



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



"EVALUACION DE LA CAPACIDAD
INMUNOPROTECTORA DE UNA
CLONA IRRADIADA de *Babesia bovis*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

Jesús Ocampo Almazán

ASESORES:

Dr. Julio V. Figueroa Millán

MVZ. Pablo Martínez Labat

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN ^{UNIVERSIDAD NACIONAL}
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR ^{ESTUDIOS}
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES ^{CUAUTITLÁN}

UNIVERSIDAD NACIONAL
 AVENIDA DE
 MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
 P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Evaluación de la capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada
de Babesia bovis"

que presenta el pasante: Jesús Ocampo Almazán

con número de cuenta: 8960114-3 para obtener el TÍTULO de:
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 4 de Julio de 1994

PRESIDENTE MVZ. Pablo Martínez Labat
 VOCAL MVZ. Jorge Luis Rico Pérez
 SECRETARIO MC. Fernando Alba Hurtado
 PRIMER SUPLENTE QBP. Guillermo Valdivia Anda
 SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Raúl Radillo Rodríguez

Pablo Martínez Labat
Jorge Luis Rico Pérez
MC. Fernando Alba Hurtado
QBP. Guillermo Valdivia Anda
MVZ. Raúl Radillo Rodríguez

DEDICATORIAS

A Dios

**A mis Padres: El Profr. Héctor Ocampo Ayala y
La Profra. Esther Almazán de Ocampo,
por todo su apoyo, comprensión y confianza.**

**A mis hermanos: Abigail, Aarón, Héctor Francisco y Teresa,
por su comprensión y apoyo.**

A Eva: por todo tú Amor.

**A mis Amigos: El Ing. Sergio Váldez Muñoz
y El MVZ. David García Tapia,
por su invaluable Amistad.**

**Al Dr. Julio V. Figueroa Millán,
por que creyó en mí y por brindarme el apoyo,
y la confianza necesaria para realizar este
trabajo.**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México
y a la
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
por ser mi casa durante mis estudios.**

AGRADECIMIENTOS

**Al MVZ. Pablo Martínez Labat,
por su valiosa guía en la realización de
este trabajo.**

A los Drs. MC. J. Antonio Álvarez Martínez

MVZ. J. Alberto Ramos Aragón

MC. Edmundo Rojas

Dr. J. Germinal Cantó

A los Biólogos

Carmen Rojas

Ernesto y Javier Ontiveros

por su apoyo y Amistad

Gracias.

Al MVZ. J. Jesús Almazán Zamora y

al Profr. Antonio Almazán Cadena

por ayudarme a aprender y practicar

Gracias.

A mis Compañeros(as) y Amigos(as) de la

Selección de Basquetbol FES-C y

UNAM-ORO,

Gracias por compartir conmigo momentos

de triunfo y de derrota.

Y al Coach MVZ. Vidal Melo Servín

y al Lic. Angel Contreras les agradezco su

Amistad y apoyo.

A la MVZ. Laura del Moral Piña,

gracias por tus consejos y Amistad.

**A todos mis compañeros de carrera
les agradezco su apoyo y amistad, esperando que
triunfemos en esta carrera tan digna.**

**A mis familiares y amigos
Gracias.**

**A mis Padrinos y a Sandra
Gracias.**

**A Chila y Raúl
Gracias.**

Este trabajo se realizó gracias al Proyecto No. 366 de "Alternativas para el control de la babesiosis bovina" del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del INIFAP-SARH.

INDICE

	Página
1) Índice.	I
2) Resumen.	II
3) Introducción.	1
Revisión de literatura.	
4) Material y métodos.	31
5) Resultados.	39
6) Discusión.	63
7) Conclusiones y/o recomendaciones.	69
8) Apéndice I.	71
Apéndice II.	72
9) Bibliografía.	75

RESUMEN

Con el objeto de determinar la dosis mínima inmunizante de una clona irradiada de *B. bovis*, se utilizaron 20 bovinos Holstein-Friesian de 12 meses de edad, distribuidos en cinco grupos. Los animales de cada grupo fueron premunizados con una clona irradiada de *B. bovis* derivada del cultivo *in vitro* con dosis de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 eritrocitos infectados, respectivamente. Se registró la temperatura rectal y se obtuvieron muestras de sangre para medir el volumen celular aglomerado (VCA = Hematocrito), el grado de parasitemia y determinar la presencia de anticuerpos anti-*Babesia bovis* en suero mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta. Durante los días 5-7 post-inoculación hubo un aumento ligero en la temperatura rectal y una disminución del hematocrito, particularmente en los animales que recibieron la dosis más altas, en los que se confirmó la presencia de parásitos, falleciendo uno de ellos. Siete meses después, los bovinos premunizados, así como un grupo testigo de cuatro animales, se confrontaron con 10^8 eritrocitos infectados con cepa de campo de *B. bovis*. Al desafío se observó que excepto por un animal vacunado que demostró cambios significativos en el VCA (descenso del 25%) y fiebre (>40 °C), los restantes animales, independientemente de la dosis inmunizante utilizada previamente, resistieron el desafío con la cepa de campo. El grupo testigo presentó fiebre mayor a 40 °C por cuatro días consecutivos, descenso en el VCA

en más del 20% del valor basal. El grupo testigo se trató con babesicidas para evitar su muerte, dado que clínicamente estaban afectados en forma severa.

INTRODUCCIÓN REVISIÓN DE LITERATURA

La distribución de la babesiosis es muy extensa, corresponde la mayoría de las veces a la de su vector, las garrapatas del género *Boophilus*. La babesiosis ocurre en muchas áreas del mundo, y con mayor incidencia dentro de los 32° N y 30° S de latitud en donde los vectores de la enfermedad radican comúnmente (35).

