

01/11/13 - Reporte de un brote de Babesiosis (*Babesia bovis*) en vaquillonas en zona libre de garrapata.

Vet. Arg. ? Vol. XXX ? N° 307 ? Noviembre 2013.

García, J.A.1; Calandra, P.M.2; Fiorani, F.2; Fernández, J.A.2; Aráoz, V.2; Späth, E.1; Thompson, C.3; Mejía, M.4; Mangold, A.J3.

Resumen.

Descripción de un brote de babesiosis, en vaquillonas en un establecimiento dedicado a la actividad de cría ubicado en el partido de General Madariaga, provincia de Buenos Aires (Lat 36° 44' 39,67", Long 57° 08' 29,61"), zona libre de garrapatas. En un período de 45 a 60 días enfermaron 20 animales y murieron 12 sobre un total de 314. Los animales afectados presentaron, hipertermia, palidez de mucosas, disnea, postración y muerte. Hallazgos macroscópicos denotaron marcada esplenomegalia, riñones color rojo vinoso y hemoglobinuria. Se observó la presencia de estructuras piriformes basofílicas en el interior de los eritrocitos en frotis periféricos y extendidos de cerebro, compatibles con *Babesia* spp. Análisis histológicos resultaron en nefrosis tubular severa, hepatitis linfocítica periportal leve y presencia de un puntillado basofílico en el interior de eritrocitos en capilares del sistema nervioso central (SNC), riñón e hígado. Se identificó y diferenció *Babesia bovis* mediante observación al microscopio y la técnica de reacción en cadena de las polimerasas (PCR). Los datos de manejo y temperatura permitieron inferir la transmisión por garrapatas (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) traídas por terneros provenientes de Corrientes en el mes de octubre del 2012, el cual pudo realizar un ciclo de desarrollo.

Palabras claves: babesiosis, vaquillonas, General Madariaga, zona libre, Babesia bovis, garrapatas.

Summary.

Description of a babesiosis outbreak that affected heifers in a breeding herd located at the district of General Madariaga, province of Buenos Aires (Lat 36 ° 44 '39.67", Long 57 ° 08' 29.61"), officially tick free zone. In a 2 months period 20 animals were affected and 12 died out of a total of 314. Affected animals showed hyperthermia, pale mucousae membranes, dyspnea, prostration, and death. Macroscopic findings were: marked splenomegaly, red wine coloured kidneys and haemoglobinuria. Pyriform basophilic structures were observed inside the erythrocytes of peripheral blood and brain smears, consistent with *Babesia* spp. Histological analysis resulted in severe tubular nephrosis, mild lymphohistiocytic

periportal hepatitis and presence of basophilic bodies in erythrocytes inside brain capillaries, kidney and liver. Identification of *Babesia bovis* was made by microscopic observation and polymerase chain reaction (PCR). Calves introduced from Corrientes in the month of October 2012 parasitized with ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*), and average temperatures above 15° C during a long period, allowed development of one cycle and the transmission of *Babesia* to the heifers.

Key words: babesiosis, heifers, General Madariaga, free zone, Babesia bovis, ticks.

1Grupo Sanidad Animal y 2Residencia Interna Salud Animal, EEA INTA Balcarce, Argentina. 3EEA INTA Rafaela, Argentina. 4Actividad privada.

Introducción

Babesiosis bovina es una enfermedad causada por protozoarios intra eritrocitarios del género *Babesia*, transmitidos exclusivamente por garrapatas de la familia *Ixodidae*. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini *et al.* 1888) es la especie que se presenta en nuestro país, en zonas aptas para su sobrevivencia y persistencia, siendo la presentación de la enfermedad limitada a las regiones con presencia del vector en cuestión (Guglielmone *et al.* 1995). Sin embargo, existen reportes de infestaciones accidentales al sur de estos paralelos (Galletto *et al.*, 1978). El presente reporte acuerda con Chayer *et al.* (1996), donde describe un brote de *Babesia spp.* en novillos en la provincia de Buenos Aires, donde se denota el ingreso de animales de la provincia de Corrientes, donde la parasitación por garrapatas es endémica al norte de la misma.

