

DETECCION DE MEROZOITOS GRANDES (VERMICULOS) DE
BABESIA EN TELEOGINAS DE *BOOPHILUS MICROPLUS*
ALIMENTADAS SOBRE TERNEROS CON DISTINTOS NIVELES
DE PARASITEMIA DE *BABESIA BIGEMINA* Y *BABESIA BOVIS*
(= *BABESIA ARGENTINA*)

GUGLIELMONE, A. A.*; MANGOLD, A. J.*;
BERMUDEZ, A. C.*; HADANI, A.**

* Unidad Regional de Investigación en Sanidad Animal (URISA-NOA),
INTA, C.C. 228, 4400 Salta, Argentina.

** Kimron Veterinary Institute, P. O. Box 12, Beit Dagan, Israel.

(Recibido el 3 de Septiembre de 1984)

SUMMARY

Studies on the presence of vermicules of *B. bigemina* and *B. bovis* in the haemolymph of engorged females of *B. microplus* were carried out in 20 ticks (Group 1) fed on a calf with a parasitaemia of 3.5% of *B. bigemina* and 1.5% of *B. bovis* the day before tick detachment and in 40 ticks (Group 2) fed on a calf with "non-detectable" parasitaemia in thick blood smears since 1 day before tick collection. Tick haemolymph was observed between days fourth and tenth post-detachment. Results obtained were as follows:

Group 1: Eighteen ticks were found infected, 12 of which showed vermicules already on day VI post-detachment. Fourteen ticks died within 10 days post-detachment. The mean number of vermicules per microscopic field ranged from 0.6 on day IV to 36.5 on day IX post-detachment.

Group 2: In only 10 of the 40 ticks, vermicules could be detected. Three ticks died within 10 days post-detachment. Vermicules could be detected only on days VIII to X post-detachment. The average per microscopic field was less than 0.1 vermicule.

Key Words: Merozoites; *Boophilus microplus*; *Babesia bigemina*; *Babesia bovis*.

RESUMEN

Se investigó la presencia de merozoitos grandes de *Babesia* en hemolinfa de teleoginas de *Boophilus microplus* entre los días 4.º a 10.º después de desprendidas las garrapatas del hospedador. La probabilidad de detectar infección con *Babesia* sp. en teleoginas de *B. microplus* fue alta cuando se observó hemolinfa extraída los días 9 y 10 luego de caídas las garrapatas criadas sobre un ternero con parasitemia baja y al 6.º día en las provenientes de un ternero con parasitemia moderada.

La proporción de garrapatas muertas el 10.º día de caídas, la proporción de infectadas con *Babesia* sp. y el número de vermículos detectados en ellas fue mayor en las alimentadas sobre el ternero con moderada parasitemia que en las del ternero con parasitemia baja.

Palabras Clave: Merozoitos; *Boophilus microplus*; *Babesia bigemina*; *Babesia bovis*.

INTRODUCCION

Boophilus microplus es el único vector conocido de los microorganismos causantes de babesiosis de los bovinos en la Argentina: *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* (= *Babesia argentina*).

El ciclo biológico de ambas especies de *Babesia* involucra la invasión de los ovarios de las hembras de *B. microplus* por formas evolutivas de estos protozoos (Riek^{14,15}); transmitiéndose así, la infección a la progenie. Esta transmisión vertical de la infección no se considera continua en el sistema *Boophilus* - *Babesia* (Friedhoff y Smith⁶; Hadani⁹). Cada generación de *B. microplus* necesitaría ingerir sangre parasitada con *Babesia* en el último día de alimentación para mantener el ciclo en la garrapata, tal como lo demostró Callow (1968) para *B. bigemina*.

Dos factores también importantes en la epidemiología de la babesiosis son la carga de garrapatas de los bovinos y la tasa de infección de las garrapatas. La infección de las poblaciones de *B. microplus* con *B. bigemina* y *B. bovis* puede comprobarse observando la presencia de merozoitos grandes (vermículos) en la hemolinfa de teleoginas desde el tercer día de desprendidas las garrapatas en adelante (Riek^{14,15}). Este método parecería ser adecuado para medir la tasa de infección con *B. bigemina* pero tendría menor sensibilidad para detectar infección con *B. bovis* (Mahoney y Mirre¹³).

El tiempo post-caída en que se examinan las garrapatas varía, según los autores, entre 5 y 10 días (Mahoney y Mirre¹³; Morzaria *et al.*¹³; Dalgliesh *et al.*⁴; Davey³) sin que se haya investigado la posible relación entre ese lapso y la sensibilidad del método.