El impacto económico de la enfermedad en América ha sido estimado por la cantidad de pérdidas que ocasiona en la ganadería bovina de este continente. Aproximadamente 250 millones de bovinos residen en Centro y Sudamérica y aproximadamente 170 millones (70%) están en regiones infestadas por garrapatas. Esto representa una pérdida total de 875 millones de dólares por año para la industria ganadera bovina de América latina (67). Es importante hacer notar que en cerca de todos los llamados países en desarrollo que están dentro de las latitudes mencionadas existe endémicamente la babesiosis, anaplasmosis y la infestación por garrapatas. El esfuerzo de estas comunidades por importar bovinos para aumentar el potencial de producción desde Norteamérica y Europa se ve complicado casi siempre por la presencia de la babesiosis endémica, la cual cuando es transmitida a bovinos susceptibles invariablemente ocasiona problemas de salud animal. Las pérdidas por muerte en animales maduros

puoden ser altas, en caso de que estas infecciones no sean controladas por quimioterapia, vacunación o manejo del vector. La prevalencia endémica de la infestación por garrapatas, la babesiosis y la anaplasmosis, son en números los factores de mayor importancia con los que enfrenta la introducción de ganado de mejor calidad a estas zonas (35). En México las pérdidas estimadas en 1975 debido a la infestación por garrapatas y las enfermedades transmitidas por ellas fueron de 3,587 millones de pesos, de las cuales sólo el 6.3% se debió a la muerte, mientras que 83.6%, 8.5% y 1.6% se atribuyeron a la pérdida en producción de carne, leche y pieles (46).

En 1980 las pérdidas ocasionadas por babesiosis solamente se estimaron en 2,712 millones de pesos, lo que en la actualidad representaría arriba de 500 millones de nuevos pesos (22). Los reportes más recientes en México muestran porcentajes de infección con babesiosis que varían desde el 4% en zonas consideradas libres de la enfermedad hasta el 96% donde no existe control adecuado (1).

La babesiosis causada por *Babesia bovis* y *B. bigemina* ha tenido un mayor impacto sobre el desarrollo de la industria ganadera de Norte y Sudamérica, Australia y Sudáfrica. Verdaderamente en estas regiones la babesiosis ha sido y continua siendo una de las causas de mayor importancia debido a que provoca un alto porcentaje de mortalidad en bovinos (46).

HISTORIA

En respuesta a la notoria persistencia de una enfermedad que atacaba a los bovinos, el gobierno Rumano en 1887 estableció una comisión dirigida por el Dr. Victor Babes para investigar y determinar la causa y dar soluciones al problema. Como resultado de este estudio el concluyó que la causa de la enfermedad denominada Hemoglobinuria enzoótica, fue un pequeño organismo intraeritrocítico el cual en 1888, él nombró *Haematococcus bovis*(3). Starcovici, un miembro del equipo de Babes, en 1893 renombró el agente etiológico, llamándolo *Babesia bovis* (72).

Smith en 1889, reportó la observación del agente etiológico de la Fiebre de Texas, al cual no le dio nombre por esta vez; ya que daba el crédito a Stiles por ser el primero en observar el organismo 20 años antes(68). En 1893 Smith y Kilborne propusieron el nombre de *Pyrosoma bigeminum* (después *Babesia bigemina*) para el parásito de Norte América, y algo más importante, establecieron por primera vez que este protozooario patogénico puede ser transmitido por un hospedador artrópodo intermediario (*Boophilus annulatus*)(69). Rees en 1934 determinó que ambos *B. bigemina* y *B. bovis* estuvieron involucrados en los E.U. como agentes etiológicos de la Fiebre de Texas. El adicionalmente sugiere, después de revisar lo que Smith y Kilborne han

aseverado que *B. bovis* había estado presente en los primeros días antes del reconocimiento de la *Babesia* (58).

Lignieres, estudiando la enfermedad de los bovinos en Argentina conocida como Tristeza, reconoció en 1903 dos formas de *B. bigemina*. Una forma fue grande, remembrando el organismo descrito por Smith y Kilborne, mientras que la otra fue pequeña y muchas veces difícil de observar en los frotis sanguíneos, pero más fácilmente vista en sangre extraída de capilares de riñones y de las meninges del sistema nervioso(40). Lignieres en un escrito de 1910, llama al pequeño organismo *Piroplasma argentina*, conocido posteriormente como *Babesia argentina*(41). El término *B. argentina* fue usado por muchos años en Australia, Centro y Sudamérica. Esto no fue completamente convenido, si no que a mediados de los años 70's, un consenso de parasitólogos dijeron que *B. argentina* y *B. bovis* son la misma y por tanto la denominación de *B. bovis* debería tener prioridad(35).

Dos especies adicionales de parásitos bovinos causantes de enfermedad se reportaron posteriormente. *Piroplasma divergens* fue descrito como una especie del parásito en Inglaterra por Mac'Fadyean y Stockman(45); y la cuarta especie taxonómicamente reconocida de *Babesia* fue reportada en bovinos importados de Algeria para Francia. Este parásito fue nombrado después *Babesia major* (66).

Durante la temprana edad como país de los Estados Unidos, una enfermedad llamada Fiebre del Bovino de Texas (Fiebre del bovino del sur) fue la causa más notoria y considerable de muerte entre bovinos mayores de un año. El origen de la Fiebre de Texas y su aparición por primera vez en Estados Unidos es desconocido. Pero es generalmente aceptada la teoría de que fue introducida desde el Este de las Indias durante la colonización española de México y otras partes del Sur de los EE.UU.. La teoría de la "garrapata" concerniente a la transmisión de la enfermedad fue propuesta anteriormente en 1867 por Harris. Fue basada en la asociación que hay de por medio entre la presencia universal de la garrapata y bovinos del Sur, y la aparición de la enfermedad en bovinos nativos del norte de los EE.UU.(29).

TAXONOMÍA Y ETIOLOGÍA

Por acuerdo de Levine (1982) y el comité sobre sistemas y evaluación de la Sociedad de Protozoólogos (39), *Babesia* fue clasificada de la siguiente manera:

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum II: Apicomplexa (Levine, 1970)

Clase 2: Sporozoa (Leuckart, 1879)

Subclase 3: Piroplasmia (Levine, 1961)

Orden 1: Piroplasmida (Wenyan, 1926)

Familia: Babesiidae (Pache, 1913)

Género: Babesia (Starcovici, 1893)

Muchas especies de *Babesia* en bovinos han sido reportadas en la literatura. No obstante en el pasado el número y nombres de las diferentes especies de *Babesia* que parasitan el bovino han sido válidamente cuestionados. Hoyte en 1976 propuso una lista que consistió en cuatro especies válidas de *Babesia* en el bovino(31).