La babesiosis se caracteriza por presentar hipertermia, mucosas pálidas por la anemia a causa de la hemólisis intravascular, hemoglobinuria y muerte. Varios autores sostienen que la enfermedad es menos severa por *B. bigemina* que por *B. bovis*, aunque provoca más anemia, por eso la hemoglobinuria más marcada que en *B. bovis*. También denota el secuestro de eritrocitos parasitados en los capilares de la materia gris de cerebro (Patarroyo *et al.*, 1982), el mismo produce la adhesión de muchos de los glóbulos rojos parasitados al endotelio de los capilares provocando la obstrucción de los mismos, generando congestión del cerebro como así también en otros órganos como riñón, y así aparecer los signos nerviosos por anoxia, en <5% de los animales afectados. Siendo la muerte generalmente por una coagulación intravascular masiva (Bock *et al.*, 2004)

R. (B.) microplus, denominada "Garrapata común de los bovinos", es un parásito obligado de un solo hospedador, en este caso el bovino, que requiere sangre y líquidos tisulares para su desarrollo. Se encuentra distribuida en casi todas las regiones ganaderas del mundo ubicadas dentro de zonas subtropicales y tropicales (Nava *et al* 2012).

En Argentina, es un parásito endémico distribuido en las zonas del noreste (NEA) y noroeste (NOA) ubicadas al norte de los paralelos 30°-31° S, con excepción de la región andina (Nava *et al* 2012) naturalmente libre por sus condiciones climáticas. Se considera que el área infestada tiene una superficie total de infestación de 74.196.800 ha con una existencia ganadera aproximada de 12.000.000 de cabezas (INTA Mercedes, 2012). Este territorio se denomina zona de lucha y zona infestada de garrapatas (Signorini *et al.*, 1987), para las cuales, se establecen las medidas preventivas y de control, según el artículo 1° del decreto reglamentario 7623/54 de la ley 12566 de SENASA. La distribución está relacionada con factores abióticos que contribuyen al desarrollo y supervivencia del ectoparásito, fundamentalmente humedad, temperatura y características del terreno. De esta manera, el ambiente más favorable es aquel que presenta un déficit hídrico anual <200 mm y un solo mes del año con T° < 15.4°C (Nava *et al* 2012).

Materiales y métodos

Los días 16 y 17 de Enero de 2013, el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE) de INTA Balcarce, realizó dos visitas a un establecimiento ubicado en el partido de Gral. Madariaga, provincia de Buenos Aires (Lat. 36° 44' 39,67", Long. 57° 08' 29,61"), debido a una mortandad ocurrida en un lote de 314 vaquillonas británicas de 30 meses de edad, las cuales se encontraban pastoreando un lote de pastizal natural, desde mediados del mes de noviembre del año anterior. El mismo había sido utilizado por terneros de recría provenientes de dos establecimientos de la provincia de Corrientes (departamentos de San Roque y Lavalle) en el mes de octubre hasta 15 días previos al ingreso de las vaquillonas.

En la primer visita se realizó el examen clínico de siete animales del lote afectado. Se obtuvo de cada uno muestras de sangre para determinación de hematocrito y se realizaron extendidos (frotis) de sangre capilar (periférica) y venosa (central) para la detección de hemoparásitos. Se obtuvo sangre para determinar enzimas hepáticas (GGT y GOT) en suero de uno de los animales. No se realizó necropsia debido que los mismos no presentaban aún signos clínicos definidos, no justificándose el sacrificio de alguno, y aquellos que se encontraban muertos se encontraban en elevado grado de autólisis.

En la segunda visita se observaron 3 animales muertos y 2 en decúbito esternal, los cuales murieron en menos de una hora de inspeccionadas. De estos 2 últimos animales se extrajo sangre para realizar hemograma y frotis de sangre periférica. Se llevaron a cabo tres necropsias: en dos de las mismas se recolectaron órganos frescos para detección de hemoparásitos por microscopía, y órganos en formol al 10% para análisis histológico.



Foto 1: Garrapata adulta *Boophilus* spp. recolectada de un animal por uno de los autores. Hasta el día de la visita se habían registrado 12 muertes. Cabe destacar que el veterinario responsable del establecimiento observó la presencia de garrapatas 10 días antes sobre las vaquillonas problema, durante el diagnóstico de preñez. Las mismas fueron identificadas como *Rhipicephalus (Boophilus) spp* (foto 1). Mientras que durante las visitas no se pudo constatar la presencia del mismo en los animales examinados o muertos.

También se recogieron muestras de órganos para detección de *B. bovis* y/o *B. bigemina* por método de PCR. Se extrajo ADN de cerebro, riñón y bazo por el método convencional de fenol:cloroformo:alcohol:isoamílico. Para la identificación de *B. bigemina* y *B. bovis* se utilizaron dos pares de oligonucleótidos específicos diseñados a partir del gen 18S *rRNA* (BigRaffor CGA GGC CTT TTG GCG GCG TTT ATT AG; BigRafrev ACA AAT CTA AGA ATT TCA CCT CTG AC para *B. bigemina* y BoRaffor CAG GTT TCG CCT GTA TAA TTG AG y BoRafrev CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT para *B. bovis*). El programa de amplificación de la PCR consistió de un período inicial de desnaturalización del ADN a 95° C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95° C por 20 s, 62° C por 30 s y 72° C por 45 s. Finalmente se mantuvo a 72° C durante 5 min.

