

**Evaluación de indicadores de babesiosis bovina en garrapatas *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* y bovinos de 3 a 9 meses de la zona del Magdalena Medio
colombiano, 2010**

Sandra Ríos Tobón

**Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Medellín, Colombia
2011**

**Evaluación de indicadores de Babesiosis bovina en garrapatas *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* y bovinos de 3 a 9 meses de la zona del Magdalena Medio
colombiano, 2010**

Sandra Ríos Tobón
Tesis para optar al título de Magister en Microbiología y Bioanálisis
Línea de Investigación: Microbiología Veterinaria

Tutor de tesis:
Leonardo Alberto Ríos Osorio, PhD

Miembros del Comité tutorial:
Lina Andrea Gutiérrez Builes, PhD
Luis Guillermo Palacios Baena, PhD

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Medellín, Colombia
2011

Evaluación de indicadores de babesiosis bovina en garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y bovinos de 3 a 9 meses de la zona del Magdalena Medio colombiano, 2010

Sandra Ríos Tobón¹

¹Estudiante de maestría, Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, CL 67 # 53 – 108 Bloque 5 Oficina 437, Medellín, Colombia.

RESUMEN

La babesiosis bovina es una infección causada por un hemoparásito del género *Babesia*, transmitido por garrapatas, cuya presencia en América Latina está relacionada directamente con la presencia del vector *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, que está condicionada por factores ambientales. La región del Magdalena Medio colombiano es una región con vocación ganadera en la cual la babesiosis bovina se comporta de forma endémica, sin embargo, no hay estudios que evidencien el comportamiento del ciclo de transmisión de la babesiosis bovina. El objetivo de esta investigación fue establecer el comportamiento de algunos indicadores entomológicos y parasitológicos de la infección por *Babesia* sp en bovinos y garrapatas y el grado de infestación por garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* capturadas de bovinos entre 3 y 9 meses de edad pertenecientes a 9 hatos del Magdalena medio colombiano. Se diseñó un estudio de tipo descriptivo representativo no probabilístico, el número de terneros muestreados fue de 237, a los cuales se les extrajo sangre periférica y garrapatas hembras adultas engurgitadas para su posterior análisis en el laboratorio por medio de técnicas directas microscópicas y moleculares con el objetivo de detectar la infección por *Babesia* sp. encontrándose en bovinos una positividad para *Babesia bigemina* del 59.9% y para la infección mixta (*B. bovis* + *B. bigemina*) del 3.4%, no se encontró positividad para *B. Bovis* como único agente. Los resultados obtenidos por medio de la amplificación de ADN fueron proporcionalmente mayores con respecto a los obtenidos por medio de la evaluación microscópica, por lo que los datos finales

fueron analizados con base en el resultado de la PCR múltiple. En garrapatas, de un total de 770 especímenes capturados, se analizó su hemolinfa por medio de técnicas directas microscópicas y moleculares. El grado de infestación total de la zona fue de 3,2 garrapatas por cada bovino. Los terneros de 6-7 meses presentaron el mayor grado de infestación con 4,7 garrapatas por cada bovino. El porcentaje total de garrapatas positivas para *B. bigemina* fue de 79.2% y para infección mixta de 9.4%. Se estableció una correlación positiva entre las frecuencias de tiempo mayores del baño garrapaticida y la carga parasitaria en los bovinos (Rho: 0.168 y p=0.010). Se puede inferir entonces que una periodicidad de 90 días o más para tratamientos garrapaticidas en zonas con estabilidad enzoótica para babesiosis bovina se configura como un factor abiótico que favorece la adquisición de inmunidad protectora en bovinos desde temprana edad, influyendo de forma positiva sobre el control natural de la infección y la consecuente ausencia de signos y síntomas de enfermedad a través del tiempo. Igualmente se concluye que existe la necesidad de realizar monitoreo del ciclo de vida de la babesiosis bovina, no sólo en lo referido a los aspectos inmunológicos del bovino sino incluir nuevos indicadores tanto entomológicos como parasitológicos que den cuenta de la complejidad del fenómeno, buscando su comprensión, y la inclusión de técnicas moleculares, más sensibles para la detección de infección en garrapatas y bovinos, además de su aporte en la discriminación de especie.

INTRODUCCIÓN

La Babesiosis bovina es una enfermedad causada por un parásito protozooario intraeritrocítico del orden Piroplasmida, phylum *Apicomplexa*, género *Babesia*, que se encuentra ampliamente distribuido en países tropicales y subtropicales (Alonso, Arellano-Sota et al. 1992). *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* son las especies que causan con mayor frecuencia esta enfermedad en bovinos y son transmitidas en América latina por garrapatas del género *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Ravindran et al. 2006), ectoparásitos distribuidos en todo el mundo que infestan

alrededor del 80% de los bovinos, causando pérdidas cercanas a los 3.000 millones de dólares anuales (Melendez and Forlano 1996)

La condición de endemidad de la babesiosis bovina en una región geográfica está determinada por la presencia del vector y su capacidad para transmitir el parásito; donde se establece una relación entre la garrapata, el parásito y el bovino, entendida como estabilidad enzoótica, situación ideal en una región en la que los bovinos están infectados y presentan infestación por garrapatas, en niveles que permiten generar una inmunidad protectora en ausencia de signos y síntomas compatibles con la enfermedad. (Alonso, Arellano-Sota et al. 1992)

En estas zonas endémicas, los terneros generalmente se infectan durante los primeros meses después del nacimiento, período durante el cual poseen una fuerte inmunidad innata (Barros, Madruga et al. 2005) Siguiendo a la recuperación de la parasitosis aguda, los animales jóvenes pueden desarrollar una forma subclínica de la infección que dura varios meses y se establece como un reservorio del parásito para el vector (Oliveira, Oliveira-Sequeira et al. 2008). Esta situación tradicionalmente se ha evaluado mediante la determinación de anticuerpos tipo IgG en bovinos de 3 a 9 meses de edad, obviando los demás factores asociados con la caracterización de una zona estable o inestable enzoóticamente, como son los indicadores entomológicos y parasitológicos de infección en el vector y en el bovino, el grado de infestación en el bovino y en la zona, que permiten reconocer el comportamiento de la babesiosis bovina desde los diferentes elementos que hacen parte de su ciclo de vida. (Melendez and Forlano 1996; Cantu, Ortega et al. 2007)

En una región endémica para babesiosis bovina en Colombia la presencia del vector y el parásito está determinada por las condiciones geográficas y ambientales como altura inferior a los 2200 m.s.n.m., temperatura entre 28°C y 32°C y una humedad relativa de 80 al 90% (Alonso, Arellano-Sota et al. 1992).

La región del Magdalena Medio colombiano es una región geográfica caracterizada por una zona de vida de bosque húmedo tropical, con una temperatura media de 27°C y

una altura de 125 m.s.n.m.; condiciones ecológicas que favorecen el desarrollo del ciclo vectorial, aunado a que la principal actividad económica de esta región es la ganadería, tanto de carne como de leche y de doble propósito (Gómez 2005) En esta área se han llevado a cabo estudios previos sobre la transmisión de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en los que se determinaron niveles de estabilidad enzoótica en la región mediante la evaluación de anticuerpos IgG en terneros de 3 a 9 meses (Ríos, Zapata et al. 2010); sin embargo, se desconoce el comportamiento de otros indicadores entomológicos y parasitológicos que permitan comprender el comportamiento del parásito en las garrapatas y la influencia de los factores bióticos y abióticos sobre su ciclo de vida.

De acuerdo con lo anterior, este trabajo pretende establecer el comportamiento de algunos indicadores entomológicos y parasitológicos de babesiosis bovina en garrapatas *Rhipicephalus microplus* y bovinos de 3 a 9 meses de edad en la zona del Magdalena Medio, por medio de técnicas entomológicas y parasitológicas directas microscópicas y moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio de tipo descriptivo con un muestreo representativo no probabilístico. Para el cálculo muestral se tuvo en cuenta una población de referencia de 13.800 bovinos de la encuesta de vacunación contra brucelosis bovina en 200 hatos del Magdalena Medio en el año 2006 proporcionada por los entes administrativos de la Cooperativa Regional de Ganaderos del Magdalena Medio (COREGAN); como universo muestral se estableció el promedio de esta población en 9 hatos (503); con un nivel de confianza (z) del 95%, un error de muestreo (e) del 5% y una variación del fenómeno (p) de 0,5, la muestra calculada (n) fue de 218 bovinos (Epi-info 2004).

Sitio de estudio

El estudio fue desarrollado en 9 hatos ganaderos con sistemas de explotación que varían desde ganadería de carne, leche, doble propósito y exposición ubicados en el Magdalena Medio Colombiano, entre los municipios de Puerto Berrío (Antioquia) que

se encuentra ubicado a una LN 7° 6' 29' 35" y LO 75° 74' 24' 26", con una extensión geográfica de 1.184 Km² y Cimitarra (Santander) ubicado a LN 06° 19' 00" y LO 73° 57' 00" con una extensión geográfica 3.165,60 Km², ambos presentan una precipitación anual promedio de 2.500 a 3.000 mm (Gómez 2005).

Los hatos seleccionados en el estudio fueron: Copa de Barro (CB), El águila (EA), Santa Lucía (SL), San Andrés (SA), Caño Negro (CN), La Camelia (LC), La Lorena (LL), Bélgica (BG) y La Antioqueña (LA).

Encuesta clínico-epizootiológica

Se diseñó una encuesta epizootiológica para los animales incluidos en el muestreo con el fin de evaluar signos y síntomas, carga parasitaria y factores epidemiológicos asociados con la presentación de la enfermedad en esta área: edad del animal, sexo, tipo de sistema productivo, baño garrapaticida utilizado y su frecuencia; encuesta que fue validada en un estudio previo de estabilidad enzoótica realizado en la zona (Ríos, Zapata et al. 2010).

RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE DE LOS BOVINOS

Se muestrearon 237 terneros de 3 a 9 meses de edad nacidos en cada finca, distribuidos así: 49 en San Andrés; 20 en Santa Lucía, 12 en Caño Negro; 8 en Copa de Barro; 31 en La Antioqueña; 53 en El Águila, 18 en La Lorena, 24 en La Camelia y 22 en Bélgica, los cuales fueron seleccionados por conveniencia (Tabla 1, Figura 1).

HATO	FRECUENCIA ABSOLUTA	FRECUENCIA RELATIVA
San Andrés	49	20,7
Santa Lucía	20	8,4
Caño Negro	12	5,1
Copa de Barro	8	3,4
La Antioqueña	31	13,1
El Águila	53	22,4
La Lorena	18	7,6
La Camelia	24	10,1
Bélgica	22	9,3

Total	237	100,0
--------------	------------	--------------

Tabla 1. Dsitribución de la población de bovinos muestreados por hato

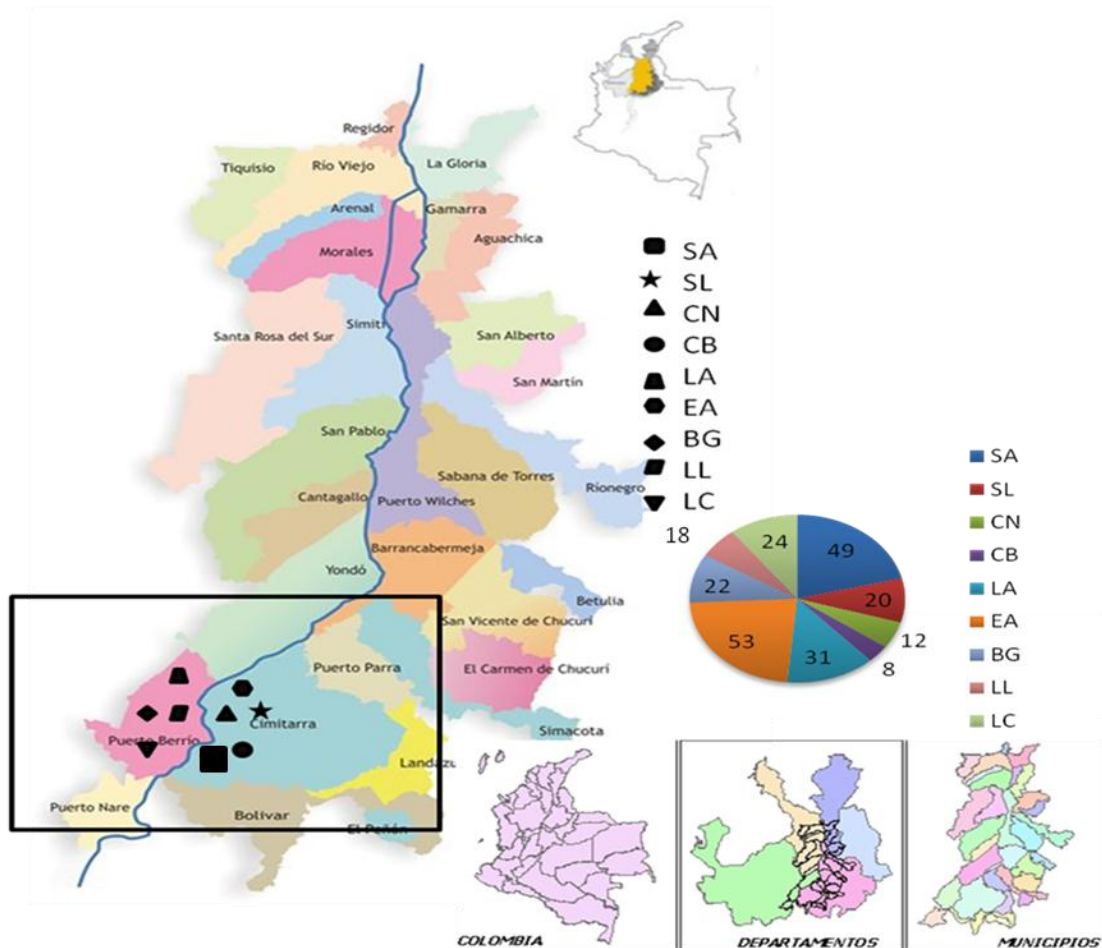


Figura 1. Ubicación de los hatos muestreados y distribución de la n.

Previa inmovilización de cada ternero se realizó la toma de muestra de 5 ml de sangre de la vena yugular en tubos Vacuette® con anticoagulante EDTA; muestras que fueron almacenadas a 4°C para la preparación de extendidos de sangre periférica y su posterior almacenamiento en el laboratorio a -20°C (5 alicuotas de 200ul, y 4 ml) para la extracción de ADN. También se recolectó como muestra de respaldo de cada ternero, sangre total, en papel filtro Whatman® #1, la cual se dejó secar y fue almacenada en un lugar fresco y seco del Laboratorio Central de Investigaciones de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia.

Extendidos de Sangre periférica

De cada muestra de sangre periférica se realizaron dos extendidos , que fueron fijados con metanol y coloreados con Hemacolor© (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) previa estandarización, así: inmersión de la placa en la coloración roja A por 30s, inmersión en coloración azul B por 30s, lavado en Buffer pH 7.0 por 20s y secado. Fueron analizadas posteriormente por duplicado para la detección de *Babesia* sp. al microscopio óptico (Olympus CX21FS1, California, USA) ocular de 10X en objetivo de 100X.

Extracción de ADN

Utilizando alícuotas de 200ul de sangre con anticoagulante EDTA en tubos de 1,5mL, se procedió a realizar el micrométodo de extracción de ADN por precipitación salina (*Salting out*). El producto de extracción fue resuspendido en 200ul de Buffer TE 1X e incubado a 65°C por 30 minutos. Los tubos etiquetados fueron almacenados a -20°C para su posterior análisis (Villafañe et al. 2009).

RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE GARRAPATAS

De cada ternero se tomaron las garrapatas hembras ingurgitadas mayores o iguales a 4.5mm de *R. microplus* detectadas al tacto de medio cuerpo del animal según la técnica propuesta por Álvarez et al. 2003, las cuales después de su recolección fueron incubadas por 7 días a temperatura ambiente para garantizar el desarrollo del ciclo parasitario dentro del vector, este procedimiento se realizó en recipientes plasticos de boca ancha debidamente identificados con el número del ternero, con gasas húmedas en el fondo que mantuvieron una humedad del 80-90% (Morzaria, Katende et al. 1992; Guglielmone, Gaido et al. 1996)

Obtención de hemolinfa

El día 7 de incubación después de la recolección de garrapatas se obtuvo la muestra de hemolinfa según la técnica descrita por Burgdorfer et al. 1970; se realizaron nueve frotis de hemolinfa en tres placas por espécimen, dejándolos secar al aire libre; luego fueron fijados con metanol y coloreados con Hemacolor® para posteriormente ser observados al microscopio en objetivo de 100X con aceite de inmersión (Oliveira,

Oliveira-Sequeira et al. 2005) Cada garrapata fue conservada a -20°C para la posterior extracción del ADN.

Extracción de ADN

De las garrapatas recolectadas se agruparon 4 especímenes por bovino para la extracción de ADN utilizando el protocolo descrito por Rosero (2010), con la siguiente modificación: antes de someter a las garrapatas a maceración mecánica, se seccionó cada grupo con una hoja de bisturí estéril en pequeños pedazos para optimizar el procedimiento de extracción del ADN. El ADN obtenido fue resuspendido en 200ul de Buffer TE 1X y almacenado a -20°C para su posterior amplificación mediante PCR.

IDENTIFICACION MOLECULAR DE *Babesia bovis* Y *Babesia bigemina*

Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR múltiple) se amplificó la secuencia parcial del gen de la subunidad 18S rARN de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (275 pb y 175 pb, respectivamente). Los cebadores usados para la amplificación del 18S rARN de *B. bovis* y *B. bigemina* fueron los descritos por Adham, Abd-el-Samie et al. 2009). Se usaron controles negativos y positivos en cada reacción de PCR; agua ultra pura estéril (Mili-Q®) como control negativo y como controles positivos el ADN extraído de las cepas de *B. bovis* Ba48Aus y de *B. bigemina* Bb35Th proporcionadas por el Banco de Germoplasma de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). (Figura 2)

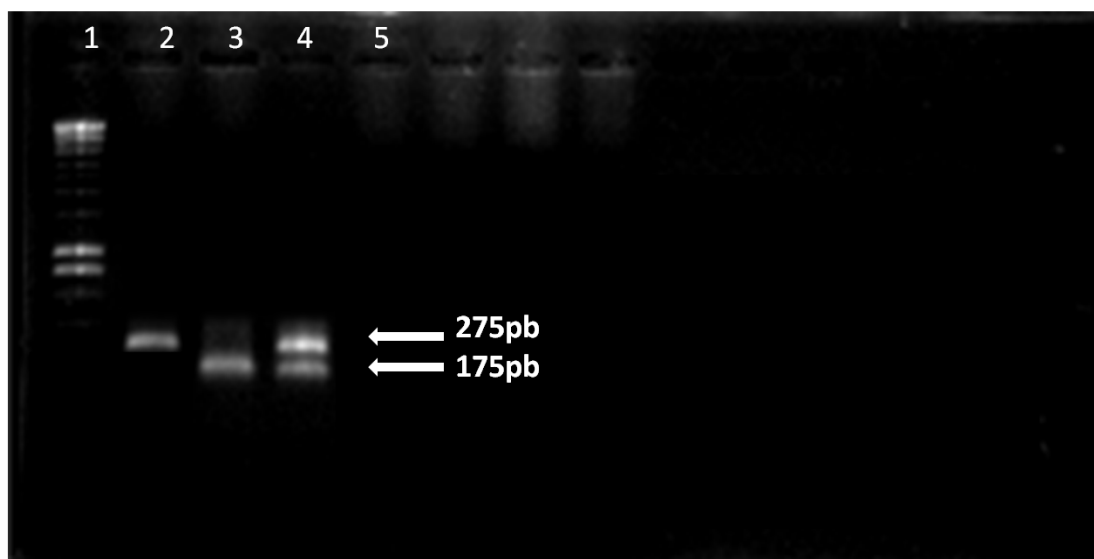


Figura 2. Amplificación de la secuencia nucleotídica parcial del gen ARNr 18S de *B. bovis* y *B. bigemina*. Electroforesis de agarosa al 1%. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular en pb. El carril 2: Producto de PCR amplificados del ADN genómico de *B. bovis* Ba48Aus. El carril 3 Producto de PCR amplificados del ADN genómico de *B. bigemina* Bb35Th Carril 4 corresponde al a la amplificación del ADN extraído de las cepas control. Carril 5: Control negativo - agua ultra pura.