La lista de especies de *Babesia* del bovino con sus sinónimos está como sigue (31,37):

(1) *Babesia bovis* (Babes, 1888; Starcovici, 1893)

Sinónimos: *B. argentina* (Lignieres, 1910)

B. berbera (Sergent, 1924)

B. colchica (Yakimof, 1928)

(2) *Babesia bigemina* (Smith y Kilborne, 1893)

Sinónimos listados por Levine (1971):

Pyrosoma bigeminum (Smith y Kilborne, 1893)

Apiosoma bigeminum (Smith y Kilborne, 1893;

Wandolleck, 1895)

Piroplasma bigeminum (Smith y Kilborne, 1893;

Patton, 1895)

Piroplasma australe (Miranda y Horta, 1913)

Piroplasma bubali (Schein, 1923)

Babesia hudsonius bovis (Bewhill, 1909)

Lushia bigemina (Smith y Kilborne, 1893;

Delpy, 1946)

(3) *Babesia divergens* (McFadyen y Stockman, 1911)

Sinónimos: *B. caucasica* (Yakimoff y Belawine, 1926)

B. occidentalis (Yakimoff y Bourzeff, 1927)

B. korelica (Yakimoff, 1928)

(4) *Babesia major* (Sergent, Donatien, Parrot, Lestoquard y Plantoreux, 1926)

La mayoría de los taxonomistas aceptan estas cuatro especies, sin embargo, Purnell (56,57) basándose en diferentes estudios reportados por Nikolskii *et. al.*(54), consideró a *B. jakimovi* como la quinta especie de *Babesia*.

Similarmente, Minami y col. (49) mostró que las especies japonesas de *Babesia* no presentaban reacción cruzada serológicamente con *Babesia bigemina* o *Babesia major*. Minami e Ishihara (48) compararon la *Babesia* japonesa morfológicamente, etiológicamente y serológicamente con *B. bigemina*, *B.*

bovis, *B. divergens* y *B. major*. Ellos llegaron a la conclusión de que la *Babesia* japonesa fue diferente de las otras cuatro y por tanto debería de ser reconocida como una nueva especie, *Babesia ovata*. Estas especies están exclusivamente restringidas a Japón y son transmitidas por *Haemaphysalis longicornis*(48,49).

Babesia jakimovi es considerada una especie grande y es el agente responsable de la piroplasmosis siberiana en la ex-Unión Soviética. Su vector biológico es la garrapata *Ixodes ricinus*, y las moscas pueden transmitir la enfermedad mecánicamente (54).

Babesia divergens es una babesia pequeña muy similar morfológicamente a *B. bovis* pero tiende a ocupar la periferia o margen de los eritrocitos. Su vector es *Ixodes ricinus*, una garrapata de zonas templadas. Esto limita su distribución, la cual está a lo largo del norte de Europa y en la Rusia europea (56,57).

Babesia major es un piroplasma grande reportado en Europa y, dentro de Europa es restringido el grado de distribución de su vector *Hamephysalis punctata* (57).

Babesia bovis es una babesia pequeña distribuida sobre una extensión muy ancha en el Viejo y Nuevo Mundo. Está ha sido reconocida en Norþe América(México), América Central y Sudamérica, en Africa, Asia, Europa y Australia. En Australia es notablemente patogénica (43). Como en las otras especies de *Babesia* su distribución está limitada por la habilidad de supervivencia

del vector bajo condiciones tropicales. El vector común es una garrapata del género *Boophilus* (10).

Babesia bigemina no es considerada usualmente como un importante patógeno como *B. bovis*, pero frecuentemente ocurre en asociación con otras enfermedades causadas por garrapatas y ejerce un sinergismo patogénico (57). Es considerada como una especie grande, establecida sobre la misma área geográfica que *B. bovis*, debido a que ellas comparten el mismo vector biológico *Boophilus spp.* Este ha sido reportado en el sur de la exURSS y el sur de Europa (España y Grecia), pero *B. bigemina* no ha sido reportada en otros países de la Comunidad Económica Europea (57).

EPIDEMIOLOGÍA

Los factores directamente involucrados en la transmisión de la babesiosis son en conjunto un complejo de tres elementos; el vector, el parásito y el huésped. A estos se les unen ciertos factores que pueden modificar la transmisión y presencia de la enfermedad, como son: Infección del vector, edad del hospedero, temperatura ambiental, humedad relativa, edad de las garrapatas(1).

Infección del vector(1).- La infección de *Boophilus microplus* y *Boophilus*

annulatus con *Babesia spp.*, es un ciclo complejo que se inicia desde la ingestión de sangre de un hospedero infectado con *Babesia bigemina* en el patrón de transmisión, incluyendo hecho de que *B. bovis* se transmite únicamente por larvas infectadas de *B. microplus*, no por ninfas ni adultas. Las larvas pierden la infección luego de haber ocurrido la transmisión, impidiéndose de esta forma la transmisión vertical.

Edad de las garrapatas.- Larvas de *B. microplus* sometidas 14° C y 95% de humedad relativa, han sido capaces de mantener viable a *B. bovis* durante 65 días, además de que las larvas pueden sobrevivir en esas condiciones hasta 200 días.

Factores físicos(1):

Temperatura.- La ovoposición a temperaturas de 30 a 37° C, induce el desarrollo de estadios infectivos de *B. bovis* y *B. bigemina* en *B. microplus*.

Humedad relativa.- Es uno de los factores más importantes para el desarrollo de la garrapata, aunque no importante para el desarrollo de *Babesia spp.*, se considera un nivel óptimo el 80%.

Factores del hospedero:

Genética.- Genéticamente el ganado *Bos indicus* es más resistente a la babesiosis que el ganado europeo o *Bos taurus*.