Además, se amplificó un fragmento del gen *bv80* para realizar una caracterización molecular de la población de *B. bovis*. Para tal fin se utilizaron los oligonucleótidos

específicos Bv80F TGT GTT AAT GTA ACT CAG CCC G y Bv80R aaa gcc tgt tag ttg atg gac c. El programa de amplificación para el gen bv80 consistió de un período inicial de desnaturalización del ADN a 95° C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95° C por 20 s 58° C por 30 s y 72° C por 45 s, finalmente se mantuvo a 72° C durante 5 min.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl de una mezcla que contenía 1x buffer PCR Promega® (50mM Tris-HCl; 50mM NaCl), 2,2 mM de MgCl₂, 0,008 mM de cada oligonucleótido y 2,5 U de Go-Taq polimerasa (Promega®). Con cada reacción de PCR, se incorporó una muestra para el control de contaminación, a la que no se adicionó ADN y controles de ADN de *B. bovis* y *B. bigemina*. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5%.

Los productos amplificados obtenidos con el gen bv80, se purificaron mediante un kit comercial (Promega®) y se enviaron a secuenciar al servicio de secuenciación Ibiotec - Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación de ADN (SIGYSA), INTA-Castelar (Buenos Aires). Las secuencias resultantes se alinearon mediante el software Bioedit® y se compararon con secuencias de referencia de *B. bovis* (cepas vacunal BboR1A; cepas patógenas BboM2P y BboS7P y de aislamientos naturales BboL17 y BboL15) y de *B. bigemina* vacunal BbiS1A y patógena BbiS2P provenientes del Laboratorio de Inmunología y Parasitología, INTA EEA-Rafaela.

Se obtuvieron registros de temperatura media diaria del Servicio Meteorológico Nacional (SMN) correspondientes a Villa Gesell, de los meses de octubre, noviembre y diciembre del 2012, y enero y febrero del 2013.

Resultados

En el examen clínico el día 16/01, se observó ligera palidez de las mucosas, leve decaimiento, disnea y taquipnea, con temperatura rectal elevada (41 a 42,5 ° C). Los hematocritos resultaron en un rango de 25 a 35 %. De los frotis de sangre periférica, en dos animales se observaron estructuras piriformes basofílicas en el interior de los eritrocitos, compatibles con *Babesia spp.*

El día 17/01, durante la segunda visita, los dos animales en decúbito esternal, presentaban palidez de mucosas, disnea, agitación, debilidad y decaimiento.

Las lesiones macroscópicas en las tres necropsias evidenciaron, marcada esplenomegalia (foto 2) con hemorragias petequiales subcapsulares diseminadas. Se apreciaban riñones de color rojo vinoso y vejiga con orina de color rojo oscuro (foto 3) con engrosamiento y edema de las paredes en uno de los animales. También se observó leve hepatomegalia. Los valores de hematocritos fueron de

12,5% y 17% y los valores de hemoglobina de 4 y 5,5 gr% respectivamente. En frotis de sangre periférica, así como en las improntas de corteza cerebral, se observaron estructuras piriformes basofílicas en el interior de los eritrocitos, compatibles con *Babesia* spp (foto 4). Cabe destacar la alta parasitemia que se presentaba en los capilares del cerebro (foto 5). Las muestra fueron remitidas al Laboratorio de Parasitología e Inmunología de la EEA INTA Rafaela, donde fueron identificadas como *B. bovis*. Entre los hallazgos histopatológicos destacaron nefrosis tubular severa, hepatitis linfocítica periportal leve, con degeneración centrolobulillar severa. La observación de material proteináceo dentro de los túbulos renales, degeneración presente en los hepatocitos y células epiteliales de los túbulos renales, podría esperarse en casos de crisis hemolítica. Se denotó también un puntillado basofílico en el interior de eritrocitos en capilares del SNC, riñón e hígado.



Foto 2: Esplenomegalia. Se observó en las 3 necropsias realizadas.



Foto 3: Riñon rojo vinoso y jeringa con orina color roja oscura extraída de vejiga.

