

## **EVALUACIÓN DE LA INFECTIVIDAD DE LAS CEPAS VACINALES DE *Babesia bovis* Y *Babesia bigemina* A TRAVÉS DEL *Boophilus microplus***

V. Gayol, M.A. Solari <sup>1</sup>

### **RESUMEN**

Una de las preguntas que surgen desde el comienzo de la producción de hemovacuna con organismos vivos atenuados de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en el Uruguay es si éstos pueden ser transmitidos por la garrapata común del ganado *Boophilus microplus*, dado que de ser así, una posible reversión a la virulencia podría ocurrir. Experimentos previos utilizando un PCR específico de especie indican que las cepas vacinales uruguayas de *B. bovis* y *B. bigemina* pueden ser transmitidas transovaricamente por el *B. microplus*.

Con el fin de determinar si estos organismos eran capaces de infectar posteriormente un nuevo vacuno, se utilizaron larvas de *B. microplus* provenientes de 2 animales infectados experimentalmente con cepas vacinales de *B. bovis* y *B. bigemina*. Estas fueron recolectadas en 2 grupos: un grupo durante la fase aguda de infección (4 primeras semanas), y el segundo de la fase crónica (5-13 semanas). El control positivo fue infectado con cepas patógenas de *B. bovis* y *B. bigemina* y recibió el mismo manejo que el anterior.

Aproximadamente 150000 larvas provenientes de la fase aguda fueron utilizadas para infestar al ternero receptor. Esto se repite en la fase crónica.

En total se utilizaron 3 donantes y 6 receptores, los cuales se monitorearon utilizando PCR en paralelo con frotis de sangre teñidos con Giemsa, temperatura, hematócrito e inmunofluorescencia indirecta.

A pesar de que los terneros infestados con larvas provenientes de la fase aguda de infección no mostraron signos clínicos ni serología positiva, los organismos sí fueron detectados por PCR, indicando que los mismos eran infecciosos. Los resultados difirieron cuando las larvas provenían de la fase crónica de infección donde no se encontraron parásitos con ninguna de las técnicas utilizadas. En el control positivo, la transmisión ocurrió en las dos fases de infección provocando la muerte del receptor.

<sup>1</sup> Departamento de Parasitología, DILAVE "Miguel C. Rubino" MGAP, cc 6577 Montevideo, Uruguay (mailcentra@dilave.gub.uy)

# EVALUACIÓN DE LA INFECTIVIDAD DE LAS CEPAS VACINALES DE *Babesia bovis* Y *Babesia bigemina* A TRAVÉS DEL *Boophilus microplus*

## INTRODUCCIÓN

Como medida preventiva contra la babesiosis, el DILAVE produce una vacuna viva con cepas atenuadas de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*.

La importancia del estudio de la interrelación entre estas cepas y su vector biológico radica en el hecho de que de haber una transmisión de las cepas atenuadas a través del *Boophilus microplus*, podría existir una reversión de dichas cepas a la virulencia y una consecuente diseminación de la enfermedad.

En experimentos previos utilizando un PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) específico de especie se detectó *B. bovis* y *B. bigemina* en los distintos estadios evolutivos del vector (teleóginas, huevos y larvas) que había sido alimentado en terneros experimentalmente infectados con cepas vacinales de ambas Babesias determinando entonces que estas cepas podían ser transmitidas por la ruta transovárica. Para determinar si esos organismos eran capaces de infectar un nuevo vacuno se diseñó un nuevo experimento en el cual larvas de *B. microplus* provenientes de animales infectados experimentalmente con cepas atenuadas de *B. bovis* y *B. bigemina* fueron utilizadas para infestar terneros los cuales fueron posteriormente monitoreados para determinar si existía infección.

## MATERIALES Y METODOS

Donantes de garrapatas: Se infestaron 3 terneros con larvas de una cepa de *B. microplus* libre de hemoparásitos durante 1 mes. Al mes de haber comenzado la infestación los 3 terneros fueron inoculados de la siguiente manera: T#49 y T#48 con cepas vacinales de *B. bovis* y *B. bigemina* y el T#50 con sangre proveniente de un brote positivo a *B. bovis* y *B. bigemina* por presencia de anticuerpos y también por PCR.

Infestación de terneros utilizando larvas de los donantes: Las teleóginas fueron recogidas diariamente de los 3 donantes y fueron mantenidas separadamente en estufa para obtener huevos y posteriormente larvas.

Larvas provenientes de las garrapatas caídas durante las 4 primeras semanas del experimento (fase aguda de infección) fueron alimentadas en 3 terneros diferentes. El ternero 70 fue infestado con larvas provenientes del T#49; el ternero 71 fue infestado con larvas provenientes del T#48; y el ternero 73 fue infestado con larvas provenientes del T#50.

Las larvas derivadas de garrapatas caídas entre la semana 5 y 13 del experimento (fase crónica de infección) fueron alimentadas en 3 nuevos terneros; ternero 64 (larvas provenientes del T#48); ternero 66 (larvas provenientes del T#50); y ternero 67 (larvas provenientes del T#49).

Evaluación de la transmisibilidad de las cepas vacinales de *B. bovis* y *B. bigemina*: Sangre y suero fueron colectados periódicamente de los terneros receptores para realizar frotis teñidos con colorante de Giemsa, PCV, PCR e IFI.