Edad.- Los becerros debido a la ingestión de anticuerpos calostrales son más resistentes a la enfermedad clínica pero no a la infección; esto mismo determina el grado de severidad ya que animales que nacieron de hembras susceptibles son más resistentes a la enfermedad hasta por los 8 meses de edad, ya que la mayoría de los brotes clínicos de la enfermedad se dan entre los 10 a 24 meses de edad .

Inmunidad.- La inmunidad se adquiere activamente contra las babesias por exposición del hospedero al parásito vivo o inactivado o bien por productos de los mismos. La respuesta inmune del hospedero controla la parasitemia destruyendo parásitos, eritrocitos y detiene crecimiento y multiplicación del parásito. Los animales que sobreviven a la fase aguda de la infección quedan inmunes a la reinfección con la cepa homóloga, así como aquellos que se mantienen en equilibrio entre vector-parásito y hospedero, llamándosele premunición(1).

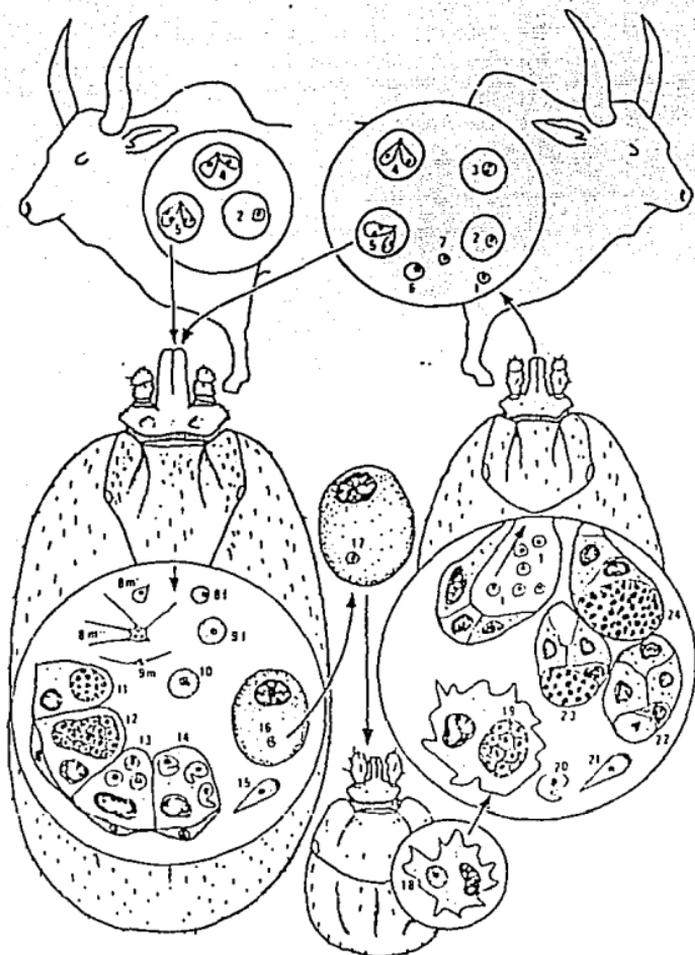
De los parásitos existentes en la sangre del ganado infectado, continúan su desarrollo solo los ingeridos durante las últimas 24 hrs. de vida parasitaria de las garrapatas. El número de parásitos ingeridos depende de la proporción de garrapatas que se alimenten sobre los bovinos, se estima que solo una pequeña proporción de larvas, 1 de cada 2500 está infectada, esto a nivel de campo(1).

TRANSMISIÓN Y CICLO BIOLÓGICO DE *Babesia*.

La transmisión de la babesiosis bovina causada por *B. bovis* y *B. bigemina* es ocasionada por todas las especies de *Boophilus* que han sido confirmadas como los vectores potenciales y principales de esta enfermedad . Las especies de *Boophilus* que más se conocen como transmisores de la enfermedad son: *Boophilus annulatus*, *Boophilus microplus* y *Boophilus decoloratus*. Estas garrapatas son parásitos que se alimentan de sangre, son parásitos de un solo hospedador y este hospedador debe ser ungulado(50).

El ciclo de vida de las babesias antes citadas se ha adaptado a estas características (50). El ciclo de vida de *Babesia bovis* esta ilustrado en la Figura 1, y explicado en la nomenclatura.

FIGURA No 1. Ciclo de *Babesia bovis* en el bovino y en el vector *Boophilus*.



Tomado de Tropical Veterinary Parasitology (50).

Ciclo biológico de *Babesia bovis* en el bovino y en la garrapata *Boophilus*.

(Nomenclatura para la figura 1)

- 1.- Esporozoito metacíclico infectante inoculado por la garrapata.
- 2.- Trofozoito dentro del eritrocito.
3. Binucleación ovalada o trofoblasto ameboideo.
4. Esquizogonia bipartida con dos merozoítos piriformes uninucleados.
- 5.- Esquizogonia madura con dos merozoítos piriformes nucleados.
- 6.- Merozoito libre después de la disociación de la esquizogonia y la destrucción del eritrocito.
- 7.- Merozoito libre capaz de infectar otro eritrocito.

Una vez adquirido por la hembra *Boophilus*.

- 8f.- Ingestión del merozoito por la garrapata, desarrollándose en un macrogametocito.
- 8m. Ingestión del merozoito por la garrapata (8m') desarrollándose en un macrogametocito por un proceso de multiplicación nuclear y exflagelación (8m").
- 9f.- Macrogameto hembra.
- 9m. Microgameto filiforme macho resultante de la exflagelación.
- 10.- Cigoto hipotético que penetra a una célula digestiva.
- 11.- Trofoblasto dentro de una célula del epitelio digestivo.

12. Esporoblasto intestinal inicial que produce blastozoítos.
13. Bulbo intracelular de blastozoítos.
14. Blastozoítos intracelulares en el proceso de elongación por fisión.
15. Blastokineto vermiforme libre en el hemocele; estos penetran a varios tejidos celulares (conectivo, germinativo, digestivo y excretor), dando un esporoblasto secundario que produce bulbos de blastozoítos y vermiculos.
16. Blastozoito dentro de un oocito, que se desarrollará en la siguiente generación de garrapatas.

En la progenie de la hembra *Boophilus* infectada.

