

ATENUACION DE UNA CEPA DE *BABESIA ARGENTINA*
(*B. BOVIS*) DE ORIGEN COLOMBIANO*

E.F. González, DVM., MS**; R.A. Todorovic, DVM, PhD; G. López, DVM, MS;
O. García, DVM.

RESUMEN

Una cepa de *Babesia argentina* (*B. bovis*), aislada en Montería, Colombia, en el año de 1971 fué atenuada por pasajes continuos en terneros esplenectomizados. La atenuación empezó a observarse a partir del pasaje No. 23. Un estudio estadístico comparativo hecho en un grupo de 50 novillos inoculados con 10^{10} parásitos de *B. argentina* mostró resultados comparativos significativos entre grupos de animales inoculados con una cepa virulenta (pasaje No. 6), una cepa atenuada (pasaje No. 27) y un grupo control no inoculado. De los 20 animales inoculados con la cepa virulenta 19 mostraron síntomas clínicos de babesiosis aguda y 9 animales murieron entre los días 11 a 14 post inoculación (P.I.). Ninguno de los 30 animales del grupo inoculado con la cepa atenuada mostró síntomas clínicos de la enfermedad. Se observó únicamente ligera disminución del hematocrito al día 14 PI (6.50/o) y leve aumento de la temperatura al día PI (+ 3.2°C). Las implicaciones de la utilización de esta cepa para el control y la prevención de la babesiosis bovina son discutidas.

* Contribución del Instituto de Medicina Veterinaria Tropical (ITVM), Universidad de Texas A&M, College Station, Texas 77843, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Apartado Aéreo 67-13, Cali, Colombia y el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

Este trabajo fué realizado con la ayuda de la Agencia Internacional para el Desarrollo AID.

INTRODUCCION

La babesiosis bovina es una de las enfermedades de mayor importancia de las ganaderías situadas en el trópico, donde existe su vector la garrapata *Boophilus microplus* (1). En Colombia se han reportado dos tipos de *Babesia* que afectan al ganado; la *Babesia bigemina* y la *Babesia argentina* o *Babesia bovis* (2, 7, 10, 18).

La distribución de estos dos tipos de *Babesia* en Colombia se ha determinado

** Apdo. Aéreo 277 Palmira

por estudios epidemiológicos hechos en varias regiones del país (6, 8). En las zonas endémicas prevalece la *B. bigemina* sobre *B. argentina*, la razón que explique este fenómeno no está muy claro todavía ya que los dos organismos son transmitidos por el mismo vector, aunque en diferentes estados de su desarrollo (11, 12). Algunos trabajos de campo realizados en el Valle del Cauca han mostrado que la *B. argentina* parece ser responsable de un mayor número de casos clínicos que la *B. bigemina* (8). Esto está en relación con las prevalencias ya reportadas, pues en el caso de los hemoparásitos la incidencia está inversamente relacionada con la prevalencia, es decir a menor prevalencia mayor número de casos clínicos.

La *B. argentina* por ser transmitida en la fase larvaria de la garrapata *B. microplus*, es responsable del mayor número de muertes de animales movilizados de zonas libres de la enfermedad a zonas endémicas (8). En estas condiciones la infección suele aparecer en la segunda semana después de la movilización y la muerte se presenta en el transcurso de unos días. Los animales que se recuperan de la infección por *B. argentina*, por lo general, no sufren una infección severa con *B. bigemina*.

La prevención de la enfermedad en Colombia y en Latinoamérica se ha venido practicando con los sistemas tradicionales de premunición y quimioterapia (15, 17, 18). Se han hecho ensayos con vacunas liofilizadas utilizando parásitos muertos o suero de animales recuperados, con resultados muy inconsistentes (16). Otro sistema que se ha ensayado experimentalmente es el de las dosis mínimas infectivas (9).

En Australia, donde la Babesiosis bovina representa un serio escollo al desarrollo de la ganadería, se logró atenuar una cepa de *B. argentina* por pasajes continuos en terneros esplenectomizados (13). Esta cepa está siendo utilizada en la actualidad para la vacunación masiva del ganado susceptible (5). En este trabajo se presentan los resultados del comportamiento de una cepa de *B. argentina* de origen colombiano, atenuada también por pasajes continuos en terneros esplenectomizados.