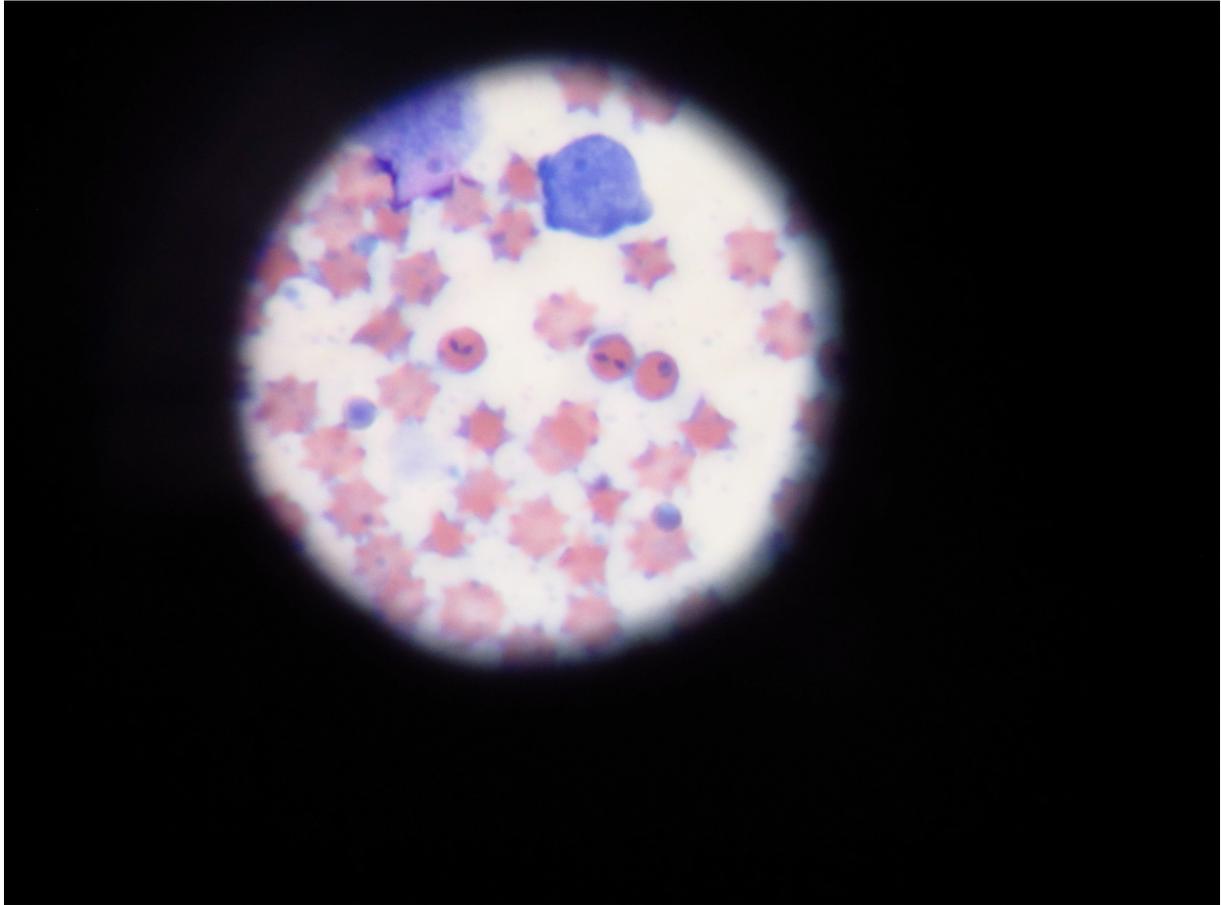


Foto 4: Estructuras piriformes basofílicas en el interior de los eritrocitos, compatibles con *Babesia* spp. en frotis de sangre periférica.