17. Blastozoito en el huevo; esto dará esporoblastos e intercalará blastozoítos durante la embriogénesis.
18. Blastozoito intercalado dentro de un hemocito de la larva (o dentro de cualquier célula conectiva, digestiva, o excretora) principiando la intercalación de esporoblastos.
19. Esporozoitos intercalados en un hemocito de la ninfa (o dentro de cualquier célula conectiva, digestiva o excretora).
- 20 21. Blastokinetos terminales con un tropismo salival en el hemocele.
22. Blastozoito terminal en una célula del acinus salival.
23. Trofoblasto terminal (comienza su desarrollo dentro o fuera del hospedador, dependiendo de la temperatura externa).

24.- Esporoquiste terminal produciendo esporozoitos metacíclicos infectantes (1) dando relativamente un grado avanzado de infección, dependiendo de la influencia de la temperatura externa o de la falta de comida en la hembra *Boophilus*.

PATOGENIA.

La patogenia de la babesiosis bovina puede dividirse en dos fenómenos diferentes, pero muy ligados el uno con el otro, uno causado comúnmente por *Babesia bigemina* y el otro por *Babesia bovis* (50,51).

Babesia bigemina por lo general provoca el fenómeno de la anemia hemolítica, en donde la principal causa de este fenómeno es la destrucción masiva de eritrocitos, ocasionado por factores mecánicos y autoinmunes (52). El factor mecánico aquí, es determinado por el tamaño de *B. bigemina*, que al salir puede provocar más fácilmente su ruptura, o dañarlos de tal forma que se provoquen su más fácil fagocitosis o su destrucción en el bazo (52,71). Los factores autoinmunes son ocasionados por la presencia de antígenos de *Babesia* en las membranas de los eritrocitos, en donde esto desencadena la cascada del complemento de la siguiente manera (Fig 2): (se sugieren como otras posibles causas de la anemia hemolítica; 50,73):

1. El antígeno de la *Babesia* se adhiere a la superficie de los eritrocitos, lo cual provoca que estos sean reconocidos como extraños y sean fagocitados por el sistema retículo endotelial.
2. Es posible que el antígeno de la *Babesia* active el sistema properdina, permitiendo la fijación del complemento hasta C3b y C5b, que se pegarían en la superficie de los eritrocitos estimulando su fagocitosis.
3. Se pueden formar anticuerpos contra el antígeno que actuarían como opsoninas sobre los eritrocitos.
4. Los anticuerpos podrían fijar el complemento, produciéndose C3b y C5b, que ayudarían a la fagocitosis de los eritrocitos.
5. Los anticuerpos podrían fijar el complemento hasta C9, provocando la lisis de los eritrocitos.
6. Formación de inmunoconglutininas contra C3b adherido a los eritrocitos, que estimularía la fagocitosis. En ruminantes la presencia de congulutinas tendría la misma función.
7. Se ha demostrado que en los tripanosomas exista una sustancia hemolítica; en *Babesia* esto podría ser una posibilidad, aunque no se ha demostrado.
8. Sustancias de la *Babesia* alterarían las características de la membrana, lo cual provocaría que se formaran anticuerpos que actuarían como opsoninas.
9. Estas opsoninas fijarían el complemento, y a través de C3b y C5b

incrementarían la fagocitosis además de continuar la fijación hasta llegar a provocar lisis.

10. El complejo C567 provocaría la lisis inmunoreactiva en los eritrocitos cercanos.

La fagocitosis de los eritrocitos no infectados, probablemente se debe a que se adhieren antígenos de la *Babesia*, y también al incremento en la actividad del sistema reticuloendotelial, que ocurre durante la babesiosis, así como a los cambios de la membrana, que dan por resultado alteraciones en la forma y en el incremento de la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos no infectados, en comparación con los infectados, lo cual, los predispondría a una lisis espontánea, particularmente en los capilares sanguíneos (77).

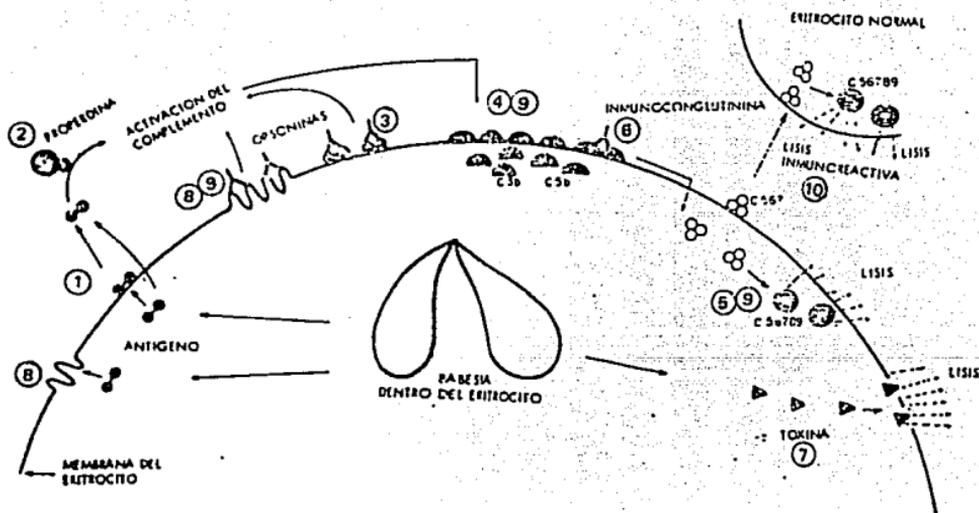
En el caso de *Babesia bovis* lo que generalmente ocurre, es una alta liberación de sustancias farmacológicamente activas que provocan vasodilatación, éstasis sanguíneo y choque, además de una coagulación intravascular diseminada (CID) y trombosis pulmonar mortal subsiguiente en terneros infectados por *B. bovis* (6,11,77).

Babesia bovis produce una enzima que activa la presencia de la calicreína en células de varios órganos, especialmente en el estroma de las células rojas sanguíneas (CRS). Las cininas producidas tienen efectos vasodilatadores e hipotensivos que incrementan la permeabilidad vascular. Estos fenómenos ocurren tempranamente y preceden a la aparición de parasitemia. Los efectos

producidos son completamente de choque, estasis sanguínea, y ocasionan la caída del volumen sanguíneo incluso antes de la hemólisis. La actividad de las cininas simultáneamente con otros productos porfirínicos degradados induce a lesiones en corazón y riñones (47,77).