El presente trabajo se realizó para determinar la probabilidad de detectar la infección por *Babesia* sp. entre el 4.º y el 10.º día post-desprendimiento en teleoginas de *B. microplus*, alimentadas sobre dos terneros, que 24 horas antes de recogerlas, presentaban distintos niveles de parasitemia ("moderada" y "baja").

MATERIAL Y METODOS

Terneros: Se usaron 2 terneros de raza Holando Argentino de 2 meses de edad, esplenectomizados. El ternero con parasitemia "moderada" (caravana 1598) se denominará de aquí en más ternero A y el que tenía parasitemia "baja" (caravana 1300) ternero B. La mantención de los mismos libres de garrapatas, previamente a la experimentación, y la metodología para evaluar la infección con *B. bigemina* y *B. bovis* fueron descritas anteriormente (Guglielmone *et al.*⁸). Los terneros no tenían anticuerpos séricos contra *B. bovis* detectables por inmunofluorescencia indirecta. No se investigó si tenían anticuerpos contra *B. bigemina*.

Garrapatas: Se usó la colonia "Cerrillos" de *B. microplus*. El mantenimiento de la colonia y su capacidad para transmitir *B. bigemina* y *B. bovis* fueron descritas por Guglielmone *et al.*⁸.

Experimentación: Ambos terneros fueron infestados con aproximadamente 8.000 larvas de *B. microplus*.

Ternero A: El día 20 post-infestación la parasitemia por *B. bigemina* era del 3.5% y la de *B. bovis* 1.5%; el día 21 post-infestación se recogieron 20 teleoginas.

Ternero B: El día 16 post-infestación cuando la parasitemia era de 1.5% (*B. bigemina* + *B. bovis*) fue tratado con Acaprina* (1 mg/kg de peso). De acuerdo con Barnett¹ y Kuttler¹¹ esta dosis no sería esterilizante para *B. bigemina* ni para *B. bovis*, pero provocaría una gran reducción en los niveles de parasitemia. El día 19 post-infestación el 0.5% de los eritrocitos estaban aún para-

* Quinuronium (6,6-di (metilquinolil urea) dimetilsulfato, Bayer, Argentina.

sitados por lo que se inoculó nuevamente Acaprina (0.75 mg/kg de peso). Desde el día 21 post-infestación ya no se pudieron detectar *Babesia* en frotis finos ni en gota gruesa. Los días 22 y 23 post-infestación se recogieron 20 teleoginas por vez.

Las garrapatas fueron acondicionadas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ y 90% de humedad relativa. Desde el día 4.º hasta el 10.º después de desprendidas, se cortó un miembro por día a cada teleogina y se recogió la hemolinfa manada de la herida en un portaobjetos. Los límites de tiempo del estudio corresponden al principio del período de detección de vermículos de *B. bigemina* y *B. bovis* en hemolinfa de teleoginas de *B. microplus* (Riek ^{11,15}) y al período cuando las mismas ya pusieron la mayoría de los huevos a la temperatura bajo la que se efectuó este estudio (Hitchcock ¹⁰).

La hemolinfa depositada en portaobjetos fue fijada con alcohol metílico y coloreada con Giemsa * en buffer-fosfato pH 6.7 por 30 minutos y observada por microscopio Olympus (CHA) bajo inmersión en aceite con objetivo de 100x y ocular de 10x, dando un campo microscópico de 0,18 mm de diámetro de acuerdo con las especificaciones del manual de la empresa fabricante del microscopio.

Cada colecta de hemolinfa por garrapata, se observó en su totalidad, registrando el número de campos microscópicos y el número total de vermículos. De esta manera se detectó el comienzo de la presencia de vermículos y cuando su número, por campo microscópico, llegó al máximo. No se intentó identificar a los vermículos por especie de *Babesia*.

La proporción de teleoginas infectadas con *Babesia* provenientes del ternero A y B, al igual que la mortalidad hasta el 10.º día de desprendidas, fue evaluado estadísticamente usando la prueba de χ^2 .

* Giemsa Blopur, Buenos Aires. El uso de los productos citados no significa una recomendación de los autores ni de las instituciones a las que pertenecen.

RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan: el número de teleoginas infectadas alimentadas sobre los terneros A y B; la mortandad hasta el 10.º día de desprendidas; la cantidad de teleoginas en que se detectó vermículos por primera vez de acuerdo con el intervalo, en días, desde el desprendimiento hasta el final de las observaciones y el número medio de vermículos por campo microscópico de las teleoginas infectadas.