MATERIALES Y METODOS

Animales Experimentales. Todos los animales utilizados para los pasajes y comparación de patogenicidad fueron obtenidos de zonas libres de hemoparásitos y garrapatas, (Sábana de Bogotá, altitud 2.600 metros y Puracé Cauca, altitud 3.000 metros). Para los pasajes se utilizaron 28 terneros Holstein Friesian con edades entre 6 a 12 meses. Estos terneros fueron esplenectomizados por lo menos dos meses antes de ser infectados con *B. argentina*. Para los estudios de patogenicidad se utilizaron 60 novillos intactos razas Holstein x Normando con edades promedio de 18 meses. Durante la realización del ensayo los animales fueron mantenidos en unidades de aislamiento del CIAT localizadas en Palmira (altitud 1.024 metros) y alimentados con concentrado comercial.

Aislamiento y conservación de las cepas. El primer aislamiento de la cepa de *B. argentina* se hizo en Montería (altitud 24 metros) colocando un ternero esplenectomizado en un potrero infectado con garrapatas *Boophilus microplus*. La sangre infectada se recolectó en EDTA al

100/o y se preservó con Glycerol al 11.60/o a 60°C. Hasta el pasaje 11 se utilizó Glycerol como preservativo y temperaturas entre 20°C a 60°C para almacenamiento de las cepas; pero a partir de este pasaje se utilizó una solución 4 Molar de Dimetil sulfoxido (4M-DMSO) mezclada a partes iguales con sangre de acuerdo al método descrito anteriormente por uno de los autores (9). La conservación de las cepas a partir de este pasaje se hizo utilizando nitrógeno líquido (-196°C).

Inoculación de animales. Para la purificación y atenuación de la cepa se utilizó sangre completa o estabilizado en cantidades variables según se describe en la Tabla 1. A partir del pasaje No. 12 se hicieron inoculaciones rápidas (cada 4 ó 5 días) en un grupo de 12 animales utilizando 10 ml de sangre fresca como cantidad mínima del inóculo.

Para la comparación de la patogenicidad de las dos cepas la cantidad utilizada como inóculo fué de 10^{10} parásitos de *B. argentina*. El número de parásitos por ml de sangre fué calculado teniendo en cuenta el recuento de glóbulos rojos y la parasitemia al momento del aislamiento. Veinte terneros se inocularon con *B. argentina* cepa virulenta (C.V.) correspondiente al pasaje No. 6 y 30 terneros se inocularon con la cepa atenuada (C.A.) correspondiente al pasaje No. 27. Diez terneros no inoculados fueron dejados como controles.

Evaluación de las parasitemias y hematocritos. Se hicieron frotis delgados y gruesos coloreados con Giemsa los cuales fueron examinados microscópicamente a

1.000 X. Las parasitemias se determinaron en forma de cruces (+) según el método descrito por Callox *et al*, 1974 (4) así:

| | | |
|------|------|--------------------------------------|
| + | 1 | parásito por 5.000 glóbulos rojos |
| ++ | 1 | parásito por 330-5000 glóbulos rojos |
| +++ | 0.33 | 20/o de los eritrocitos infectaos |
| ++++ | > | 20/o de los eritrocitos infectados. |

Los hematocritos se determinaron con una microcentrífuga capilar Clay Adams.

Análisis estadístico. Se hizo análisis de varianza según el método DRS (diferencia requerida para significancia) para la comparación de la patogenicidad entre los dos grupos inoculados y el grupo control (14). Los parámetros utilizados fueron aumento de la temperatura (por encima de 39°C) y disminución del hematocrito a partir del día cero P.I.

RESULTADOS

El primer aislamiento de campo de *B. argentina* se hizo en Montería en el año de 1971. Para tal efecto un ternero esplenectomizado (No. 456), nacido en una zona libre de hemoparásitos fué colocado en un potrero infectado con garrapatas *B. microplus*. Parásitos de *B. argentina* se observaron al día 12. Al día 14 cuando la parasitemia era de 1.50/o se recolectó sangre para preparación de estabilizado. El proceso de purificación se hizo en 5 terneros esplenectomizados. El primer animal (No. 240) fué inoculado con 100 ml del estabilizado preparado del ternero No. 456. A partir del momento en

que se hizo la identificación morfológica del parásito se hicieron cuatro pasajes continuos cada 4 ó 5 días. En el último ternero (No. 419) se esperó hasta que la parasitemia subiera al máximo, con el fin de preparar estabilizado. Los resultados de los pasajes del proceso de purificación se presentan en la Tabla 1.