Se optimizaron las condiciones de PCR con base en el protocolo reportado por Adham, Abd-el-Samie et al. en 2009, mediante el análisis de gradiente de temperatura (62-84°C) en un Termociclador convencional (BIO-RAD, CA, USA), cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl con Buffer 1x, 4 mM de MgCl₂, 1 µM de cada cebador, 0.65 U de Taq ADN polimerasa (Bioline, MA, USA), 0.4 mM de dNTPs y 60 ng de ADN genómico extraído de las muestras de sangre de bovinos o garrapatas. Las condiciones usadas para la amplificación fueron: desnaturalización inicial por 10 minutos a 93°C, el programa de amplificación fue repetido 35 veces. Desnaturalización por 30 s a 93°C, alineamiento por 30s a 49°C, extensión por 30s a 72°C y un ciclo final por 10 minutos a 72°C. La amplificación se confirmó mediante el análisis de 5µl de cada producto de PCR por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con EZvision™ Dye (AMRESCO Inc. Cochran Road Solon, USA) como agente intercalante y visualizados en el Fotodocumentador Gel-Doc 2000 System (BIO-RAD, Hércules, CA.). Algunos productos de amplificación seleccionados aleatoriamente fueron enviados a la empresa MACROGEN (Rockville, Meryland, USA) para su purificación y secuenciación bidireccional. Las secuencias de ADN fueron editadas, ensambladas y alineadas usando el programa Geneious Pro 5.4.4 (Drummond et al. 2011). Desde el mismo programa se realizó un análisis BLASTn (NCBI, GenBank), usando las secuencias obtenidas y las secuencias reportadas en el GenBank para cepas de *B. bovis* y *B. bigemina* provenientes de diferentes estudios a nivel mundial (Ríos and Ríos, 2011).

INDICES PARASITOLÓGICOS

Los índices parasitológicos fueron calculados con base en los resultados obtenidos de la amplificación de ADN por PCR múltiple.

Estimación de la infección en bovinos

Para determinar la infección en bovinos se identificaron trofozoítos de *Babesia* sp. en la lectura de todos los campos del extendido de sangre periférica (esp). El diagnóstico positivo en sangre se estableció como el hallazgo intraeritrocítico de formas parasitarias rectas, curvas, piriformes o en bandas, dispuestas en pares o individuales, con el núcleo ubicado en la parte anterior, citoplasma vacuolado o avacuolado o la detección de formas circulares u ovoides en las cuales se diferencia su cromatina y su citoplasma sin pigmento citoplasmático, que presentaran una longitud entre 3 μ y 5 μ , evaluados bajo aceite de inmersión en objetivo 100X (Oliveira, Oliveira-Sequeira et al. 2008). Los resultados fueron reportados en términos de positividad y se estableció el porcentaje de bovinos positivos, como el número de bovinos positivos para *Babesia* sp. sobre el total de bovinos examinados multiplicado por cien.

Estimación de la infección en garrapatas

Para determinar la infección por *Babesia* sp. en garrapatas se identificaron esporoquinetos en los campos de la muestra de hemolinfa extraída y coloreada en placa. El diagnóstico positivo en hemolinfa se estableció como el hallazgo de formas rectas o curvas, con el núcleo ubicado en la parte anterior, central o posterior y que presentaran una longitud entre los 9 μ y 17 μ , con distintas vacuolas dispersas irregularmente en el citoplasma a ambos lados del núcleo (formas maduras), o avacuolados (forma inmaduras) en los que el citoplasma se tiñe de forma más homogénea con dos manchas rojas en cada extremo (Guglielmone, Gaido et al. 1996; Morzaria, Katende et al. 1999). Los resultados fueron reportados en términos de positividad y se estableció:

$$\% \text{Garrapatas positivas} = \frac{\# \text{ garrapatas positivas para } \textit{Babesia} \text{ sp.}}{\text{Total de garrapatas}} \times 100$$

INDICES ENTOMOLÓGICOS

Para la evaluación de los indicadores entomológicos se revisaron los animales de cabeza a cola por el lado derecho. Se recolectaron todas las garrapatas mayores de 4,5 mm y se depositaron en un frasco plástico de boca ancha con gasa húmeda en el fondo. En el laboratorio se hizo el recuento de las garrapatas muestreadas por animal

para establecer el total de garrapatas, con este dato, se realizaron las siguientes estimaciones:

Estimación de la infestación en bovinos

La estimación del grado de infestación por hato se estableció aplicando la fórmula descrita por Burgdogfer et al. 1970:

$$\text{Grado de infestación por hato} = \frac{\text{\#Total de garrapatas}}{\text{\#Total de bovinos}}$$

$$\text{Carga parasitaria por bovino} = \text{\#Total de garrapatas colectadas de la parte media del animal} \times 2 \text{ (Álvarez et al. 2003)}$$

Análisis estadístico

Se determinaron las medidas de tendencia central, posición y dispersión para las variables cuantitativas. El análisis de asociación se llevó a cabo mediante la estimación de la correlación de Rho Spearman, según la distribución de los datos de las variables cuantitativas con base en la prueba de Shapiro-Wilk, tomando un nivel de significancia estadística de $p \leq 0.05$. Se realizaron pruebas χ^2 y regresiones lineales simples. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa SPSS versión 18 para Windows XP.

Aspectos éticos

Se obtuvo aprobación del Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia en el Acta N°42 del 10 de Junio de 2008. El estudio incluyó un formato de consentimiento informado para ser diligenciado por los propietarios de los animales incluidos en el estudio que contenía la información referente a los procedimientos y responsabilidades de los investigadores. El Comité de Bioética evaluó todos los aspectos éticos de este proyecto con base en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Protección Social de Colombia, Título V, La Investigación Biomédica Con Animales, y la LEY 84 DE 1989, por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales, se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia

RESULTADOS

La población de estudio estuvo conformada por 237 terneros de 3 a 9 meses de edad, pertenecientes a 9 hatos de la zona. La distribución de la muestra por hato fue la siguiente: Copa de Barro 3.4% (8/237), El águila 22.4% (53/237), Santa Lucía 8.4% (20-237), San Andrés 20.7% (49/237), Caño negro 5.1% (12/237), La Camelia 10.1% (24/237), La Lorena 7.6% (18/237), Bélgica 9.3% (22/237) y la Antioqueña 13.1% (31/237); el tipo de ganadería predominante fue de doble propósito, con un 76.4%, seguida de la ganadería de leche con un 19.8%, y exposición con un 3.8%. Ninguno de los animales presentó signos y síntomas de Babesiosis tras la evaluación médico veterinaria.

Los terneros fueron distribuidos en tres grupos por rangos de edad, en el grupo 1 se incluyeron los terneros de 3 a 5 meses, en el grupo 2 los de 6 a 7 meses y en el grupo 3 los de 8 a 9 meses de edad. El porcentaje de terneros para cada uno de estos grupos fue: grupo 1: 38,82% (92/237), grupo 2: 37,97% (90/237) y grupo 3 con un 23,21% (55/237) del total de bovinos. Fue calculada la media de edad por hato y su desviación estándar como se muestra en la tabla 2.

HATO	Media EDAD (MESES)	n	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
SAN ANDRES	6,94	49	1,197
SANTA LUCIA	6,20	20	1,735
CAÑO NEGRO	4,50	12	1,168
COPA DE BARRO	7,50	8	2,268
LA ANTIOQUEÑA	5,00	31	1,612
EL AGUILA	5,21	53	1,261
BELGICA	7,36	22	2,060
LA LORENA	7,44	18	1,653
LA CAMELIA	5,29	24	1,301
Total	6,04	237	1,789

Tabla 2. Distribución promedio de la edad y su desviación estándar por hato ganadero.

El porcentaje de infección por *Babesia* sp. en bovinos de 3-9 meses de edad, establecido por medio de la evaluación microscópica de extendidos de sangre periférica y la amplificación de ADN por medio de la PCR múltiple, presentó diferencia relativa y absoluta en sus resultados por medio de la prueba Chi cuadrado; la técnica

de amplificación de ADN permitió, además, discriminar la especie de parásito circulante y las infecciones mixtas. Los animales de todos los hatos y todos los grupos de edad presentaron mayor porcentaje de positividad por medio de la PCR múltiple (Tabla 3-4).

