

PRUEBAS PRELIMINARES DE INMUNOSUPRESION EXPERIMENTAL DE BOVINOS PARA INCREMENTAR LA PARASITEMIA POR *Babesia bovis*^a

Carlos Ramón Bautista Garfias^b

Sergio Dario Rodríguez Camarillo^b

Antonio Morilla-González^c

RESUMEN.

Con objeto de incrementar la parasitemia en bovinos infectados con *B. bovis*, se evaluaron tres tratamientos. En una primer prueba, se hicieron pases seriados de una cepa de campo de *B. bovis* en cuatro terneros esplenectomizados sin obtener ningún incremento en el porcentaje de eritrocitos parasitados. En la segunda prueba se llevaron a cabo pases seriados, de la misma cepa, en terneros como sigue: un animal fue tratado con dexametasona durante tres días preinfección; otro mas fue tratado con dexametasona cuando presentó los signos clínicos, un tercero se trató diariamente con ciclofosfamida por cinco días preinfección. Solamente en el animal tratado con dexametasona, previo a la infección, se incrementó la parasitemia 22 % en el día seis postinfección. La tercera prueba consistió en tratar diariamente un animal adulto con dexametasona desde tres días antes y durante los períodos prepatente y patente de la infección con la cepa KBb, alcanzando éste 18 % de parasitemia. Se concluye que los mejores métodos para incrementar la parasitemia consisten en tratar con dexametasona antes de la infección o alternativamente dando un tratamiento previo y continuándolo durante la infección.

Palabras Clave: Babesiosis, *Babesia bovis*, Inmunosupresión, Bovinos.

Tec. Pecu. Méx. Vol. 32 No. 1, (1984)

Los estudios básicos acerca de la babesiosis bovina se han dificultado, en parte, debido a que no se cuenta con cantidades suficientes de antígenos apropiados para establecer diversas pruebas de laboratorio que permitan conocer la respuesta fisiológica del hospedero en esta enfermedad. Los antígenos que con más frecuencia se han utilizado son los obtenidos a partir de eritrocitos parasitados; sin embargo, el grado de parasitemia que alcanzan los bo-

vinos infectados experimentalmente, con cepas de campo de *Babesia bovis*, es por lo general menor al 2 %.

Por otra parte, los cultivos *in vitro*, tanto de *B. bovis* como de *B. bigémina* requieren ser perfeccionados (1,2) con objeto de poder obtener antígenos en cantidades adecuadas; además de que aún en los laboratorios con experiencia en el mantenimiento *in vitro* de estos parásitos, se llegan a perder los cultivos en ocasiones, debido a fallas técnicas del personal encargado del mantenimiento, lo que implica pérdida de tiempo y el tener que reiniciar dichos cultivos (información del segundo autor).

Una de las estrategias seguidas para resolver el problema de las parasitemias bajas por especies de *Babesia* u otros hemoprotozoarios, consiste en inmunosu-

a Recibido para su publicación el 8 de noviembre de 1993.

b CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP-SARH, A. P. 206 CIVAC, C.P. 62500, Edo. de Morelos, México

c CENID-Microbiología, INIFAP-SARH, A.P. 41-652, Cuajimalpa, C.P. 05110, D.F., México.

Para solicitud de sobretiros dirigirse al segundo autor.

primir a los hospederos por medio de diferentes métodos, como son el uso de sustancias inmunosupresoras (por ejemplo, ciclofosfamida, corticoesteroides), la esplenectomía, o bien ésta más la administración de corticoesteroides (3,4,5,6,7). Con dichas técnicas se han obtenido resultados variables que dependen, en gran medida, de la especie de hospedero utilizada. En este orden, la administración de corticoesteroides a bovinos esplenectomizados durante tres a cinco días antes de la infección con *Babesia bigémina*, puede inducir parasitemias hasta del 25 % (6); mientras que, la administración de beta-metasona a roedores con bazo, antes de la infección con *B. microti* o *B. rodhaini*, provoca parasitemias superiores al 25 % y de mayor duración que en los bovinos (7). Con *B. bovis*, pocos estudios de este tipo se han llevado a cabo (8) y no hay informes publicados sobre el empleo del cultivo *in vitro* de cepas mexicanas, como inóculo, en individuos inmunosuprimidos. El objetivo del presente trabajo, fue tratar de incrementar la parasitemia por *B. bovis in vivo*, a través de los métodos siguientes: a) pases seriados del parásito en bovinos esplenectomizados; b) inoculación en animales que fueron inmunosuprimidos por medio de la esplenectomía y el tratamiento con corticoesteroides o ciclofosfamida.