Otro ternero esplenectomizado (No. 360) al que previamente (11 días antes) se habían infestado con larvas de *B. microplus*, fué inoculado con estabilizado preparado del ternero No. 419. Garrapatas adultas comenzaron a caer el día 9 P.I. cuando la parasitemia era de 3.20/o y se recolectaron hasta la muerte del animal al día 12 P.I. cuando la parasitemia alcanzó 250/o. Larvas nacidas de estas garrapatas después de ser incubadas, transmitieron la infección a otro ternero 14 días después de ser colocadas. (Tabla 1)

El proceso de atenuación decidió comenzarse después de observar reacciones severas en animales inoculados con los pasajes anteriores. A partir del último ternero (No. 518) se preparó un estabilizado utilizando 4M-DMSO como preservativo y se conservó en nitrógeno líquido. Los resultados de los pasajes rápidos en los terneros esplenectomizados están resumidos en la Tabla 1.

Animales intactos inoculados con estabilizados preparados a partir del pasaje anterior mostraron reacciones clínicas moderadas. Estos animales no requerían tratamiento para controlar la infección. Animales esplenectomizados inoculados con estabilizados preparados a partir de este pasaje desarrollaban altas parasitemias antes de que se observaran síntomas clínicos severos.

En razón a estos hallazgos se hizo un estudio para comparar la patogenicidad de dos de los alimentos obtenidos a través de estos pasajes. Los resultados comparativos de la inoculación de *B. argentina* pasaje No. 6 y *B. argentina* pasaje No. 27 se presentan en la Figura 1.

La disminución del hematocrito en el grupo inoculado con la cepa virulenta fué rápida, coincidiendo también con el alto incremento de la temperatura. Esto se hizo evidente especialmente entre los días 7 a 11 P.I. cuando se observaron parasitemias promedias de 2+ a 3+. Sin embargo, el grupo inoculado con la cepa atenuada mostró una moderada y gradual disminución del hematocrito y un leve incremento de la temperatura corporal. El valor más bajo del hematocrito se observó al día 14 P.I., recuperando su valor normal a los 28 días P.I.

Los resultados estadísticos comparativos entre las cepas CV, CA, y el grupo control (C) se presentan en la Tabla 2. Hubo diferencias significativas ($P < 0.01$) entre las cepas CV y CA en cuanto a disminución del hematocrito y aumento de la temperatura los días 4, 7 y 11 P.I. La cepa atenuada mostró diferencias significativas con el grupo control en cuanto a disminución del hematocrito los días 11, 14, 18 y 21 P.I. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo inoculado con la cepa atenuada en cuanto al incremento de la temperatura corporal.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el parásito *Babesia*