## RESULTADOS

Fase aguda de infección: Los terneros #70 y #71, infestados con larvas provenientes de las primeras 4 semanas post-inoculación (cepas vacinales) fueron negativos a los frotis de sangre y no mostraron una marcada disminución en su PCV. La inmunofluorescencia realizada en los días 26 y 97 post infestación también dieron resultados negativos. Sin embargo, ambos fueron positivos a PCR para ambas Babesias.

El T#73, infestado con larvas provenientes de las primeras 4 semanas post-inoculación (cepas patógenas) fue positivo a frotis de sangre en el día 12 post infestación y su PCV disminuyó hasta un 6% en el día 13 donde murió como consecuencia de la babesiosis. El PCR fue positivo para ambas Babesias. No se pudo realizar IFI ya que no se contaba con suero al momento de la muerte.

Fase crónica de infección: El T#64 y el T#67 infestados con larvas provenientes de las semanas 5 - 13 post-inoculación (cepas vacinales) fueron ambos negativos a los frotis sanguíneos durante todo el ensayo, y tampoco mostraron una disminución en su PCV. No se detectaron Babesias por PCR y los resultados de IFI fueron también negativos.

El T#66 infestado con larvas provenientes de semanas 5 - 13 post-inoculación (cepas patógenas) fue positivo a frotis de sangre en el día 13 post infestación y su PCV disminuyó a 16% el mismo día. El PCR fue positivo para ambas Babesias y el ternero murió de babesiosis el día 14. IFI no pudo ser realizada ya que no había suero disponible en ese momento.

## **DISCUSION**

A pesar de que los terneros receptores de la fase aguda de infección de animales infectados con cepas vacinales no mostraron signos clínicos de enfermedad ni seroconversión, la presencia de parásitos en sangre pudo ser detectada utilizando PCR. Los resultados negativos de la serología aún no están claros pero se puede deber a una baja sensibilidad de la técnica. Sin embargo, también es posible que no hubieran anticuerpos detectables debido a la baja carga antigénica, ausencia de "señales de peligro" y un mínimo daño celular (relacionado a la atenuación de los organismos), que no hubieran iniciado una respuesta inmune adaptativa. Una explicación alternativa podría ser que la respuesta inmune innata fue efectiva en eliminar los organismos antes de que una respuesta inmune adaptativa pudiera ser efectivamente establecida y mantenida.

En el caso de los terneros receptores de larvas provenientes de la fase crónica de infección de animales infectados con cepas vacinales, no se observaron signos clínicos, no existió seroconversión y tampoco se detectaron parásitos utilizando PCR.

En suma, las cepas vacinales de *B. bovis* y *B. bigemina* pueden ser retransmitidas a través de garrapatas a animales susceptibles cuando el donante se encuentra en fase aguda de infección, y no así en la crónica. Considerando que la transmisión ocurrió solamente cuando el donante se encontraba en la fase aguda de infección, la recomendación sería proteger al ganado de la infestación por garrapatas durante el período de vacunación, ya que éste dura 2 meses y el primer mes sería la fase aguda con posibilidad de transmisión.

Resultados de la infestación con larvas provenientes de la fase aguda de infección. (T#70 y 71 infección con cepas vacinales, T#73 infección con cepas patógenas)

Fechas	PCR <i>B. bovis</i>			PCR <i>B. bigemina</i>			Giemsa			PCV			IFI <i>B. bovis</i>			IFI <i>B. bigemina</i>		
	T#70	T#71	T#73	T#70	T#71	T#73	T#70	T#71	T#73	T#70	T#71	T#73	T#70	T#71	T#73	T#70	T#71	T#73
Día 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37%	29%	24%	-	-	-	-	-	-
Día +8	+	+	+	-	+	+	-	-	-	33%	33%	25%	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
Día+ 9	+	-	+	-	-	+	-	-	-	28%	30%	20%	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
Día +11	+	+	+	+	+	+	-	-	-	28%	29%	20%	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
Día +12	-	+	+	+	-	+	-	-	+	28%	29%	15%	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
Día+ 13	-	+	+	+	-	+	-	-	+	28%	29%	6%	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
Día+ 14	-	-	s/d	-	-	s/d	-	-	s/d	30%	30%	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
Día +27	-	-	s/d	-	+	s/d	-	-	s/d	30%	30%	s/d	-	-	s/d	-	-	s/d
Día +97	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	-	-	s/d	-	-	s/d

s/d = sin datos

Día 0= día de la infestación

Resultados de la infestación con larvas provenientes de la fase crónica de infección. (T#64 y 67 infección con cepas vacinales, T#66 infección con cepas patógenas)

Fechas	PCR <i>B. bovis</i>			PCR <i>B. bigemina</i>			Giemsa			PCV			IFI <i>B. bovis</i>			IFI <i>B. bigemina</i>		
	T#64	T#67	T#66	T#64	T#67	T#66	T#64	T#67	T#66	T#64	T#67	T#66	T#64	T#67	T#66	T#64	T#67	T#66
Día 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30%	30%	28%	-	-	-	-	-	-
Día +5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	30%	33%	26%	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
Día+ 13	-	-	+	-	-	+	-	-	+	26%	32%	16%	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
Día +14	-	-	s/d	-	-	s/d	-	-	s/d	28%	32%	s/d	-	-	s/d	-	-	s/d
Día +20	-	-	s/d	-	-	s/d	-	-	s/d	27%	29%	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
Día+ 26	-	-	s/d	-	-	s/d	-	-	s/d	28%	28%	s/d	-	-	s/d	-	-	s/d

s/d = sin datos

Día 0= día de la infestación