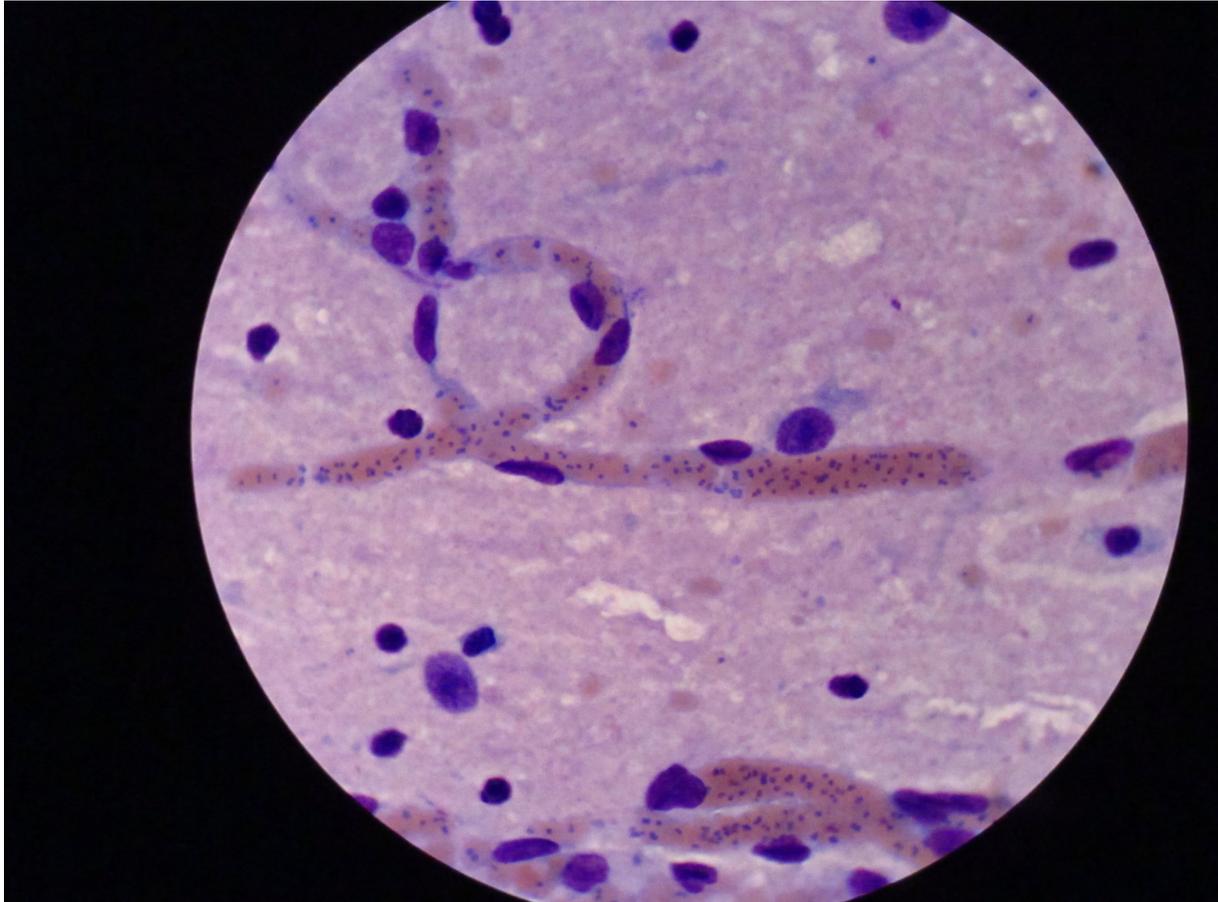


Foto 5: Parasitemia en glóbulos rojos de capilares del SNC. En las reacciones de PCR de las muestras analizadas de cerebro, bazo y riñón sólo se amplificó ADN de *B. bovis* siendo negativas las reacciones específicas para ADN de *B. bigemina*. El tamaño de los fragmentos del gen *bv80* que se amplificaron de las muestras de cerebro y bazo variaron entre 700 y 850 pb. Esta variación indicaría la presencia de dos poblaciones genéticamente diferentes de *B. bovis* en las muestras analizadas. En la comparación de las secuencias con cepas y aislamientos de *B. bovis* de referencia, no se encontró similitud genética con ninguna de ellas.

Discusión

La inspección clínica, los hallazgos macro y microscópicos, y la presencia del hemoparásito en los frotis de sangre periférica y en los extendidos de cerebro, y la detección de material genético mediante la prueba de PCR nos conducen al diagnóstico final de babesiosis bovina por *B. bovis*.

La presencia de la garrapata común del bovino (*R. (B.) microplus*) fue considerada imprescindible para la transmisión de *B. bovis* y posterior ocurrencia del brote, ya que se descartó el mecanismo iatrogénico de transmisión por mal uso de vacunas vivas debido que en el establecimiento nunca se realizó la misma.

La presencia de *R. (B.) microplus* en una zona libre del parásito se debe usualmente por el ingreso de animales portadores desde zonas infestadas, como habría ocurrido en este caso, aunque el mismo no se pudo constatar. Esto pudo producirse por fallas en los puntos de control sanitario, enmarcados en la ley de lucha obligatoria contra la garrapata" [Nº 12566], precedida o no por un inadecuado control químico del parásito (fallas en la dosificación y frecuencia de baños/aplicaciones, resistencia antiparasitaria) o por negligencia del/o los productor/es, evadiendo los controles.