Los tratamientos empleados fueron como sigue: en el primero de ellos, se llevaron a cabo pases en cuatro becerros, cruce de Holstein, de seis meses de edad, esplenectomizados. Se hicieron pases seriados en cada uno de los animales con sangre infectada con una cepa de campo de *B. bovis* (origen bovino y 1 % de parasitemia), transfiriendo 20 ml en cada pase por vía intravenosa (i.v.). A cada bovino se le practicaron determinaciones de temperatura corporal, porcentaje de parasitemia (por medio de frotis de sangre capilar periférica, teñidos con el colorante de Giemsa) y concentración de eritrocitos (hematocrito). Se observó que el período

de incubación promedio posinfección en los cuatro animales, fue de tres días, en que empezó la elevación de la temperatura corporal a más de 39.5 C. Las parasitemias máximas observadas (2 - 4 días posinfección) en los becerros 1, 2, 3 y 4 fueron de 2 %, 1.2 %, 2 % y 3 %, respectivamente.

El segundo tratamiento consistió en pases en cinco animales, cruce de Holstein o Pardo Suizo, de seis meses de edad, tratados con medicamentos inmunosupresores y transfusión de sangre. El bovino A, fue utilizado solamente para reactivar el inóculo (20 ml de sangre con 1 % de parasitemia de la cepa de campo, origen bovino). El animal B recibió 80 ml de sangre infectada del animal A y cuando enfermó, se le administraron dos litros de sangre normal de bovino, colectada en solución de ácido cítrico-citrato-dextrosa (ACD). El animal C fue tratado con dexametasona (Dx) (*Azium*, laboratorios *Schering*, presentación de 2 mg/ml), a razón de 0.5 mg/kg de peso corporal durante tres días consecutivos antes de ser inoculado (día 0) con 300 ml del animal B. El becerro D, fue inoculado con 80 ml del animal A, y al enfermar se le administraron dos litros de sangre de bovino normal; cuando se encontró postrado, fue tratado con Dx una sola vez (0.5 mg/kg de peso corporal). El bovino E fue tratado con ciclofosfamida (Cy) (*Cyrtoxan*, laboratorios *Astra*) por vía i.v., a razón de 7.5 mg/kg de peso corporal, diariamente por cinco días antes de ser inoculado en el día 0 con 300 ml de sangre infectada del animal D. A los becerros tratados con Dx y Cy se les determinó la biometría hemática y además, para evitar infecciones secundarias, fueron inyectados, cada uno, con 15 ml de sulfadimidina sódica (*Vetsulfa*, laboratorios *Wieth Vales*, S.A.) por vía i.v., cada tercer día. En este tratamiento, el bovino B mostró una parasitemia del 7 % y, al administrarle los dos litros de sangre, el animal sobrevivió cuatro horas más, alcanzando una parasitemia del 11 %. En el

animal C, se observaron hemoparásitos al segundo día postinfección (p.i.). Al sexto día p.i. el bovino presentó una parasitemia del 18 % y encontrándose a punto de morir, por lo cual, se le administraron dos litros de sangre normal. Con esto, el animal sobrevivió seis horas más, momento en que alcanzó una parasitemia del 22 %, muriendo poco tiempo después. El becerro D alcanzó una parasitemia del 2 %, y encontrándose echado cuando se le administró la Dx; posteriormente el animal se levantó, manteniéndose así por espacio de seis horas, observándose cierta mejoría; sin embargo, la parasitemia en ningún momento rebasó el 2 %. El animal E, tratado con Cy, mostró una marcada leucopenia, debido a que los neutrófilos disminuyeron de $6583/\text{mm}^3$ antes de la administración del medicamento, a $118/\text{mm}^3$ 17 días después de ésta. El becerro mostró una parasitemia del 1 % y fue tratado con diaceturato de 4,4-diazo-amidobenzamida (*Ganaseg*, laboratorios *Squibb*) en el quinto día postinoculación de *B. bovis* para evitar que muriera.