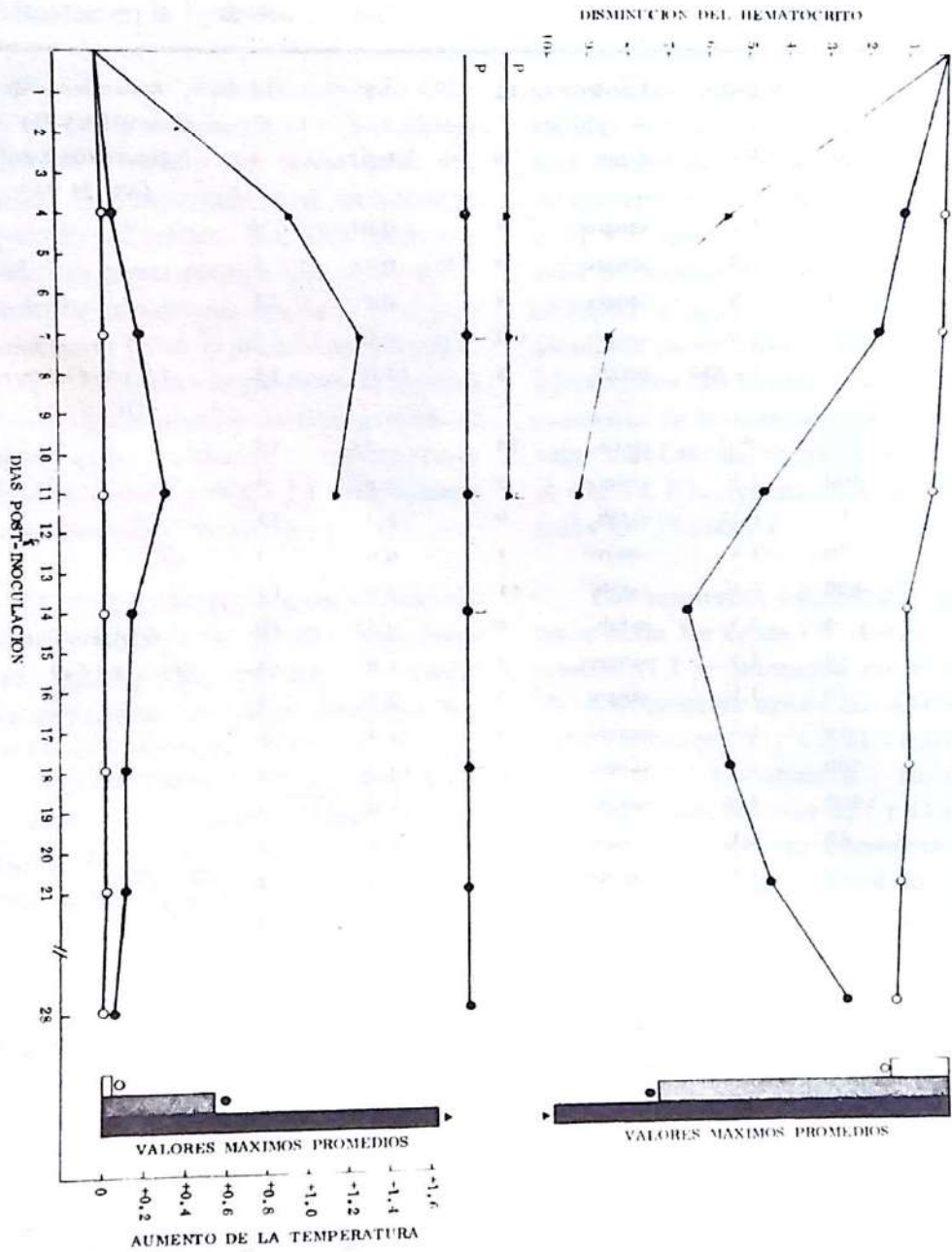
T A B L A 1
HISTORIA DEL AISLAMIENTO, PURIFICACION Y ATENUACION DE UNA
CEPA DE *BABESIA ARGENTINA* DE ORIGEN COLOMBIANO

| No. del pasaje | Cant. de Inoc. (ml) | Vías de Inoculac. | Mat. del Inoculo | No. días de Incub. | Máx. Pa- rasitemia (%) | No. días hasta aisla- miento | Observaciones |
|----------------|---------------------|-------------------|------------------|--------------------|------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| 0 | | Piel | Larvas | 12 | 1.5 | 14 | Aislamiento de campo (VII-13-71) |
| 1 | 100 | I.V. | estab. | 6 | 0.01 | 7 | Iniciación Purificación (VII-21-71) |
| 2 | 50 | I.V. | sangre | 4 | 0.01 | 4 | |
| 3 | 20 | I.V. | sangre | 4 | 0.1 | 5 | |
| 4 | 13 | I.V. | sangre | 4 | 0.1 | 5 | |
| 5 | 10 | I.V. | sangre | 4 | 6.0 | 9 | |
| 6 | 50 | IV Sbe | estab. | 8 | 25.0 | 9-12 | Ter pasaje por garrapatas (II-25-72) |
| 7 | 5.000 * | Piel | larvas | 14 | 0.75 | 15 | |
| 8 | 500 | I.V. | sangre | 3 | 2.8 | 4 | |
| 9 | 12 | S.O. | estab. | 9 | 2.3 | 12 | |
| 10 | 350 | I.V. | sangre | 1 | 6.6 | 3 | |
| 11 | 120 | I.V. | estab. | 11 | 3.0 | 12 | |
| 12 | 4 | I.V. | estab. | 8 | 0.53 | 10 | Iniciación atenuación (II-2-76) |
| 13 | 50 | I.V. | sangre | 2 | 1.9 | 3 | |
| 14 | 10 | I.V. | sangre | 2 | 2.7 | 4 | |
| 15 | 10 | I.V. | sangre | 3 | 1.4 | 5 | |
| 16 | 500 | I.V. | sangre | 2 | 13.9 | 4 | |
| 17 | 500 | I.V. | sangre | 1 | 21.0 | 3 | |
| 18 | 10 | I.V. | sangre | 2 | 5.5 | 4 | |
| 19 | 10 | I.V. | sangre | 1 | 3.5 | 4 | |
| 20 | 10 | I.V. | sangre | 1 | 6.5 | 4 | |
| 21 | 10 | I.V. | sangre | 4 | 0.08 | 6 | |
| 22 | 500 | I.V. | sangre | 2 | 4.0 | 5 | |
| 23 | 500 | I.V. | sangre | 2 | 5.4 | 3 | |
| 24 | 4 | I.V. | estab. | 9 | 0.5 | 13 | |
| 25 | 160 | I.V. | sangre | 2 | 6.5 | 6 | |
| 26 | 1.000 | IV-Sbe | sangre | 1 | 25.0 | 2 | |
| 27 | 20 | I.V. | estab. | 4 | 11.0 | 7 | |
| 28 | 20 | I.V. | estab. | 7 | 10.0 | 10 | (VIII-17-77) |