HATO	TÉCNICA	NEGATIVO	<i>Babesia</i> sp.
SAN ANDRES	ESP	13,9	6,8
	PCR	5,5	15,2
SANTA LUCIA	ESP	8,0	0,4
	PCR	2,5	5,9
CAÑO NEGRO	ESP	1,3	3,8
	PCR	1,3	3,8
COPA DE BARRO	ESP	3,4	0,0
	PCR	3,0	0,4
LA ANTIOQUEÑA	ESP	9,7	3,4
	PCR	2,1	11,0
EL AGUILA	ESP	16,9	5,5
	PCR	9,7	12,7
BELGICA	ESP	8,4	0,8
	PCR	3,0	6,3
LA LORENA	ESP	7,2	0,4
	PCR	3,4	4,2
LA CAMELIA	ESP	8,9	1,3
	PCR	5,9	4,2

Tabla 3. Porcentaje de infección por *Babesia* sp. en bovinos por hato mediante extendido de sangre periférica y PCR múltiple por hato ganadero

EDAD	TÉCNICA	NEGATIVO	<i>Babesia</i> sp.
3-5 MESES	ESP	29,5	9,3
	PCR	16,5	22,4
6-7 MESES	ESP	30,8	7,2
	PCR	13,5	24,5
8-9 MESES	ESP	17,3	5,9
	PCR	6,3	16,9

Tabla 4. Porcentaje de infección por *Babesia* sp. en bovinos por grupos de edad mediante ESP y PCR múltiple por grupos de edad.

El porcentaje de infección por *Babesia* sp. en garrapatas *R. microplus* por medio de la evaluación microscópica de hemolinfa y la amplificación de ADN por medio de la PCR

múltiple, presentó diferencia relativa y absoluta en sus resultados por medio de la prueba Chi cuadrado; la técnica de amplificación de ADN permitió, además, discriminar la especie de parásito circulante y las infecciones mixtas. Los vectores de todos los hatos y todos los grupos de edad presentaron mayor porcentaje de positividad por medio de la PCR múltiple (Tabla 5-6).

HATO	TÉCNICA	NEGATIVO	<i>Babesia</i> sp.
SAN ANDRES	ESP	1,9	9,5
	PCR	0,0	11,4
SANTA LUCIA	ESP	3,8	8,6
	PCR	3,8	8,6
COPA DE BARRO	ESP	1,0	1,9
	PCR	0,0	2,9
LA ANTIOQUEÑA	ESP	2,9	3,8
	PCR	2,0	4,7
EL AGUILA	ESP	14,3	19,0
	PCR	3,1	30,2
BELGICA	ESP	1,9	10,5
	PCR	0,9	11,5
LA LORENA	ESP	6,7	3,8
	PCR	1,9	8,6
LA CAMELIA	ESP	3,8	6,7
	PCR	0,0	10,5

Tabla 5. Porcentaje de infección por *Babesia* sp. en garrapatas por hato mediante ESP y PCR múltiple por hato ganadero

GRUPO DE EDAD		NEGATIVO	<i>Babesia</i> sp.
3-5 MESES	HEMOLINFA	17,1	19
	PCR	4,8	31,4
6-7 MESES	HEMOLINFA	12,4	30,5
	PCR	2,9	40
8-9 MESES	HEMOLINFA	6,7	14,3
	PCR	3,8	17,1

Tabla 6. Porcentaje de infección por *Babesia* sp. en garrapatas por hato mediante ESP y PCR múltiple por grupo de edad.

INDICES PARASITOLÓGICOS

Infeción en Bovinos

La infección en los bovinos fue evaluada por medio de técnicas directas microscópicas y moleculares; tras la evaluación de los extendidos de sangre periférica se detectaron trofozoítos de *Babesia* sp. (Figura 3) en el 22.4% de los bovinos (53/237), y el 77.6% fue negativo a la lectura (184/237), mientras que la amplificación mediante PCR de la secuencia parcial del gen 18S ARNr de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* detectó un 63.3% (150/237) de positividad, diferenciándose un 59.9% (142/237) de las muestras analizadas con infección por *B. bigemina* y un 3.4% (8/237) con infección mixta (*B. bigemina* y *B. bovis*); no se encontró positividad para *B. bovis* como único agente y se obtuvo un 36.7% de negatividad (87/237) (Figura 4), presentando una diferencia de proporciones considerable por medio de la prueba Chi².

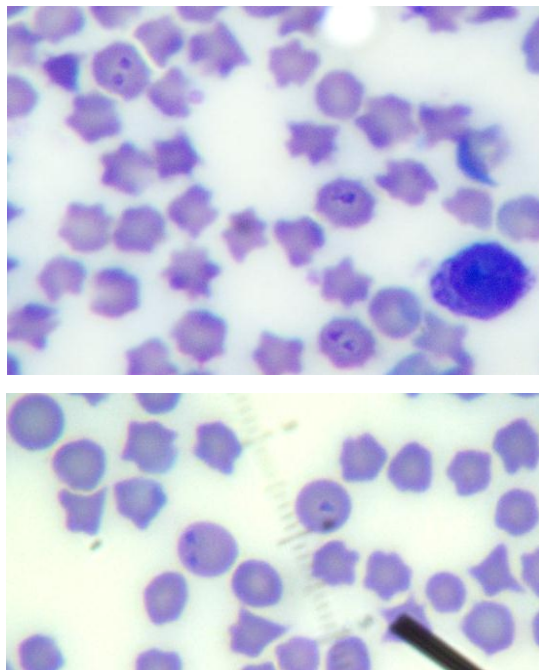


Figura 3. Formas parasitarias compatibles con *Babesia* sp.: Formas rectas, curvas, piriformes o en bandas, dispuestas en pares, o individuales, con el núcleo ubicado en la parte anterior, citoplasma vacuolado o avacuolado, o formas circulares u ovoides con diferenciación de cromatina y citoplasma sin pigmento citoplasmático, con una longitud entre 3-5 μ , 100X.

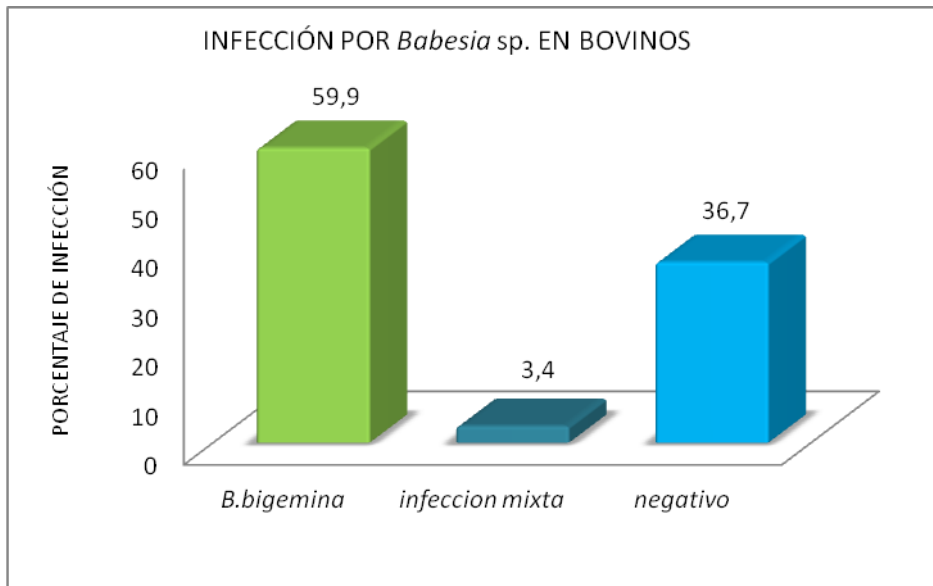


Figura 4. Distribución de la infección por *Babesia* sp. en bovinos.

Infección por hato

El hato con mayor porcentaje de infección por *Babesia* sp. fue San Andrés con un 14.8% del total de los bovinos infectados, siendo *B. bigemina* el parásito predominante, tanto en este como en el resto de los hatos. El hato con menor porcentaje de infección fue copa de barro con un 0.4% del total de la infección. Los hatos que presentaron casos de infección mixta fueron Santa Lucía (2.1%), La Lorena (0.8%) y El Águila (0.4%). (Figura 5, Tabla 7)

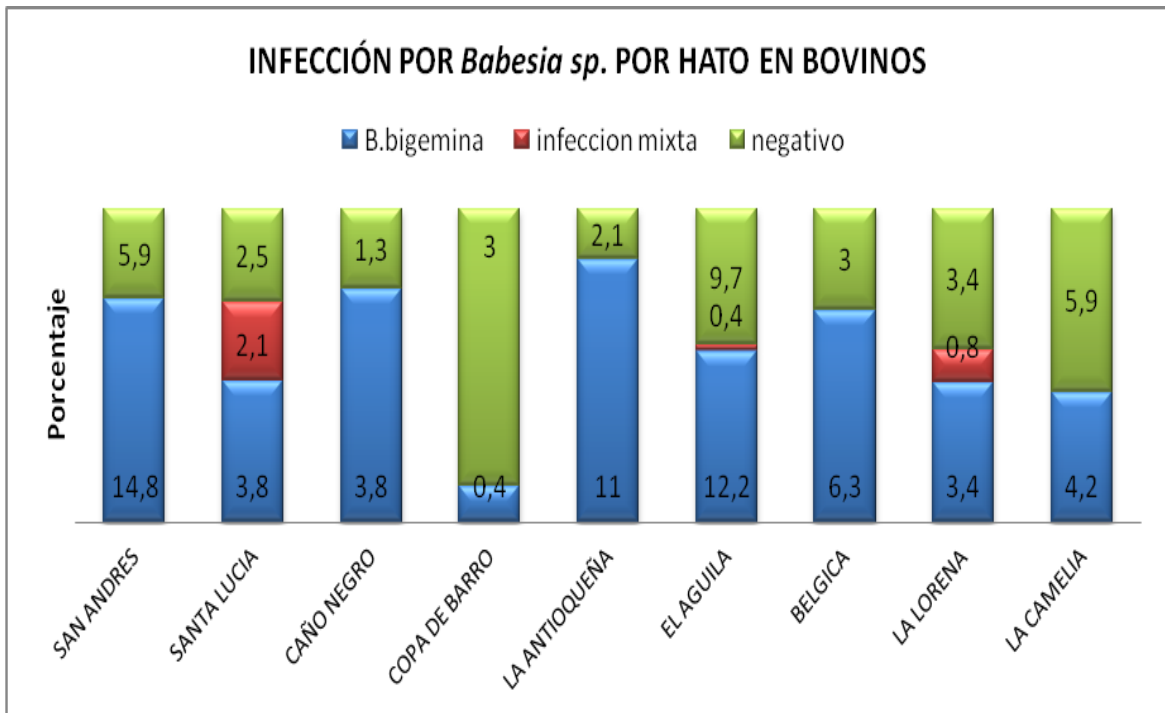


Figura 5. Distribución de la infección por *Babesia* sp. en bovinos en todos los hatos.

