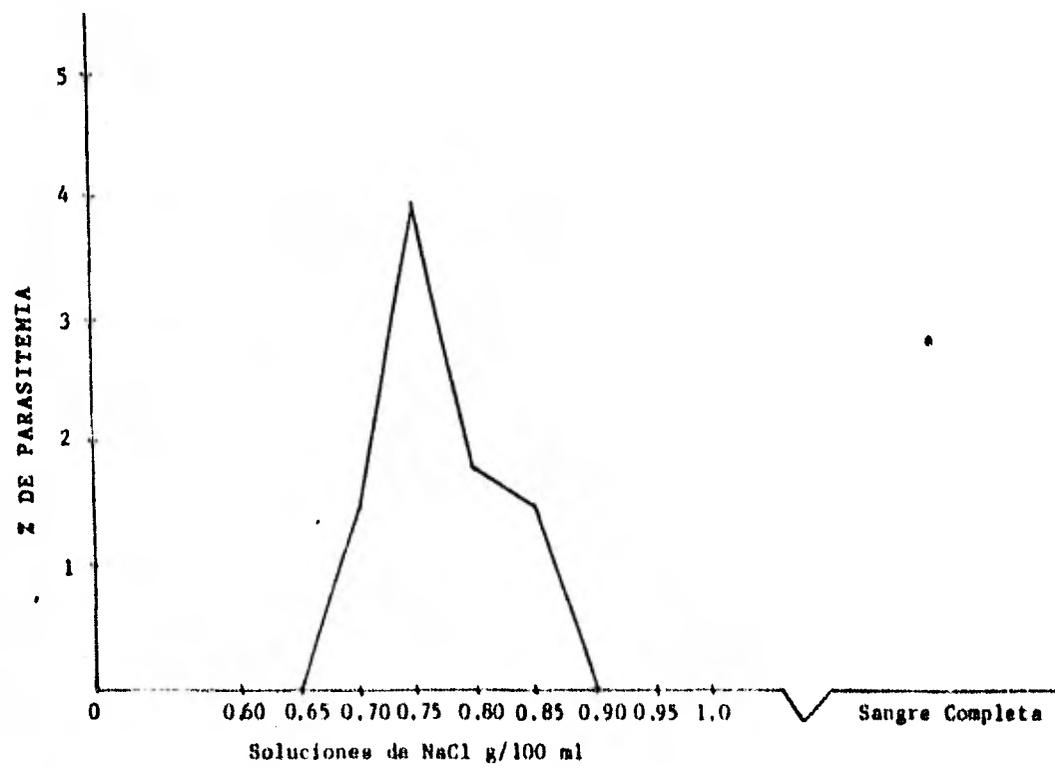


Fig. 4. PROMEDIO DE PARASITEMIA PARA LOS TRATAMIENTOS

BIBLIOGRAFIA

1. Carsons, C.A. and Sells, D.M. and Ristic, M.: Cell mediated immune response to virulent and attenuated Anaplasma marginale administered - to cattle in live and inactivated forms. Am.J. Vet. Res. 38 (2): 1167-1172 (1977).
2. Mahoney, D.F. Bovine Babesiosis: Diagnosis of infection by complement fixation test. Aust.-Vet. J., 38: 48-52 (1962).
3. Mahoney, D.F. Bovine Babesiosis: Preparation_ and assessment of complement fixing antigens. Exp. Parasitol: 20: 232-241, (1967).
4. Meza, B.R. The isolation and study of a bovine strain of Babesiosis. Tesis de grado M.V.Sc; University of Liverpool, (1975).
5. Osorno, B.M. and Solana, M.P. and Ristic, M. Study of an Attenuated A. marginale Vaccine - IN México: I. Challenge of Immunity by a Virulent Endemic Anaplasma Strain. Reprint from - Proceedings of the sixth national Anaplasmosis Conf., Las Vegas, Nev., March 1973. 113-116.

6. Pesqueira, T.I. y Meza, B.R. Fragilidad Osmótica en Eritrocitos de Bobinos Infeccionados con Anaplasma marginale y Babesia bovis. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1980.

7. Ristic, M. and Nyindo, M.B.A. Mechanisms of Immune response to an attenuated Anaplasma marginale vaccine. Proceedings of the Sixth National Anaplasmosis Conf. Las Vegas, Nev. --- March 1973.