* No. de larvas

estab. estabilizado

FIGURA 1. Representación gráfica de la caída del hematocrito, aumento de la temperatura y parasitemia (P), en grupos de novillos inoculados con *Babesia argentina* cepa virulenta (▲), *Babesia argentina* cepa atenuada (●) y el grupo control no inoculado (○).



T A B L A 2

RESULTADOS PROMEDIOS COMPARATIVOS DE DISMINUCION DEL HEMATOCRITO Y AUMENTO DE LA TEMPERATURA EN GRUPOS DE ANIMALES INOCULADOS CON *BABESIA ARGENTINA*, CEPA VIRULENTA (CV), *BABESIA ARGENTINA* CEPA ATENUADA (CA) Y EL GRUPO CONTROL (C).

| Día | Disminución del Hematocrito | | | | Aumento de la temperatura | | | | |
|-----|-----------------------------|------|------|---|---------------------------|------|------|------|-------|
| | P.I. | C.V. | C.A. | C | DRS* | C.V. | C.A. | C | DRS* |
| 4 | 5.5 | 1.1 | 0.1 | | ≅1.53 | 0.92 | .05 | 0.01 | ≅0.5 |
| 7 | 8.5 | 1.7 | 0.1 | | ≅2.09 | 1.25 | 0.20 | 0.02 | ≅0.61 |
| 11 | 9.2 | 4.6 | 0.35 | | ≅2.49 | 1.14 | 0.32 | 0.01 | ≅0.54 |
| 14 | | 6.5 | 1.0 | | ≅2.89 | | 0.15 | 0.01 | ≅0.19 |
| 18 | | 5.4 | 0.9 | | ≅2.47 | | 0.12 | 0.01 | ≅0.22 |
| 21 | | 4.4 | 1.1 | | ≅2.46 | | 0.13 | 0.02 | ≅0.20 |
| 28 | | 2.5 | 1.3 | | ≅2.53 | | 0.03 | 0.01 | ≅0.21 |

* DRS: Diferencia para significancia ($P < 0.01$)

argentina puede ser atenuado por pasajes rápidos en terneros esplenectomizados. Callow y Mellors (3) reportaron este fenómeno con una cepa de *B. argentina* de origen australiano, la cual está siendo utilizada en la actualidad para la vacunación masiva del ganado susceptible en Australia (13). La razón del fenómeno según ellos, no está claramente elucidada pero parece que se produce al pasar rápidamente el parásito de un animal a otro (3).

El comportamiento atenuado del parásito empezó a observarse a partir del pasaje No. 23 después de que se hicieron una serie de pasajes rápidos en terneros esplenectomizados. Las características que indicaron disminución de la virulen-

cia fueron ligera disminución del hematocrito, leve aumento de la temperatura y moderada parasitemia, lo cual difería del comportamiento que se venía observando hasta el pasaje No. 11. En terneros esplenectomizados, por otra parte, se observó que el organismo atenuado establece una parasitemia mucho más rápida y alta que el organismo virulento, lo que permite una mayor producción de estabilizado y de antígeno para fines de diagnóstico.

Las reacciones severas de las cepas virulentas de *B. argentina* han originado muchas muertes en ganado inoculado con estas cepas con fines de premunición (3, 16). Se ha reportado un promedio de mortalidad de 50% en ganado vacunado

con cepas virulentas bajo condiciones controladas (3). En nuestro ensayo encontramos que una cepa de campo una vez aislada y purificada puede llegar a producir una mortalidad hasta del 50o/o cuando el ganado no es tratado a tiempo. En condiciones de campo la mortalidad puede llegar al 80o/o (16). Sin embargo, la cepa atenuada demostró ser completamente inocua cuando la misma dosis fué inoculada en ganado susceptible. La reacción clínica a la infección fué inaparente, demostrándose únicamente una ligera caída del hematocrito y un leve aumento de la temperatura corporal.