En el tercer tratamiento se utilizó un bovino de raza Holstein, de aproximadamente tres años de edad y 400 kg. de peso corporal. Este, fue tratado con Dx a razón de 0.075 mg/kg de peso corporal, desde tres días previos a la infección y durante todo el curso de ésta. El inóculo consistió de 2.5 ml de paquete celular proveniente de cultivo *in vitro* de *B. bovis*, cepa KBb (9), con una parasitemia de 10 % (aproximadamente 10^8 eritrocitos infectados). El bovino apareció positivo al frotis de sangre periférica a las 48 hs. y para el cuarto día alcanzó 2 % de parasitemia; al octavo día alcanzó 18 %. Al inicio del tratamiento con Dx (día 3) el animal presentó 35 % de hematocrito, valor que descendió a 14 % al octavo día. El animal comenzó a mostrar signos clínicos severos hasta el día, cuando ya presentaba parasitemia de 3 %, hematocrito de 22 % y temperatura de 40 C. Al octavo día, se obtuvieron dos litros de sangre de la vena

yugular del animal y se le dio tratamiento (*Ganaseg* y suero glucosado); sin embargo, éste murió.

En el presente estudio, sólo fue posible elevar la parasitemia de manera significativa en dos animales, el tratado con Dx durante tres días consecutivos antes de la infección, y el animal adulto tratado por tres días previos y durante el período de la presencia de signos clínicos, resultados que concuerdan con los de otros investigadores (6,10). Sin embargo, otros autores informan que no han podido incrementar la parasitemia en animales tratados con los medicamentos utilizados en el presente trabajo (11,12), lo cual puede deberse a la heterogeneidad genética de los animales, lo que implica variaciones en la susceptibilidad (12).

La utilización de la Dx en un bovino ya infectado tuvo efectos similares a los de la noradrenalina en perros inoculados con *B. canis* y monos con *Plasmodium knowlesi*, en los que se atenúan temporalmente los signos clínicos de los animales, pero éstos no se curan (13).

Por otro lado, la transfusión de sangre fresca para incrementar la parasitemia fue útil, ya que el hecho de sobrevivir los animales unas pocas horas más, da oportunidad a *B. bovis* (que se encuentra multiplicándose activamente) de infectar otros eritrocitos. En relación a la dinámica de la parasitemia, el inicio de la curva de crecimiento fue similar a la de otros microorganismos y probablemente corresponda a una curva sigmoide. Dicho resultado sugiere que si se pudiera extender el período de supervivencia de los animales por 24 horas más, que correspondería a la fase logarítmica de multiplicación de *B. bovis*, se obtendría una parasitemia más elevada. El uso de parásitos que han sido mantenidos en cultivo *in vitro* y aparentemente atenuados [atenuación que se observa en animales intactos e inmunocompetentes (12)], como inóculo en el animal adulto inmunosuprimido, para obtener altas parasitemias *in vivo*, se informa

por vez primera. Asimismo, aún cuando la dosis de inóculo usada en este animal fue muy grande, el animal se mantuvo aparentemente normal cuando ya se presentaba una parasitemia contable (5° día; parasitemia del 2.5 %). Este dato junto con el uso de la Dx indican que la ausencia de signos clínicos severos es esencial para obtener una alta parasitemia en los animales infectados, tal como lo señalaron Wright *et al* (14). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugieren la evaluación de los procedimientos descritos para la obtención de altas parasitemias, pero utilizando como inóculo cantidades constantes de parásitos mantenidos *in vitro*, así como un mayor número de unidades experimentales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal del proyecto Babesiosis del CENID-PAVET, INIFAP-SARH, el haber proporcionado la cepa KBb de *B. bovis* así como su participación en el manejo de los animales.