Guglielmone (1992), clasificó a la Argentina en 3 regiones de aptitud para el desarrollo de la garrapata común de acuerdo a las características climáticas (T° media mensual y déficit hídrico), la carga parasitaria observada y el nivel de anegamiento del suelo: zona favorable, intermedia y desfavorable. En el gráfico 1 se pueden observar las regiones citadas, y además la zona libre y la zona erradicada (también llamada indemne). Estudios realizados con modelos de simulación climática, estimaron que aumentando 2° la T° media y elevando en un 40% las precipitaciones promedio, se establecería un riesgo real de introducción y, en ciertos casos, se podría producir el establecimiento del parásito hasta los 33° de latitud sur dentro de la provincia de Buenos Aires (Estrada Peña et al. 2006). Esta latitud se encuentra aproximadamente a nivel de la ciudad de Buenos Aires.

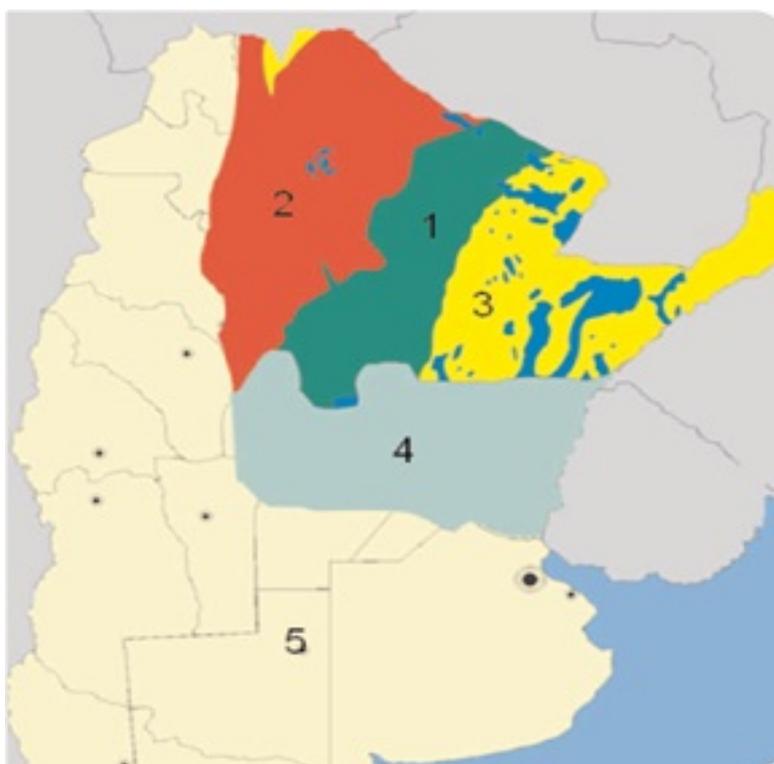


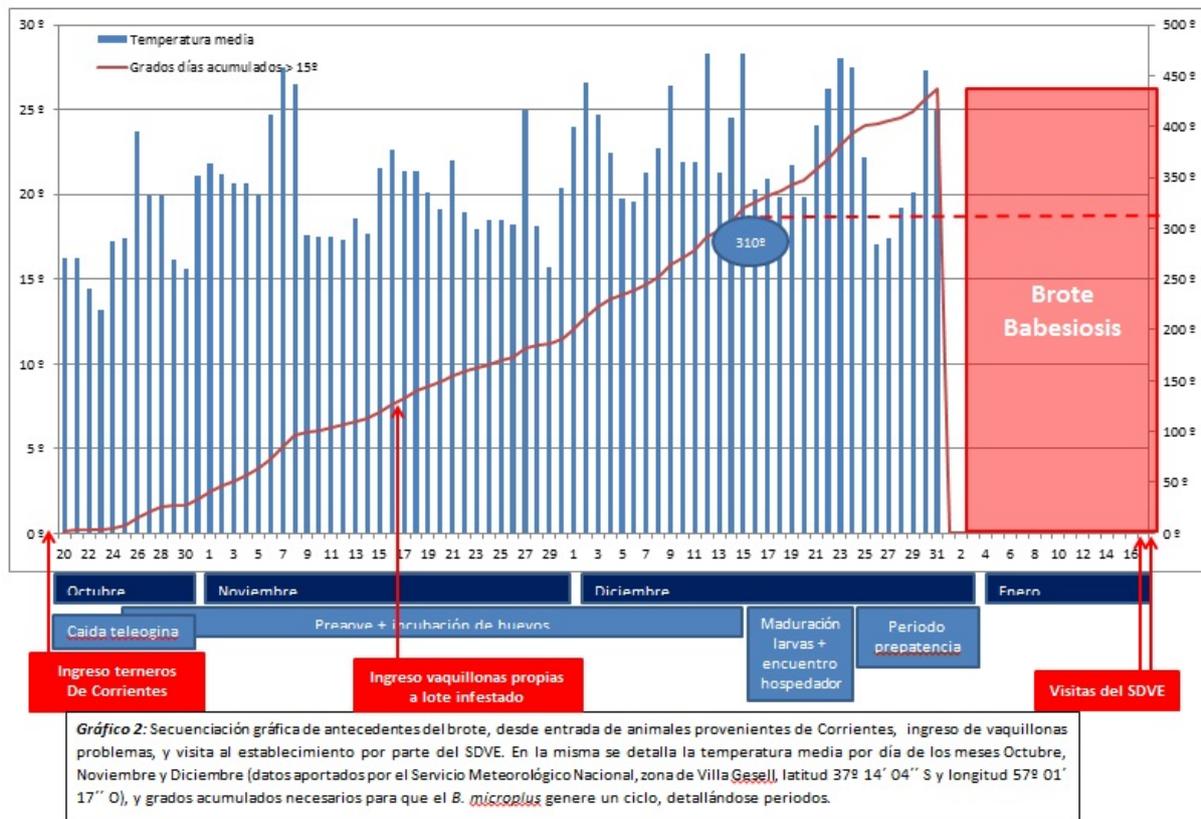
Gráfico 1. Áreas de aptitud ecológica de *Rhipicephalus microplus* en Argentina. 1)- Área intermedia: Déficit hídrico anual <200 mm; 3-4 meses del año con $T^{\circ} < 15.4^{\circ}\text{C}$. 2)- Área intermedia: Déficit hídrico anual <200- 500 mm; 3-4 meses del año con $T^{\circ} < 15.4^{\circ}\text{C}$. 3)- Área favorable: Déficit hídrico anual <200 mm; 1 mes del año con $T^{\circ} < 15.4^{\circ}\text{C}$. 4)- Área erradicada por la campaña de lucha contra la garrapata. 5)- Área naturalmente libre. En azul se indican las zonas de anegamiento. Adaptado de Nava et al. 2012. Se considera endémica la zona ubicada al norte de los 30° de latitud sur. Esporádicamente, se presentan brotes de infestación por garrapata en zonas libres del país debido al ingreso de bovinos de zonas infestadas (Galletto et al. 1978) ocurriendo un caso particular en Buenos Aires descrito por Chayer et al. (1996).