Los antígenos de *Babesia* forman complejos con el fibrinógeno e inducen aglutinación y adherencia de CRS parasitadas a la pared vascular. El efecto es incrementado localmente por la acumulación de eritrocitos. El flujo sanguíneo es obstruido y hay distensión capilar. El fenómeno ocurre en riñones pero principalmente en la corteza cerebral ocasionado por la arborización de los capilares (50,51,76).

FIGURA No. 2 Esquema de las probables causas de la anemia en la Babesiosis.



○ = NÚMEROS EN CÍRCULO; VER DESCRIPCIÓN EN EL TEXTO.

Tomado de Inmunología de la babesiosis, A. Morilla(52).

SIGNOS CLINICOS.

El periodo de incubación es de 7 a 10 días.

Los signos más característicos son los siguientes:

Fiebre (40-41°C), deshidratación, emaciación, pelo erizado, ojos sumidos, acompañados de anorexia, debilidad, temblores, atonía ruminal, disnea y taquicardia (6,11,26,50).

Babesia bigemina ocasiona hemólisis marcada debido a la gran destrucción eritrocitaria que ocurre, siendo la anemia un signo primario causado por esta hemólisis (el volumen celular sanguíneo puede caer hasta 10% del normal). La sangre se vuelve muy fluida y oscura y hay una hemoglobinuria muy marcada (50,51). Secundariamente se dará la ictericia como signo característico. La ictericia severa esta correlacionada con parasitemia que puede ser de hasta 50-100% (11,50). La ictericia ocasiona ciertas lesiones orgánicas. Se da una neumonía, desarrollada por irritación del parenquima pulmonar ocasionado por la bilirrubina. Junto con la atonía ruminal ocurre constipación y diarrea negrusca (49,51).

Babesia bovis no suele ocasionar parasitemias altas (<.5%) en comparación con *B. bigemina* en sangre periférica (>.5%). La hemólisis, ictericia y hemoglobinuria casi no se dan con ella (50).

Hay desórdenes del equilibrio (ataxia, movimientos de pedaleo), signos de encefalitis, rechinado de dientes, apetito pervertido y agresión evidente (ataque) (6,50,51). En ambas suele ocurrir el aborto de las hembras preñadas, y también se da la agalactia, este puede ser un signo temprano de la enfermedad(6).

LESIONES MACROSCÓPICAS.

Los tejidos quizá se encuentren congestionados, pero suponiendo que la enfermedad se haya prolongado, éstos estarán pálidos. La ictericia está a menudo presente, pero quizá no es tan obvia si la congestión es intensa(11,50).

Comúnmente hay presencia de hemorragias subserosas, particularmente en el corazón y los intestinos. La sangre usualmente fluye libremente cuando los vasos están dañados. La vejiga frecuentemente contiene orina roja; los riñones presentan varios grados de congestión; el bazo se encuentra agrandado (hasta varias veces el tamaño normal) con sangre oscura y la pulpa ablandada; el hígado está agrandado y café (o amarillo en caso de dilatación) y la vesícula biliar está llena frecuentemente con bilis granulosa. El corazón y pulmones usualmente están normales, excepto por la variable presencia de hemorragias y manifestación ocasional de edema. Los pulmones afectados por consiguiente contienen una copiosa cantidad de exudado sanguinolento. El encéfalo aparenta

normalidad, pero en las infecciones con *Babesia bovis* la materia gris de la superficie quizá esté distintivamente rosada(11). Esto puede traer la presentación de signos nerviosos cuando el encéfalo contiene fluido en exceso y está más blando de lo normal(11,49,50). Wright y col.(81) reportó marasmo (emaciación y debilidad progresiva) en la musculatura intercostal y de los miembros posteriores.

LESIONES MICROSCÓPICAS

La mayoría de los cambios son observados en el hígado, con necrosis centrilobular en zona media, y distensión de canaliculos biliares. Las células de Kupffer contienen productos de degradación de la hemoglobina, algunas veces, al estar infectados o aparentemente no infectados los eritrocitos. En otros tejidos linfáticos (bazo, ganglios) hay menos linfocitos de lo normal, simultáneamente hay abundancia de macrófagos, muchos de los cuales contienen hemosiderina(11). En casos severos los riñones están afectados, con degeneración tubular y depósito de hemosiderina a lo largo de todas las nefronas. Quizá se encuentre derramado y presente material hialino y de incorporación granular de la hemoglobina. En las afecciones por *Babesia bovis*, los vasos más pequeños son llenados con eritrocitos parasitados; en el encéfalo los eritrocitos

infectados taponan los capilares, ocasionando algunas veces edema intersticial (13).

Cuando el edema pulmonar ocurre, el depósito de fibrina y la trombosis son encontradas aquí y en otros tejidos también (19,20). Wright y col.(80), encontró una extensa degeneración del músculo esquelético de los miembros posteriores, con edema perivascular en casos agudos de infección con *Babesia bovis*. Los cambios en los tejidos son menos pronunciados en las infecciones por *Babesia bigemina* que en las de *B. bovis* pero en las infecciones por *B. bigemina* relativamente son más evidentes los parásitos en los vasos sanguíneos pequeños(11).