INFECCIÓN POR <i>Babesia</i> sp. POR HATO EN BOVINOS						
HATO			<i>B.bigemina</i>	infección mixta	negativo	TOTAL
Total	SAN ANDRES	Frecuencia	35	0	14	49
		Porcentaje	14,8%	,0%	5,9%	20,7%
	SANTA LUCIA	Frecuencia	9	5	6	20
		Porcentaje	3,8%	2,1%	2,5%	8,4%
	CAÑO NEGRO	Frecuencia	9	0	3	12
		Porcentaje	3,8%	,0%	1,3%	5,1%
	COPA DE BARRO	Frecuencia	1	0	7	8
		Porcentaje	,4%	,0%	3,0%	3,4%
	LA ANTIOQUEÑA	Frecuencia	26	0	5	31
		Porcentaje	11,0%	,0%	2,1%	13,1%
	EL AGUILA	Frecuencia	29	1	23	53
		Porcentaje	12,2%	,4%	9,7%	22,4%
	BELGICA	Frecuencia	15	0	7	22
		Porcentaje	6,3%	,0%	3,0%	9,3%
	LA LORENA	Frecuencia	8	2	8	18
		Porcentaje	3,4%	,8%	3,4%	7,6%
	LA CAMELIA	Frecuencia	10	0	14	24
		Porcentaje	4,2%	,0%	5,9%	10,1%
		Frecuencia	142	8	87	237

	%	59,9%	3,4%	36,7%	100,0%
--	---	-------	------	-------	--------

Tabla 7. Distribución de la infección por *Babesia* sp. por hato en bovinos (frecuencia absoluta y relativa)

Infeción por grupos de edad

La distribución de la infección por grupos de edades se presentó en mayor proporción por *B. bigemina* siendo predominante en los dos primeros grupos. La infección mixta se presentó en baja proporción en los tres grupos de edad (Figura 6). Después de hacer un análisis de regresión lineal simple se encontró que no hay relación estadística entre el porcentaje de bovinos positivos y la edad de los animales ($p=0.261$)

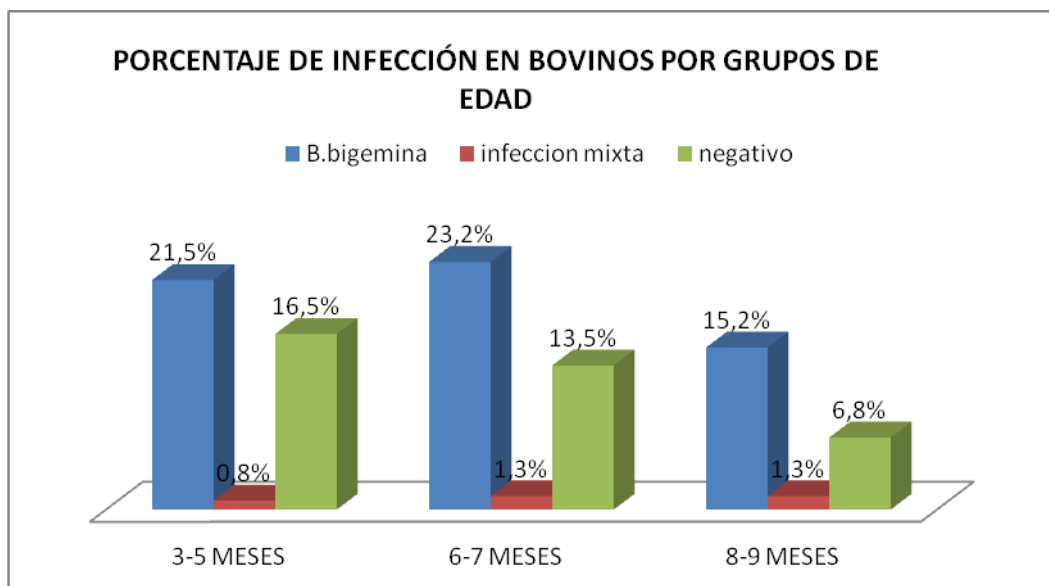


Figura 6. Distribución de la infección por *Babesia* sp. por grupos de edad en bovinos.

Vector

La muestra de garrapatas estuvo conformada por un total de 770 especímenes que cumplieron con los criterios de inclusión. El porcentaje de garrapatas por hato, establecido como carga parasitaria sobre el total de los bovinos del hato fue el siguiente: Copa de Barro con 1.3% (10/8) El Águila con 54.5% (420/53), Santa Lucía con 6.2% (48/20), San Andrés con 4.15% (32/49), La camelia con 11.2% (86/24), La Lorena con 6.5% (50/18), Bélgica con 7.5% (58/22), La Antioqueña con 8.6% (66/31) y Caño Negro con un porcentaje de 0. (Tabla 8)

HATO	Frecuencia Absoluta	Frecuencia relativa
San Andrés	32	4,2
Santa Lucía	48	6,2
Caño Negro	0	0,0
Copa de Barro	10	1,3
La Antioqueña	66	8,6
El Águila	420	54,5
La Lorena	50	6,5
La Camelia	86	11,2
Bélgica	58	7,5
Total	770	100,0

Tabla 8. Distribución del porcentaje de garrapatas por hato

Infestación

El grado de infestación total de la zona de estudio fue de 3.2 garrapatas por cada bovino; se calculó igualmente el grado de infestación por hato, encontrando que el hato con mayor infestación fue El Águila con 7.9 garrapatas por bovino y el hato con menor grado de infestación fue Caño Negro el cual fue negativo (Figura 7).

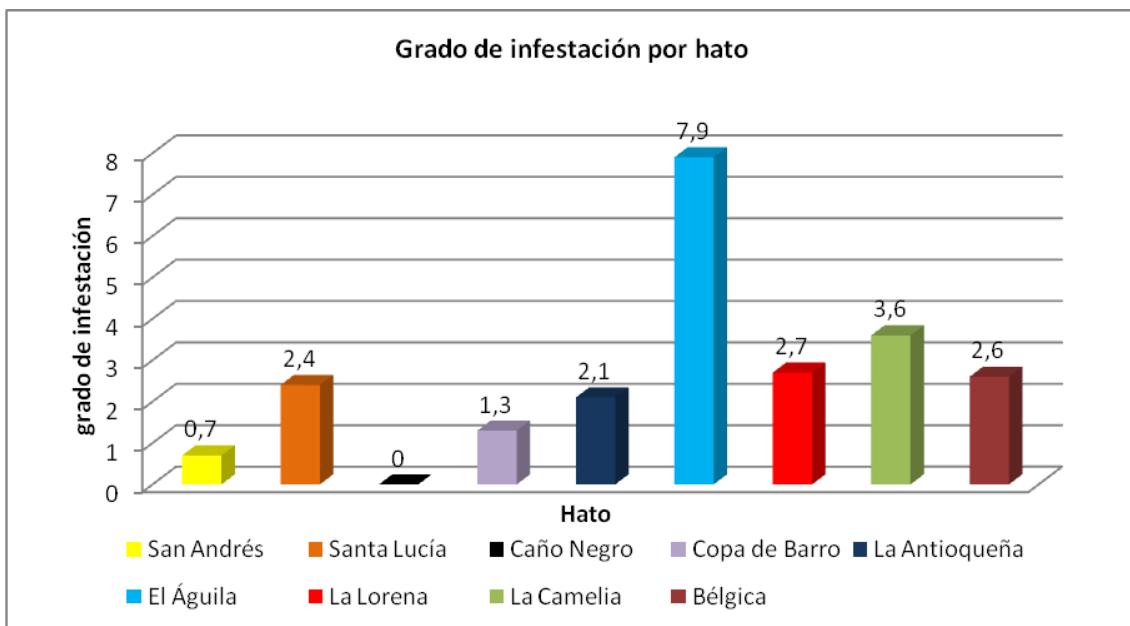


Figura 7. Grado de infestación por hato, calculado como número de garrapatas *R. microplus* colectadas en cada hato/ número de bovinos de cada hato.

Para el grado de infestación por edad, el grupo número 2 presentó el mayor porcentaje de garrapatas, correspondiente al 54% (416/770) del total de garrapatas de la zona, el grado de infestación para este grupo fue de 4 garrapatas por bovino.

Los terneros del grupo 3 presentaron el menor grado de infestación con 1.7 garrapatas por bovino (Figura 8). No se encontró correlación entre el grado de infestación y los grupos de edad (Rho: 0.221 y $p=0.001$).