Estos resultados demuestran que la cepa de *B. argentina* aquí reportada puede ser utilizada para la vacunación masiva de ganado susceptible que se vaya a mover a zonas endémicas o en ganado susceptible nacido en zonas endémicas inestables (8).

Otros estudios se encuentran en progreso para determinar si este organismo atenuado no se transmite a través de la garrapata *Boophilus microplus*, tal como se ha reportado en otros organismos atenuados (5, 13) y para conocer el grado de protección conferido contra las cepas de campo.

BIBLIOGRAFIA

1. Aragón, R.S. 1976. Bovine babesiosis. A Review. Veterinary Bulletin 46: 903-917
2. Bishop, J.P., Adams, L.G., Thomposon, K.C., Corrier, D.E. 1973. The Isolation, Separation and Preservation of *Babesia bigemina*. Tropical Animal Health & Production, 5: 141-145
3. Callow, L.L., Mellors, L.F. 1966. A new vaccine for *Babesia argentina* prepared in splenectomized calves. Aust. Vet. J. 42: 251-252.
4. Callow, L.L., Mc. Gregor, W., Parker, R.J., Dalgliesh, R.J. 1974. The immunity of cattle to *Babesia argentina* after drug sterilisation of infectious of varying duration. Aust. Vet. J. 50: 6-11.
5. Callow, L.L., 1975. Vaccination against Babesiosis in Australia. Workshop on Hemoparasites CIAT, Cali, Colombia
6. Corrier, D.E., González, E.F., Betancourt, A. 1976. Current information on the epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Colombia. Proceedings Conference on Tick Borne Diseases and their Vectors. Sept. 26-30. University of Edinburgh, Scotland.
7. González, E.F., Todorovic, R.A., Adams, L.G. 1973. Ultraestructura de la *Babesia bigemina*. Revista ICA, 6: 89-112
8. González, E.F., Corrier, E.F., Todorovic, R.A., López, G. 1978. Epidemiología de la anaplasmosis y babesiosis bovina en el Valle Geográfico del Río Cauca. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias Vol I: 201-215.
9. González, E.F., Todorovic, R.A., Thompson, K.C., 1976. Immunization against anaplasmosis and babesiosis: Part. I. Evaluation of immunization using minimum infective doses under laboratory conditions. Z. Tropenmed. U. Parasit., 27: 427-437
10. Plata, G.R., 1956. Contribución al estudio de las Piroplasmosis Bovinas en Colombia. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia 115: 427-434.
11. Riek, R.F., 1964. The life cycle of *Babesia bigemina* in the tick Vector *Boophilus microplus*. Aust. J. Agric. Res. 15: 802-821.
12. Riek, R.F. 1966. The life cycle of *Babesia argentina* in the tick vector *Boophilus microplus*. Aust. J. Agric. Res., 17: 247-254.

13. Ristic, M., Sibinovic, S., Welter, C.J. 1968. An attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. Proc. U.S. Annual Mtg., New Orleans, La.
14. Snedecor, G.M. 1957. Statistical Methods. 5th Ed. Iowa State College Press, Ames Ia.
15. Todorovic, R.A., Vizcaino, O.G., González, E.F., Adams, L.G. 1973. Chemprophylaxis (Imidocarb) Against *Babesia bigemina* and *Babesia argentina* infectious. American Journal of Veterinary Research, 34: 1153-1161.
16. Todorovic, R.A., González, E.F. 1975. Inmunización contra Babesiosis Bovina con vacunas a base de parásitos muertos. Revista ICA, 10: 87-99
17. Todorovic, R.A., González, E.F. 1975. Inmunización contra Babesiosis Bovina con vacunas a base de parásitos vivos. Revista ICA, 10: 243-254.
18. Todorovic, R.A. 1976. Bovine babesiosis in Colombia. Veterinary Parasitology 2: 97-109.

**EJEMPLARES GANADO HARTON
LA RAZA CRIOLLA DEL VALLE DEL CAUCA**



HATO DE HARTON (FONDO GANADERO DEL VALLE)