Hay que hacer notar que la babesiosis en México por lo general se presenta con ambas especies de *Babesia* además de la presencia en la mayoría de las ocasiones del *Anaplasma marginale* junto con ellas, dando por resultado un sinergismo muy elevado en la enfermedad que puede traer consigo la muerte del animal si no hay un diagnóstico adecuado y un tratamiento temprano. Cabe hacer notar que puede haber recuperación espontánea de la enfermedad.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la babesiosis en ciertos casos puede ser sencillo cuando los signos de la enfermedad son muy marcados y está presente el vector. Se debe tomar en cuenta también la raza del animal y cuestionar si el animal es nuevo en la zona de prevalencia de la enfermedad, así mismo se deben realizar muestreos de sangre para que ésta sea evaluada ahí mismo en el campo o en el laboratorio. Una vez en el laboratorio se deben correr las pruebas que apoyen más rápidamente nuestro diagnóstico, que serían las siguientes: observación al microscopio de frotis sanguíneos, para confirmar la presencia del parásito en los eritrocitos (esta prueba puede ser difícil si los frotis están hechos de sangre periférica, se recomienda obtener sangre de capilares como podría ser en la oreja o en la punta de la cola), evaluación del hematocrito en donde se espera haya un descenso marcado que pueda ser considerado de importancia (15 a 25%), esto nos confirma la presencia de la anemia. Posteriormente se pueden correr pruebas serológicas para confirmar el diagnóstico, pudiendo ser las siguientes: Fijación de complemento, Inmunofluorescencia indirecta, Hemaglutinación pasiva, Aglutinación capilar, Difusión en gel, Aglutinación con bentonita y partículas de latex, Contraelectroforesis y la técnica de Ensayo inmunoenzimático ELISA (11,51). Experimentalmente ya se realiza la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de la babesiosis(27).

CONTROL

Para el control de la babesiosis se han formulado muchas variantes, las cuales van desde el control y la erradicación del vector de la enfermedad hasta el ataque directo contra la babesia(6). Al vector de la enfermedad se le ha tratado de controlar a través de los tiempos con baños garrapaticidas (de asperción o de inmersión), conteniendo éstos, productos que matan a la garrapata. Así mismo en la actualidad se han desarrollado nuevas técnicas para controlar a la garrapata, como el desarrollo de la técnica "Pour on" con el uso de productos de menor resistencia por parte de la garrapata(piretroides).

El ataque directo sobre *Babesia* ha sido con productos babesicidas, los cuales se espera que actuen sobre el 98% de los parásitos que se encuentran infectando al hospedador, para que los que queden, provoquen premunidad. Estos productos son en su mayoría derivados de la Bencidimina (Berenil fórmula), ahora se usa más el Imidocarb para el tratamiento de la babesiosis.

Otra forma de control de la babesiosis es la vacunación, este método es ampliamente usado por los Australianos, los cuales han desarrollado una gran tecnología en este aspecto.

En Australia la vacunación fue introducida entre 1897 y 1900 y fue efectiva, reduciendo enormemente las pérdidas causadas por la babesiosis y que

estaban ocurriendo en Queensland y extendidas hacia el Sur de Australia por *Buophilus microplus*. Esencialmente el mismo método fue usado hasta 1964. La sangre era colectada de novillos que se habían recuperado de un ataque de babesiosis(11).

Hasta que fue introducido el citrato, la sangre era desfibrinada por agitación con plumas o varillas, y entonces inoculado en cantidades de 3 a 10 ml en ganado susceptible. Tal vacuna sirvió para producir una moderada "reacción" seguida de inmunidad. Los animales sangrados se conocieron como donadores de vacunas. Después de 1907, los donadores fueron preparados por laboratorios del gobierno, como Yeerongpilly, Brisbane, posteriormente en Onoonba, cerca de Townsville, y subsecuentemente en Alice Springs. La sangre era colectada en los laboratorios para llenar pedidos de vacuna ordenados, y se vacunaba en los ranchos frecuentemente a un costo nominal para convencer a los ganaderos. La vacunación con cepas de *B. bigemina* y, desde 1930, *B. bovis* (*B. argentina*) y *A. centrale* fueron hechas por pasaje en los laboratorios y usadas en la preparación de los donadores(11). A finales de 1964 el sistema de vacunación fue cambiado. Los parásitos *B. bovis* fueron producidos en bovinos esplenectomizados de los cuales era colectada sangre infectada en grandes cantidades y diluida para contener 10^7 organismos por dosis. El abastecimiento de *B. bigemina* para vacuna cesó; la preparación de vacuna desde Townsville y

Alice Springs se estancó después de unos pocos años(11).

Desde 1964 hasta 1970 la demanda de vacuna se vió incrementada, justamente por encima de las 100,000 dosis por año para llegar a 1,400,000 dosis. El gran establecimiento de la práctica de inmunización fue valorado en bovinos de raza pura, bajo la supervisión veterinaria de los laboratorios gubernamentales, terminando en Junio de 1967(11).

La principal razón para cambiar el tipo de vacuna se debió a que la vacuna obtenida por los donadores en muchas ocasiones fue poco infectiva (15) y por lo mismo no confería una buena inmunidad. La producción de *B. bigemina* para vacuna fue omitida, debido a que esta era poco frecuente en las infecciones de campo, más sin embargo cuando era aplicada como vacuna causaba severas bajas (18). La vacuna preparada en bovinos esplenectomizados proveyó de mejores oportunidades de estandarización y de un mejoramiento gradual en su calidad (2). El efecto benéfico de asegurar la infectividad de la vacuna fue observado, una vez hecho el cambio. Los reportes de fracaso en la vacunación que eran recibidos con bastante frecuencia cesaron, una vez introducida la vacuna de bovino esplenectomizado y como indicativo precedente la demanda de vacuna se incrementó dramáticamente(11).

Probablemente como un resultado por el gran uso que recibió y por las revacunaciones que se presentaban, se presentó la enfermedad hemolítica de los

bovinos recién nacidos, emergiendo como un serio problema a finales de los años 60s y principios de los 70s (11). Para contrarrestar estos efectos, una gran proporción de la sangre fue reemplazada con un diluyente celular libre, haciéndose la recomendación de restringir el uso de la vacunación en los animales, de una a dos inoculaciones antes de un buen apareamiento. Como resultado de la presencia de esta enfermedad hemolítica de los bovinos recién nacidos la importancia de la vacunación se redujo a insignificantes proporciones (12), siendo también una causa sensible del desuso de la vacuna las enfermedades causadas por sangre inoculada e infectada por virus como el de la leucosis bovina(61).

HIPOTESIS

La clona 5B derivada de la cepa KBb de *Babesia bovis* atenuada por irradiación, y usada como un agente premunizante brinda protección a bovinos desafiados con organismos heterólogos después de un mínimo de 6 meses posvacunación.