El establecimiento de Gral. Madariaga se encuentra en la zona libre desfavorable, con más de 4 meses con temperaturas medias por debajo de los 15°C (Nava et al 2012); por lo cual, una población de *R. (B.) microplus* no se podría establecer y perpetuar en el tiempo. Sin embargo, si caen teleoginas de *R. (B.) microplus* en los meses de octubre-noviembre, cuando las temperaturas medias son superiores a los 15°C , los huevos pueden eclosionar y dar lugar a una población de larvas de *R. (B.) microplus*, suficientes como para desencadenar un brote de babesiosis si están infectadas.

La vía de transmisión directa de *R. microplus* de un animal infestado a otro es prácticamente nula, siendo el acceso a pasturas contaminadas con el ácaro la principal fuente de infestación (Nuñez et al. 1982), sugiriendo este mecanismo de transmisión el que pudo haber ocurrido en el presente reporte. Se sospecha por lo tanto, que al pasar anteriormente por el lote, los terneros infestados provenientes de Corrientes lo contaminaron (Gráfico 2), y al ingresar las vaquillonas se infestaron del ambiente. Generándose el brote en los animales nativos de la zona sin experiencia inmunológica contra *B. bovis*.

La introducción de los animales infestados con garrapatas se produjo en un momento favorable del año, última semana de octubre, cuando se comienzan a registrar temperaturas más elevadas en esta zona y la teleogina desprendida puede continuar su ciclo de vida libre en la pastura. Según diversos autores, la suma térmica (grados días por encima del umbral de desarrollo) necesaria para que la garrapata complete el pre aove y la incubación de los huevos es de 310°C (Vega et al. 1985, Spath et al. 1994). Dicha suma, se consigue rápidamente en zonas favorables (ej: Formosa), en donde se pueden registrar hasta 5 ciclos al año (Ivancovich et al. 1975). El ciclo de vida libre de la garrapata, a diferencia del ciclo parasitario, está directamente influido por los factores climáticos, dicho ciclo tiende a alargarse a medida que las T° medias bajan y se acercan a los 15°C , para

detenerse con T^0 medias inferiores a ésta. Como se detalla en el gráfico 2 de los 85 días en cuestión permite completar el ciclo de la garrapata, solo existiendo 2 días con temperaturas menores de 15° .