Se observó una gran variación en la cantidad de hemolinfa extraída de las diferentes garrapatas. Así el número de campos microscópicos de las colecciones para las diferentes garrapatas tuvo un rango de 3 a 60 para aquellas provenientes del ternero A y de 1 a 55 para las teleoginas alimentadas en el ternero B. Se realizaron 372 intentos de colección de hemolinfa; ésta no manó en 22 ocasiones.

De las 10 teleoginas infectadas del ternero B, sólo 3 presentaron vermículos por más de un día. Una en los días 8 y 9 desde el desprendimiento y las 2 restantes los días 9 y 10. En las teleoginas provenientes del ternero con parasitemia moderada, en cambio, la norma fue que la detección de vermículos fuera continua desde el primer día de detección hasta la muerte de la garrapata o el final del período de estudio.

Sólo 6 garrapatas alimentadas en el ternero con parasitemia moderada vivieron hasta el último día de observación. De éstas, 5 estaban infectadas; 3 de ellas presentaron el número máximo de vermículos el 9.º día después de desprendidas y las 2 restantes el 10.º día.

El número de teleoginas muertas hasta el 6.º día de caída de las garrapatas provenientes del ternero con parasitemia moderada (día en que 17 del total de 18 teleoginas vivas en ese día fueron detectadas como portadoras de vermículos) fue de 2 con respecto al total de 14 que murieron hasta el 10.º día de desprendidas.

TABLA 1.—Detección de vermiculos de *Babesia* en teleoginas de *B. microplus* alimentadas en terneros con parasitemia "moderada" o "baja" de *B. bigemina* y *B. bovis* a diferentes días de caídas y mortalidad de garrapatas en ambas situaciones.

	Parasitemia "moderada" (PM)		Parasitemia "baja" (PB)	
	PM	PB	PM	PB
Número de teleoginas estudiadas	20		40	
Número de teleoginas infectadas	18		10	p < 0.01
Número de teleoginas muertas hasta el día 10 de desprendidas	14		3	p < 0.01
Intervalo desprendimiento-observación (días)	Número de vermiculos (Media ± desvío estándar) *			
	PM	PB	PM	PB
4	10	0	0.6 ± 0.42	0
5	2	0	0.7 ± 0.50	0
6	5	0	11.8 ± 9.11	0
7	0	0	5.8 ± 5.76	0
8	0	1	23.4 ± 30.26	0.1 ± 0
9	0	5	36.5 ± 28.75	0.1 ± 0.06
10	1	4	16.0 ± 10.44	0.06 ± 0.01

* Por campo microscópico del total de teleoginas infectadas en el día de observación indicado.

DISCUSION

Parte de esta discusión se basa en la suposición que la infección simultánea de *B. microplus* con *bigemina* y *B. bovis* no causa una interacción que produzca la prevalencia de una especie de *Babesia* sobre la otra o modifique el ciclo biológico de alguna de ellas. No se encontraron antecedentes que invaliden esta hipótesis.

La detección inicial de vermiculos en 9 de las 10 teleoginas positivas del grupo proveniente del ternero B, se produjo en los días 9.º y 10.º desde el desprendimiento. En la restante se observaron vermiculos en el 8.º y 9.º día (Tabla 1). Por lo tanto habría una alta probabilidad de detectar vermiculos de *Babesia* inspeccionando la hemolinfa de teleoginas alimentadas sobre un ternero con baja parasitemia en los días 9.º y 10.º. En 17 de las 18 garrapatas positivas provenientes del ternero con parasitemia moderada, se detectaron vermiculos al 6.º día de desprendidas. Dada la baja mortalidad de teleoginas que se produjo en ese lapso de tiempo, la detección de las portadoras sería mayor en ese día.

Estos datos podrían ser de utilidad para futuros trabajos sobre la epizootiología de babesiosis; además la técnica para detección de vermiculos de *Babesia* en hemolinfa de teleoginas es simple y puede facilitar el conocimiento de la proporción de teleoginas de *B. microplus* infectadas en diferentes condiciones naturales y de manejo ganadero.

Mahoney y Mirre¹² no pudieron detectar *B. bovis* en teleoginas que, posteriormente, produjeron progenies que transmitieron este hemoparásito. Es posible que parte del fallo en la detección se haya debido a la inspección de la hemolinfa de teleoginas solo hasta el 7.º día de caídas.