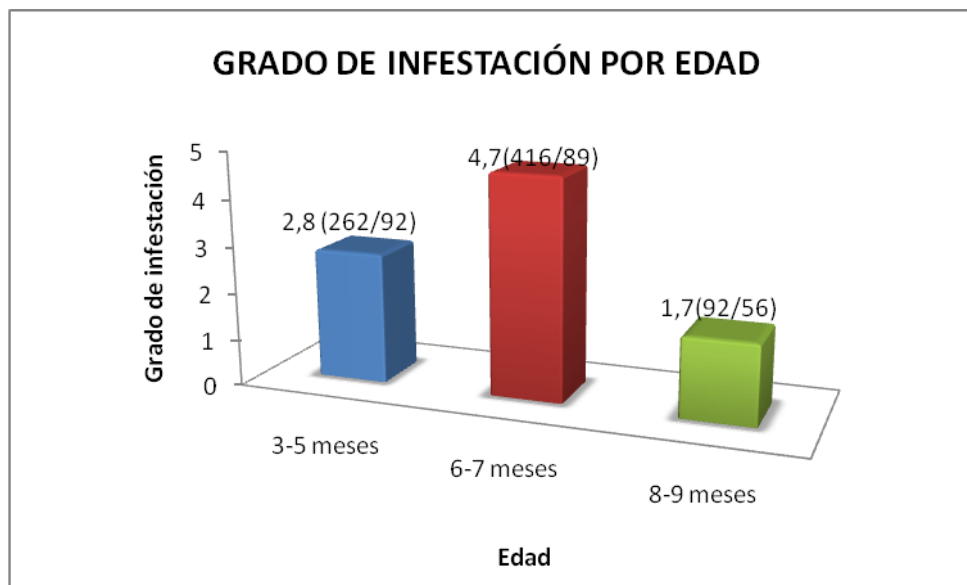


Figura 8. Grado de infestación por grupo de edad. Calculado número de garrapatas *R. microplus* colectadas por cada grupo de edad/ número de bovinos por grupo de edad.

El hato que presentó mayor grado de infestación para los terneros de 3-5 meses fue La Camelia seguido de La Lorena y Bélgica. Para los terneros del grupo 2, el Águila presentó el grado de infestación más alto, mientras que para los terneros del grupo 3 fue Bélgica el hato con mayor grado de infestación. El hato Copa de Barro sólo presentó infestación para los terneros del grupo 3, mientras que El Águila no presentó infestación en este grupo de edad (Tabla 9). Después de hacer un análisis de regresión lineal simple se encontró que no hay relación estadística entre el porcentaje de garrapatas positivas y la edad de los animales ($p=0.711$).

HATO	3-5 meses	6-7 meses	8-9 meses
SAN ANDRES	1,6	0,6	0,4
SANTA LUCIA	3,4	2	1,5
CAÑO NEGRO	0	0	0
COPA DE BARRO	0	0	2
LA ANTIOQUEÑA	1,7	3,1	2,7
EL AGUILA	4	12,5	0
BELGICA	1,5	2,4	3,1
LA LORENA	4	4	1,8
LA CAMELIA	4,9	2	2

Tabla 9. Grado de infestación por grupo de edad de cada hato fue calculado número de garrapatas *R. microplus* colectadas por cada grupo de edad en cada hato/ número de bovinos por grupo de edad de cada hato

Baños garrapaticidas

En los hatos estudiados se utilizan diferentes productos químicos como baños garrapaticidas para controlar los ectoparásitos a través de diferentes métodos y concentraciones, donde la frecuencia de su aplicación también varía; no existen protocolos estandarizados para su aplicación en cuanto a la dosificación y concentración en ninguno de los hatos por lo que no se encontró correlación entre el grado de infestación y el producto garrapaticida usado (Rho: 0.103 y $p=0.115$). La frecuencia de la aplicación de los baños garrapaticidas varía desde 15 días hasta 2 años. Se encontró una correlación positiva entre la frecuencia del baño garrapaticida y el grado de infestación (Rho: 0.168 y $p=0.010$).

Tipo de ganadería

El total de garrapatas de cada hato varió según el tipo de ganadería; para los hatos con ganadería de doble propósito se encontraron 598 garrapatas equivalentes al 78% del total, en los hatos con ganadería lechera se encontraron 106 garrapatas (14%), en hatos con ganadería de exposición no se encontraron garrapatas. Al analizar estas variables se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la carga parasitaria y el tipo de ganadería ($p=0.04$). Sin embargo, estos valores pueden sufrir modificaciones a lo largo de las diferentes épocas del año, situación que además de correlacionarse con los factores climáticos, podría estar igualmente motivada por la

subjetividad en la aplicación de los baños garrapaticidas, según infestación, que realizan muchos productores; aspecto que impide la exposición permanente a las poblaciones de garrapatas de la zona. Así mismo, factores como la congregación de animales en áreas húmedas de la finca, en donde la capa de vegetación y el microclima son mejores y aumentan las posibilidades de una mayor sobrevivencia de las garrapatas; lo que no permite la reducción final de su número con estrategias de control que en lugar de favorecer la salud de los animales, afectan su inmunidad, como el uso excesivo de los acaricidas. (Álvarez et al. 2003).

Infeción en el vector

La infección en las garrapatas fue evaluada por medio de técnicas microscópicas y moleculares. Como resultado de la evaluación de hemolinfa se detectaron esporoquinetos de *Babesia* sp. en el 36.8% del total de hembras ingurgitadas (Figura 9) mientras que por medio de la amplificación de ADN se obtuvo una positividad del 88.6%, diferenciándose un 79.2% la infección por *B. bigemina*, un 9.4% de infección mixta (*B. bigemina*, *B. bovis*) y como negativo se obtuvo un 11.4%, presentando una diferencia estadísticamente significativa entre los dos métodos diagnósticos ($p=0.0098$).

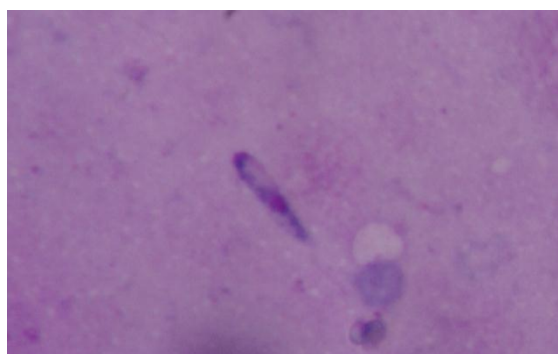


Figura 9. Esporoquinetos de *Babesia* sp. Formas rectas o curvas, con el núcleo ubicado en la parte anterior, central o posterior, que presentan una longitud entre 9 -17 μ , con distintas vacuolas dispersas irregularmente en el citoplasma a ambos lados del núcleo (maduras), o avacuolados (inmaduras).

Infeción por hato

El hato con mayor porcentaje de garrapatas positivas fue El Águila con un 30%, seguido de Bélgica y San Andrés con un 11.3%. Se presentaron 4 hatos con infección mixta,

siendo predominante en San Andrés con un 4.7% del total de las garrapatas infectadas.

El parásito predominante en todos los hatos fue *B. bigemina* (Tabla 10).

	<i>B. bigemina</i>	infección mixta	negativo
SAN ANDRES	6,6%	4,7%	0,0%
SANTA LUCIA	8,5%	0,0%	3,8%
CAÑO NEGRO	0,0%	0,0%	0,0%
COPA DE BARRO	2,8%	0,0%	0,0%
LA ANTIOQUEÑA	2,8%	1,9%	1,9%
EL AGUILA	30,2%	0,0%	2,8%
BELGICA	11,3%	0,0%	0,9%
LA LORENA	7,5%	1,9%	1,9%
LA CAMELIA	9,4%	0,9%	0,0%
	79,25%	9,43%	11,32%

Tabla 10. Porcentaje de positividad por hato. Calculado número de garrapatas *R. microplus* positivas recolectadas por cada hato/ número total de garrapatas recolectadas

Infección por grupos de edad

El porcentaje de positividad por grupo de edad de cada hato fue calculado como el número de garrapatas *R. microplus* positivas recolectadas por cada grupo de edad sobre el número total de garrapatas recolectadas. El grupo de edad que presentó mayor infección en sus vectores fue el grupo 2 con un 40% sobre el total de garrapatas recolectadas, seguida por el grupo 1 con un 31.8%. En los vectores de los tres grupos de edad predomina la infección por *B. bigemina* (Figura 10); sin embargo, no se encontró relación estadística entre la infección encontrada en las garrapatas recolectadas con la edad de los bovinos.

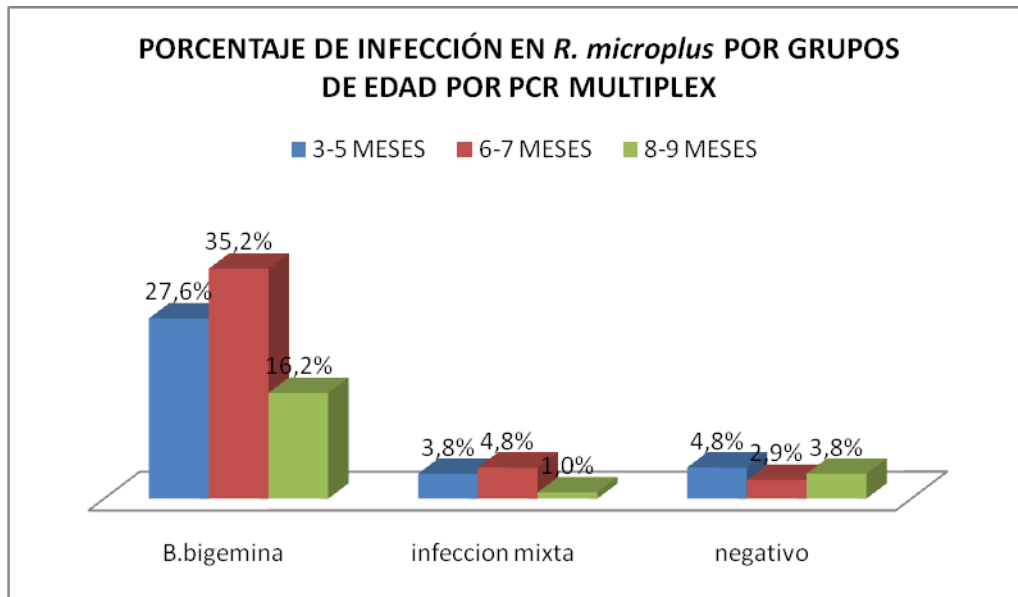


Figura 10. Porcentaje de infección por *Babesia* sp. en garrapatas *R. microplus* por grupos de edad.