SUMMARY

In order to increase the parasitemia in *Babesia bovis*-infected bovines, several procedures were followed. In the first attempt, serial passages of *B. bovis* (field strain) were carried out in four splenectomized calves without obtaining any enhancement of the percentage of parasitized erythrocytes (PPE). A second attempt was done through serial passages in calves which were treated as follows: one animal was treated with dexamethasone (Dx) during three days before infection (b.i.) with *B. bovis*; another animal was treated with Dx when sick and a third one was treated daily with cyclophosphamide (Cy) during five days b.i. There was an increase of the PPE up to 22 % by day six after infection only in the animal treated with Dx b.i. In the third trial, an adult bovine treated three days before and during infection with Dx reached a PPE of 18 by day eight after infection with the KBb strain. According to our results and previous reports in the literature, the best method to increase the PPE by *B. bovis* in calves, is the treatment of the animals with Dx before infection, alternatively, treatment before inoculation and during the course of disease also yields good results.

Key Words: Babesiosis, *Babesia bovis*, Immunosuppression, Bovines.

REFERENCIAS

- 1.- OIE. Resolución N° XI. Sesión General, 22-26 de mayo 1986. Enfermedades parasitarias Internas con Respecto a la respuesta inmune. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epix., 1990; 9:599
- 2.- Pudney M. Cultivation of Babesia. En: Dolan T T. Recent Developments in the Control of Anaplasmosis, Babesiosis and Cowdriosis: Proceedings of a Workshop Held at ILRAD, Nairobi, Kenya, 13-15 May 1991. Nairobi: The International Laboratory for Research on Animal Diseases. Kenya. 1992:129-140.
- 3.- Herman R. Shiroishi T. *Plasmodium gallinaceum*: selective immunosuppression by cyclophosphamide in preerythrocytic malaria. Exp. Parasitol. 1973; 34:295.
- 4.- Spira D T. Golenser J, Zuckerman A, Neiss R. Multiples modes of action of cyclophosphamide on plasmodial infection in rats. Trans. Roy. Soc. Trop. med. Hyg. 1972; 66:921.
- 5.- Todorovic R, Ferris D, Ristic M. Role of the spleen in acute plasmodial and babesial infections in rats. Exp. Parasitol. 1967; 21:354.
- 6.- Todorovic R, Kuttler K L. A babesiosis card agglutination test. Am. J. Vet. Res. 1974; 35:1247.
- 7.- Young A S, Cox F E G. The effect of betamethasone on *Babesia microti* and *B. rodhaini* infections in rodents. Parasitology 1971; 63:447.
- 8.- Callow L L, Parker R J. Cortisone induced relapses in *Babesia argentina* infections of cattle. Aust. Vet. J. 1969; 45:103.
- 9.- Rodríguez S D, Buening G M, Green T J, Carson C A. Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. Inf. Immun. 1983; 42:15.
- 10.- Callow L L, Mellors L T, A new vaccine for Babesia argentina infection prepared in splenectomized calves. Aust. Vet. J. 1966; 42:464.
- 11.- Garza J, Osorno M. Observaciones sobre el efecto de un corticosteroide sintético sobre la aparición de *Babesia bigemina* en bovinos inoculados experimentalmente. Resúmenes de la XII Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias de la SAG. 1975; 17-20 de marzo, México.
- 12.- Morilla G. A. Inmunología de la babesiosis. Ciencia Veterinaria. Moreno Chan R (ed.) UNAM 1981; 3:239-275.
- 13.- Maegraith BG, Giles HM, Devaulk K. Pathological processes in *Babesia canis* infections. Z. tropenmed. Parasitol. 1975; 8:485.
- 14.- Wright I G, Goodger B V, Clark I A. Immunopathophysiology of *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum* infections. Parasitol. Today 1988; 4:214.