La alta mortalidad de *B. microplus* provenientes del ternero con parasitemia moderada coincide con los hallazgos de Riek^{11, 15} y Dalglish *et al.*⁴. Además Riek¹¹ en su trabajo con *B. microplus* alimentadas sobre terneros con alta parasitemia de *B. bigemina* y Dalglish *et al.*⁴ en el correspondiente a igual especie de garrapata alimentada sobre terneros con 1.5% de parasitemia con *B. bovis*, señalaron que la cantidad de huevos puestos por las teleoginas infectadas fue significativamente menor que los puestos por las no infectadas. Gray⁷ observó que en *Boophilus decoloratus* infectados con *B. bigemina*, además de la baja oviposición, el porcen-

taje de nacimiento de larvas fue significativamente menor que en las no infectadas. Esto significaría que la contribución de teleoginas infectadas de *Boophilus* sp. al mantenimiento de la población de garrapatas sería escasa cuando provengan de vacunos que sufran babesiosis. A esta causa, sumada a los esfuerzos de erradicación de *B. microplus* que aún se llevan a cabo en Estados Unidos se deberían, según Davey⁵ la ausencia de brotes de babesiosis en este país. Sin embargo Callow y Stewart^{2,3} presentaron evidencias de que babesiosis clínica en terneros causa inmunosupresión contra *B. microplus*. Esto compensaría la baja reproductividad de garrapatas infectadas y contribuiría a preservar la población vectora.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Srta. Norma Conesa por su contribución secretarial, al Dr. Gerardo E. Habich por comentarios críticos del trabajo y a la doctora Lola G. de Ríos por los análisis serológicos.

REFERENCIAS

1. Barnett, S. F.—The chemotherapy of *Babesia bigemina* infection in cattle. *Res. Vet. Sci.*, 6, 1965, 397-415.
2. Callow, L. L.; Stewart, N. P.—Immunosuppression by *Babesia bovis* against its tick vector *Boophilus microplus*. *Nature*, 272, 1978, 812-814.
3. Callow, L. L.; Stewart, N. P.—Observations on immunosuppression during primary babesiosis of cattle expressed against the tick, *Boophilus microplus*. Tick and tick-borne diseases. *Proc. 56th Ann. Conf. Aust. Vet. Assoc.*, 1980, pp. 67-72.
4. Dalglish, R. J.; Stewart, N. P.; Duncalfe, F.—Reduction in pathogenicity of *Babesia bovis* for its tick vector, *Boophilus microplus*, after rapid blood passage in splenectomized calves. *Z. Parasitenk.*, 64, 1981, 347-351.
5. Davey, R. B.—Effects of *Babesia bovis* on the ovipositional success of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 74, 1981, 331-333.
6. Friedhoff, K. T. and Smith, R. D.—Transmission of *Babesia* by ticks. In: *Babesiosis* (M. Ristic & J. P. Kreier, eds.). Academic Press, N. Y., 1981, pp. 267-322.
7. Gray, J. S.—The effects of the piroplasm *Babesia bigemina* on the survival and reproduction of the blue tick, *Boophilus decoloratus*. *J. Invert. Path.*, 39, 1982, 413-415.

8. Guglielmone, A. A.; Bermúdez, A.; Hadani, A.; Mangold, A. J.; Vanzini, V.; Luciani, C.; Ríos, Lola F. de; Galetto, C.—Aislamiento de una cepa de *Babesia bigemina* por la parasitación de un ternero con *Boophilus microplus* adultos. *Gac. Vet.*, 43, 1981, 341-347.
9. Hadani, A.—In vitro development of *Babesia* and *Theileria* parasites in organs and tissues of ticks. In: *Babesiosis* (M. Ristic & J. P. Kreier eds.). Academic Press, N. Y., 1981, pp. 225-266.
10. Hitchcock, L. F.—Studies in the non-parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina-Ixodidae). *Aust. J. Zool.*, 3, 1955, 295-311.
11. Kuttler, K. L.—Chemotherapy of babesiosis: A review. In: *Babesiosis* (M. Ristic & J. P. Kreier, eds.). Academic Press, N. Y., 1981, pp. 65-86.
12. Mahoney, D. F.; Mirre, G. B.—Bovine babesiosis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 65, 1971, 309-317.
13. Morzaria, S. P.; Young, A. S.; Hudson, E. B.—*Babesia bigemina* in Kenya: experimental transmission by *Boophilus decoloratus* and the production of tick-derived stabilates. *Parasitology*, 74, 1977, 291-298.
14. Riek, R. F.—The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. Agric. Res.*, 15, 1964, 802-821.
15. Riek, R. F.—The life cycle of *Babesia argentina* in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. Agric. Res.*, 17, 1966, 247-254.