Análisis de las secuencias parciales obtenidas del gen ARNr 18S

El análisis BLASTn de las secuencias nucleotídicas parciales obtenidas del gen ARNr 18S para las cepas de *B. bigemina* amplificadas a partir de muestras de garrapatas (#1) y bovinos (#1) de los hatos, mostró un 96% de identidad con diferentes especies del género *Babesia* reportadas en el GenBank (NCBI). No obstante, al realizar el análisis BLASTn especificando en la base de datos GenBank que *B. bigemina* fue el microorganismo del cual provienen las secuencias, se encontró 85.4% de identidad con cepas de *B. bigemina* reportadas en diferentes partes del mundo (Buling, Criado-Fornelio et al. 2007, Ríos et al. 2011), para ambas secuencias (las provenientes del vector y del bovino). Sin embargo, la calidad de las secuencias obtenidas como resultado de la secuenciación directa del producto de amplificación mediante PCR, no fue aceptable en algunos sitios nucleotídicos por ser producto del amplificado de un gen multicopia (Adham, Abd-el-Samie et al. 2009)

DISCUSIÓN

Las zonas ganaderas que presentan estabilidad enzoótica para babesiosis bovina se caracterizan por la presencia constante de garrapatas durante todo el año, con pocas

fluctuaciones que dependen tanto de condiciones climáticas y ecológicas, como del control de vectores (Alonso, Arellano-Sota et al. 1992).

Estas zonas se han clasificado desde lo inmunológico por medio de un indicador de serorreactividad por anticuerpos tipo IgG específicos contra el parásito; valores iguales o superiores al 75% en animales de 3 a 9 meses de edad determinan el nivel enzoótico de la región; sin embargo, es necesario considerar que son varios los factores involucrados en una zona estable enzoóticamente para la babesiosis bovina, que involucran el parásito, el hospedador y el vector (Oliveira, Oliveira-Sequeira et al. 2008).

La zona del Magdalena medio es considerada enzoóticamente estable para la babesiosis bovina, donde se ha demostrado previamente la existencia del parásito por medio de técnicas serológicas (Ríos, Zapata et al. 2010), incluso existen estudios que reportan la transmisión a humanos demostrando un potencial zoonótico de las babesias bovinas de esta región (Ríos, Álvarez et al. 2003). En estas zonas generalmente los terneros se infectan con *B. bigemina* y *B. bovis* en los primeros meses de vida, por lo que es de gran importancia la inmunidad pasiva transferida a través del calostro y que se considera que perdura hasta los 9 meses de edad; esto acompañado de la exposición natural a niveles suficientes de garrapatas infectadas asegura el desarrollo de una inmunidad protectora eficiente contra estos parásitos (Ríos, Zapata et al. 2010; Oliveira, Oliveira-Sequeira et al. 2008).

Los bovinos de la zona que fueron seleccionados para el estudio se encuentran pastoreando desde las primeras semanas de vida, situación que facilita una mayor carga de garrapatas y por ende una mayor probabilidad de que los bovinos se infecten con el parásito (Quintão-Silva and Ribeiro 2003). La infección en los animales fue determinada por medio de técnicas microscópicas directas y moleculares; tras la evaluación parasitológica de las muestras de sangre periférica por medio de la amplificación de ADN mediante PCR múltiple se estableció la positividad en el 63.3% de los animales (150/237) diferenciándose en un 59.9% (142/237) la infección por *B. bigemina* y un 3.4% (8/237) de infección mixta (*B. bigemina*, *B. bovis*), presentando

una diferencia estadísticamente significativa entre los dos métodos diagnósticos ($p=0.047$), situación similar a la descrita por (Costa-Júnior, Rabelo et al. 2006)

La evaluación del indicador entomológico de infestación en los bovinos corresponde a otro factor importante en la epizootiología de la enfermedad, este parámetro fue evaluado en los hatos seleccionados en este estudio y no se encontró correlación entre el grado de infestación y la edad de los bovinos, a pesar de que los terneros entre 6 y 7 meses presentaron el mayor grado de infestación (4,7 garrapatas por bovino); estos datos son contrarios a los obtenidos en el estudio realizado por Oliveira et al. 2005; donde se encontró que los animales más jóvenes presentaban una infestación significativamente menor a la infestación presentada por los bovinos mayores, indicando que los bovinos de menor edad son más resistentes a la infestación ya que tienen menores tiempos de exposición a los vectores, que los terneros mayores.

Estudios reportados previamente sugieren que el tipo de ganadería está asociado con el grado de infestación por garrapatas en los bovinos, por las condiciones de uso de los acaricidas, además de las condiciones climáticas para los diferentes sistemas de explotación; en el ganado lechero el uso excesivo de acaricidas y rotación de pastos está relacionado con la aparición de brotes de babesiosis (Quintão-Silva and Ribeiro 2003). En la zona de estudio se encontró correlación entre el grado de infestación y el tipo de ganadería (Doble propósito y leche) $p=0.04$, presentándose un mayor grado de infestación en los bovinos de doble propósito, lo cual se relaciona con la distribución de los terneros muestreados, pues el 78% de los bovinos hacen parte de la ganadería de doble propósito, debido a que la proporción de los mismos no fue pareada.

La implementación de estrategias de control para garrapatas *R. microplus* asociadas a las medidas de manejo químico en bovinos han contribuido al establecimiento de áreas enzoóticamente inestables con niveles bajos en los títulos de anticuerpos, reflejando una alteración en el desarrollo de una inmunidad protectora, lo que lleva a un incremento en la aparición de casos clínicos de babesiosis (Quintão-Silva y Ribeiro 2003; Brown, et al. 2006)

Ríos et al. (2010) encontraron una serorreactividad para *B. bovis* mayor al 75% (estable enzoóticamente) en bovinos de 3 a 9 meses que recibieron tratamiento garrapaticida con una frecuencia mayor a 90 días, hallazgo que se relaciona con lo encontrado en este estudio, ya que se estableció una correlación positiva entre las frecuencias de tiempo mayores del baño garrapaticida y la carga parasitaria en los bovinos (Rho: 0.168 y $p=0.010$), situación que garantiza el reto antigénico constante para el bovino por la presencia permanente garrapatas en niveles que permiten el paso de parásitos al hospedador intermediario de la babesiosis. De acuerdo a lo anterior, se puede inferir que una periodicidad de 90 días o más para los tratamientos garrapaticidas en zonas enzoóticas para babesiosis bovina se configura como un factor abiótico que favorece la adquisición de inmunidad protectora en bovinos desde temprana edad, influyendo de forma positiva sobre el control natural de la infección y la consecuente ausencia de signos y síntomas de enfermedad a través del tiempo (Ríos, Zapata et al. 2010). En consecuencia, se asocia una baja frecuencia de tratamiento garrapaticida con altos niveles de infestación de garrapatas en bovinos y el desarrollo de estabilidad enzoótica en la zona (Smith, Evans et al. 2000; Guerrero, Bendele et al. 2007).

Por otro lado, la ausencia de infestación en el hato Caño negro puede ser un factor de riesgo para la aparición de brotes de babesiosis, debido a que se impide la expresión natural de las poblaciones de garrapatas, por lo que los terneros no se encuentran expuestos a la inoculación de parásitos por parte de las garrapatas, y de esta forma se disminuye el reto antigénico que estimula la producción de inmunidad protectora para contrarrestar la infección (Brown 2001; Brown, et al. 2006)

Existen factores que pueden incidir en el desarrollo y transmisión de los hemoparásitos por su vector, entre estos se incluyen: la edad de las garrapatas y la fase de parasitemia en el hospedador, debido a que la garrapata necesita, para adquirir la infección del bovino, permanecer durante 24 horas sobre este durante su más alta parasitemia (Oliveira-Sequeira et al. 2005). En este estudio se obtuvo un porcentaje de garrapatas positivas para *Babesia* sp. del 86.8% por medio de la amplificación de ADN por PCR múltiple, de un total de 770 garrapatas recolectadas en la zona; mientras que por medio de la evaluación directa de hemolinfa se obtuvo una positividad del 36.8%,

mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos ($p=0.01$); sin embargo, se ha demostrado en estudios anteriores que el bajo porcentaje de infección en garrapatas por medio de la evaluación de hemolinfa está directamente relacionado con el tiempo de incubación de las mismas.

Días et al. (2005) sugirieron que la extracción de hemolinfa debe hacerse en el día noveno y décimo de incubación de las garrapatas recolectadas para asegurar un mayor número de esporoquetos en hemolinfa. El porcentaje de la infección en *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus* en los hatos de la zona estudiada fue analizado luego de un periodo de incubación de 7 días, lo cual podría relacionarse con el porcentaje de positividad obtenido por técnicas microscópicas con respecto al resultado de las pruebas moleculares, aunando esta situación a la sensibilidad de cada una. Además, la amplificación de ADN de *Babesia* sp. del vector, se hizo de la garrapata completa, lo que aumentó la probabilidad de detección de infección con respecto a la evaluación de hemolinfa por partir de una mayor cantidad de muestra, resultado similar al reportado por Quintao-Silva, Melo et al. en 2007.