La PCR fue útil como técnica complementaria al diagnóstico mediante la observación con microscopio de extendidos de sangre, ya que permitió confirmar la presencia de *B. bovis* y la ausencia de *B. bigemina* en las muestras de tejido analizadas. Por otra parte, las secuencias del gen bv80 permitieron corroborar la presencia de una mezcla de poblaciones genotípicamente diferentes, tal como ha sido demostrado por otros autores en aislamientos de *B. bovis* (Perez-Llaneza et al., 2010; Lau et al., 2010; Baravalle et al., 2012).

Conclusión

Tanto la estación del año como las particularidades climáticas de cada año, deben tomarse en cuenta, a fin de evaluar el riesgo de introducción de la garrapata a zonas libres (Estrada et al. 2006). La tasa de infección de *R. (B.) microplus* por *Babesia* spp., en la zona endémica, depende de la cantidad de garrapatas y de bovinos portadores presentes en el medio, sujetas a su vez de las condiciones climáticas (Guglielmone 1995). Las temperaturas bajas invernales de la zona de General Madariaga conducirían a la muerte de una proporción muy elevada de las garrapatas introducidas en el campo, por lo cual se puede concluir que el riesgo de establecimiento del parásito sería nulo. De todos modos, en un escenario donde los

cambios climáticos se suceden rápidamente (Estrada et al. 2006), deben extremarse las medidas de control del tráfico de animales.

La cuenca del salado representa una gran reserva del stock ganadero nacional, y la introducción del parásito y las enfermedades producidas por el mismo, pueden generar un profundo impacto económico y productivo para el país.

Agradecimientos

A los Dres. Anselmo Odeón y Carlos Campero por la lectura crítica y las sugerencias realizadas en el presente trabajo. A Silvia Bordón, Jefa de Departamento BNM, SMN, por los datos de temperatura media brindados.

Bibliografía

- BOCK R, Jackson L, De Vos A, Jorgensen W (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129, S247-S269
- CANESTRINI (1888). Bioecología de la garrapata del ganado, *Boophilus microplus*
- CHAYER R, Cosentino B, Carcaino M, Campero C, Späth E (1996). Brote de babesiosis en bovinos de la provincia de Buenos Aires. *Revista Therios* N°127 Vol. 25: 4-12
- ESTRADA-PEÑA A, Corson M, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone A (2006). Changes in climate and habitat suitability for the cattle tick *Boophilus microplus* in its southern Neotropical distribution range. *Journal of Vector Ecology* 31(1):158-167.
- GALETTO CG, Corbellini CN, Miquet JM, Blanco Viera FJ, Vena MM, Dorsi J (1978). Brote de babesiosis en zona libre de garrapatas. *Rev. Med. Vet.* 59: 87-90
- GUGLIELMONE AA (1992). The level of infestation with the vector of cattle babesiosis in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87, Suppl. III, 133-137.
- GUGLIELMONE AA (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, 57:109-119.
- GUGLIELMONE A, Mangold AJ. "Garrapata común de los bovinos".
- NAVA S, Mastropaolo M, Mangold AJ (2012). Guía para el control de los parásitos externos en bovinos de carne del área central de la Argentina. Ficha técnica n° 5. INTA Rafaela.
- NUÑEZ JL, Muñoz Cobeñas M, Moltedo H (1982). *Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno. Hemisferio Sur Buenos Aires 184 pp.
- PATARROYO JH, Vargas MI, Bicudo PL (1982). Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. *Veterinary Parasitology*, vol 11, 4:301-308.

SPÄTH EJA, Guglielmone AA, Signorini AR, Mangold AJ (1994). Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. 1ra a 4ta parte. Therios. 23, 341-539.

SIGNORINI AR, Mattos CE (1987). Hechos sobresalientes en la historia de la erradicación de la garrapata en la Republica Argentina. Consideraciones sociales, socioeconómicas y Legales. La erradicación de las garrapatas. Actas de la Consulta de Expertos sobre la Erradicación de las Garrapatas con Referencia Especial a las Américas. México, D. F. Estudio FAO. Producción y Sanidad Animal. N° 75. 28-44.

VEGA de la R, Diaz G. (1985). Aplicación de las constantes térmicas en el control de la garrapata del ganado vacuno (*Boophilus microplus*). I. Cálculo de las constantes térmicas. Rev. Salud Anim. (Cuba) 7:141-148.