El parásito predominante en todos los hatos y en todos los grupos de edad fue *B. bigemina* con un 72.9% del total de la infección. El grupo de edad que presentó mayor grado de infección en sus vectores fue el grupo 2 con un 40% del total de garrapatas recolectadas, seguida por el grupo 1 con un 31.8%. No se encontró relación estadística entre la infección en las garrapatas capturadas en los diferentes grupos de edad con la edad de los bovinos; sin embargo, tanto la infección por *Babesia* sp. como la infestación por *R. microplus* predomina en los terneros de 6-7 meses de edad, dato que concuerda con lo reportado por Ríos et al. 2010.

Tradicionalmente la infección en bovinos y garrapatas se ha evaluado por medio de técnicas microscópicas directas, sin embargo y acorde con lo reportado por Quintã o-Silva et al en el 2007 el porcentaje de infección por *Babesia* sp. en bovinos de 3-9 meses de edad por medio de la evaluación microscópica de extendidos de sangre periférica y la amplificación de ADN por medio de la PCR múltiple presentó diferencias estadísticamente significativas entre las dos técnicas, aumentando significativamente

los resultados positivos por medio de la amplificación de ADN, técnica que además permitió discriminar la especie de parásito circulante. Los animales de todos los hatos y todos los grupos de edad presentaron mayor porcentaje de positividad por medio de la PCR múltiple y se pudo evidenciar que ningún animal presentaba infección por *B. bovis* únicamente; aquellos animales que presentaron este parásito, tuvieron infección concomitante con *B. bigemina*; esto coincide con lo reportado por -Sequeira et al. 2005, Adham et al. 2009, Costa-Júnior, Rabelo et al. 2006; ellos encontraron que las infecciones mixtas se presentan en una menor proporción que las infecciones causadas por especies individuales, tanto en los bovinos como en las garrapatas. Caso similar se presentó en el comportamiento de la infección en garrapatas en donde los vectores de todos los hatos y todos los grupos de edad presentaron mayor porcentaje de positividad por medio de la PCR múltiple.

Aunque el resultado del análisis BLASTn de las secuencias nucleotídicas parciales obtenidas del gen ARNr 18S para las cepas seleccionadas de *B. bigemina*, presentaron una identidad del 86.9% con una cepa de *B. bigemina* (AY699276)(Buling, Criado-Fornelio et al. 2007), para ambas secuencias (las provenientes del vector y del bovino), la secuencia presentó algunas dificultades por ser producto del amplificado de un gen multicopia (Cowman, Bernard et al. 1984) por lo que se sugiere que en futuros estudios se realice un procedimiento de clonación del producto de amplificación mediante PCR, antes de realizar su secuenciación.

Estos resultados evidencian la necesidad de estudios epizootiológicos similares en otras regiones ganaderas, con los cuales se determinen los niveles de estabilidad enzoótica; evaluando los indicadores entomológicos y parasitológicos planteados en el presente estudio, cuyo desequilibrio influye en la manifestación clínica de la babesiosis bovina (Ríos et al. 2010).

Esta investigación demuestra, además, la sensibilidad de la técnica de PCR múltiple en comparación con el análisis microscópico. Se concluye de este modo que el análisis microscópico de la hemolinfa de las hembras ingurgitadas y de los extendidos de

sangre periférica, no es una técnica apropiada para determinar las tasas de infección de *Babesia* sp. en estudios epidemiológicos por su baja sensibilidad. Por el contrario, la técnica de PCR múltiple puede aplicarse con éxito en el estudio de babesiosis en áreas endémicas tropicales, tanto en los hospederos intermediarios como definitivos.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación en Microbiología Veterinaria adscrito a la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia, por el apoyo para el desarrollo de cada una de las fases del proyecto. Al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) por su financiación, Al Banco de Germoplasma de Microorganismos – Ecto y Hemoparásitos de CORPOICA quienes proporcionaron las cepas para los controles positivos para las PCR de *B. bovis* y *B. bigemina*. A los dueños de los hatos participantes en el estudio y al personal administrativo y técnico de las fincas por su valiosa colaboración en campo, a la Cooperativa Regional de Ganaderos del Magdalena Medio (COREGAN) por el apoyo logístico en los trabajos de campo y las convocatorias a los ganaderos de la región.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

Este trabajo estuvo financiado como proyecto de Mediana Cuantía por el Comité para el Desarrollo de la Investigación, CODI- Universidad de Antioquia, 2008

REFERENCIAS

Álvarez V, Bonilla R, Chacón I. Frecuencia relativa de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) en bovinos (*Bos taurus* y *B. indicus*) en ocho zonas ecológicas de Costa Rica. Rev Biol Trop 2003; 51(2): 427-434.

Adham FK, Abd-el-Samie EM, et al. Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay I--*Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Parasitol Res 2009; 105(3): 721-730.

Alonso M, Arellano-Sota C, et al. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. Rev Sci Tech 1992; 11(3): 713-733.

Barros S, Madruga C, et al. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(6): 513-517.

Brown WC. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. Vet Parasitol 2001; 101(3-4): 233-248.

Brown WC, Norimine J, Knowles DP, Goff WL. Immune control of *Babesia bovis* infection. Vet Parasitol 2006; 138(1-2): 75-87.

Buling A, Criado-Fornelio A, et al. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. Vet Parasitol 2007; 147(1-2): 16-25.

Burdogfer W. Hemolymph test a technique for detection of rickettsiae in ticks. Am J Trop Med Hyg 1970; 19(6): 1010-1014.

Cantu A, Ortega SJ, et al. Immunologic and molecular identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free-ranging white-tailed deer in northern Mexico. *J Wildl Dis* 2007; 43(3): 504-507.

Costa-Júnior LM, Rabelo ÉML, et al. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. *Vet Parasitol* 2006; 139(1-3): 231-236.

Cowman A, Bernard O, et al. Genes of the protozoan parasite *Babesia bovis* that rearrange to produce RNA species with different sequences. *Cell* 1984; 37(2): 653-660.

Dias J, Doria MI, Araujo F, Oliveira da Silva G, Massard CL. Dinâmica da infecção de *Babesia bovis* (Babés, 1888, Starcovici, 1893) em fêmeas ingurgitadas e ovos de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1987). *Ciencia Rural, Santa María* 2005; 35(5): 1131-1135.

Guerrero FD, Bendele KG, et al. Detection of *Babesia bigemina* infection in strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from outbreaks in South Texas. *Vet Parasitol* 2007; 145(1-2): 156-163.

Guglielmone A, Gaido A, et al. Light microscopy diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* kinetes in the haemolymph of artificially infected *Boophilus microplus* engorged female ticks. *Vet Parasitol* 1996; 61(1-2): 15-20.

Gómez L. La Frontera Antioquia-Santander. Las fronteras de Antioquia. Aspectos físicos, jurídicos, históricos, económicos y socioculturales. Departamento Administrativo de Planeación. Gobernación de Antioquia 2005: 1-80pp.

Melendez R, Forlano M. Incidence and intensity of *Babesia spp.* sporokinetes in engorged *Boophilus microplus* from a dairy herd in Venezuela. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 791: 148-156.

Morzaria S, Katende J, et al. New methods for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87 Suppl 3: 201-205.

Morzaria S, Katende J, et al. Development of sero-diagnostic and molecular tools for the control of important tick-borne pathogens of cattle in Africa. Parasitologia 1999; 41 Suppl 1: 73-80.

Oliveira MC, Oliveira-Sequeira TC, et al. Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. Vet Parasitol 2008; 155(3-4): 281-286.

Oliveira MC, Oliveira-Sequeira TC, et al. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol 2005; 130(1-2): 61-67.

Quintao-Silva MG, Melo MN, et al. Comparison of duplex PCR and microscopic techniques for the identification of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in engorged female ticks of *Boophilus microplus*. Zoonoses Public Health 2007; 54(3-4): 147-151.

Quintão-Silva M, Ribeiro M. Infection rate of *Babesia* spp. sporokinetes in engorged *Boophilus microplus* from an area of enzootic stability in the State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(8): 999-1002.

Ravindran R, Rao J, Mishra A. Detection of *Babesia bigemina* DNA in ticks by DNA hybridization using a nonradioactive probe generated by arbitrary PCR. Vet Parasitol 2006; 141(1-2):181-5

Ríos L, Álvarez G, Blair S. Serological and Parasitological Study and Report of The First Case of Human Babesiosis in Colombia. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36(4):493-8. Epub 2003 Aug 13.

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822003000400010&tlng=es&lng=en&nrm=iso

Ríos L, Zapata R, et al. Estabilidad enzoótica de babesiosis bovina en la región de Puerto Berrío, Colombia. Rev Cient (Maracaibo) 2010; 20(5): p.485-492.

Ríos S, Ríos L. Principal molecular markers used to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Rev MVZ Córdoba 2011; 16(2): 2470-2483.

Rosero D. Optimization of a DNA extraction procedure for anopheline mosquitoes. Colombia, Rev Colomb Entomol 2010; 36: 260-263.

Smith R, Evans D, et al. Babesiosis (*Babesia bovis*) stability in unstable environments. Ann N Y Acad Sci 2000; 916: 510-520.

Villafañe C, Posso D. Protocolos de extracción de ADN total de animales método de *Salting Out*. Protocolos de laboratorio UEG 2009 (<http://www.ivic.gob.ve/ecologia/ueg/>). Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe- Venezuela.