OBJETIVO

Determinar la inmunogenicidad y capacidad protectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* en bovinos desafiados bajo condiciones controladas.

MATERIAL Y METODOS

Bovinos: Se utilizaron 46 Animales de 1 año de edad, machos de raza Holstein provenientes de zonas libres de garrapatas, los cuales fueron mantenidos bajo condiciones que no permitieron la infestación con garrapatas por que el experimento se realizó en una zona libre de garrapatas (Edo. de Queretaro) a lo largo de todo el experimento, con alimentación y agua *ad libitum*.

Parásitos: a) Cepa inmunizante; Se utilizó la clona 5B de *B. bovis* originalmente derivada de la cepa KBb por dilución crítica, que se ha mantenido en cultivo *in vitro* (originalmente aislada en México y donada por K.L. Kutler, U.S. Department of Agriculture, A.R.S. Hemoparasite Research Unit, Washington State University, Pullman Wa.). La derivación de la clona y la técnica de clonación han sido descritas previamente (62). El medio de cultivo para mantener al parásito en crecimiento *in vitro* consistió de Medio 119 con sales de Earle, sin L-glutamina, suplementado con 40% de suero normal bovino y 30 mM de N-tris[ácido hidroximetil-2-aminoetinosulfónico] (TES, Sigma, St. Louis, MO). Los cultivos contuvieron 10% (v/v) de eritrocitos con un nivel de fluido de 5mm siendo colocados en cajas de 24 pozos de cultivo e incubados a 37°C con una concentración de gas 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, en su atmósfera. El medio sobrenadante fue cambiado diariamente y los subcultivos fueron iniciados cada 48 horas por dilución 1:5 del medio de cultivo viejo con medio de cultivo fresco

que contenía eritrocitos normales de bovino. La expansión en el número de eritrocitos infectados con *B. bovis* fue lograda al poner los parásitos en botellas de cultivo de 75cm² como ha sido previamente descrito (74).

Para estimar las diferentes dosis inoculadas se hicieron conteos de parasitemia y al obtenerla se le multiplicaba por el volumen de eritrocitos contados. Por ejemplo:

Porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) = 0.10%

5×10^9 /ml: 5000000000 - 100%

$$x \quad - \quad 10\% = 500000000 \text{ E Infectados/ml} = 5 \times 10^8$$

5×10^8 - ml

5×10^9 - 10ml Todas las dosis se ajustaron a 10ml con solución Vega y Murguía (VyM)(74).

b) Cepa de desafío: Cepa Pullman que fue transmitida directamente por jeringa.

1) Determinación de dosis mínima inmunizante:

Grupos de 4 animales fueron inoculados por vía intramuscular (IM) con dosis de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , y 10^9 , respectivamente, eritrocitos infectados provenientes de cultivo *in vitro* de la clona irradiada 5B de *B. bovis*. Un grupo semejante permaneció como testigo sin vacunación con globulos rojos infectados pero sí con globulos rojos sanos para la verificación de la virulencia de la cepa de desafío. Los animales fueron observados para determinar la presencia de reacciones

clínicas. Se obtuvo sangre por punción yugular en tubos al vacío sin anticoagulante, y el suero obtenido fue congelado para posterior determinación de anticuerpos específicos por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (53). La sangre capilar se obtuvo de la oreja o de la punta de la cola para la identificación directa del parásito en laminillas teñidas con colorante de Giemsa (53) y observadas al microscopio óptico durante los siguientes 21 días postvacunación. Los animales vacunados se mantuvieron en condiciones que no permitieron la infestación con garrapatas por el resto del experimento. El desafío se llevó a cabo 6 meses postvacunación con una dosis mínima de virulencia la cual se determinó previa al desafío (ver adelante) con parásitos provenientes de un animal inoculado con la cepa Pullman de *B. bovis* la cual había sido mantenida en congelación en nitrógeno líquido. Los animales se observaron de cerca durante los siguientes 21 días para determinar la presentación de reacciones severas y se procuró quimioterapia (Tratamiento) de acuerdo al siguiente criterio:

Temperatura rectal: un grado centígrado arriba del nivel base al comienzo del experimento.

Hematocrito (Ht): un descenso de 25% del encontrado al inicio del estudio. Expresado en porcentaje de caída del hematocrito, tomando como 100% al encontrado antes de cada experimento (basal).

si encontramos 25 al día x, ¿cuanto valen las 8 unidades de hematocrito que

descendieron? ($33 = 100/8 = ?$) = 24.24%.

Parasitemia: > 0.5 % determinada en frotis teñidos con Giemsa. La coincidencia de estos 3 parámetros ó de la presencia de parasitemia y cualquier otro de los 2 parámetros indicó el tratamiento para evitar la muerte de los animales.

2) Determinación de la dosis mínima de desafío:

Grupos de 4 bovinos fueron inoculados por vía IM con dosis de 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 y de 10^8 de eritrocitos infectados con la cepa Pullman de *B. bovis* provenientes de un animal el cual previamente se inoculó con 10^7 eritrocitos infectados mantenidos en congelación y transferidos cuando el animal estuvo sufriendo la enfermedad en forma clínica. La dosis mínima de parásitos que al ser inoculada en animales desencadenó la presencia de enfermedad en forma típica (presencia de parasitemia, fiebre, descenso en el Ht, hemoglobinuria, ictericia, recumbencia etc.) fue considerada como la dosis de desafío.

Los resultados se analizaron obteniendo las medias y las desviaciones estandar por grupo de los parámetros anteriores, para realizar estadística descriptiva(70), y posteriormente basándonos en nuestros parámetros para realizar el tratamiento o no, se realizó un análisis de datos enumerativos en tablas de contingencia, para obtener la χ^2 , en los animales al desafío.

1) Trabajo de campo: Rancho GB del Comité de Fomento Ganadero del Estado de Querétaro, situado en Amazcala, Qro.

2) Trabajo de laboratorio: Centro Nacional Interdisciplinario en Parasitología Veterinaria del INIFAP SARH, Jiutepec, Mor. y Laboratorio de Parasitología M.V.Z. F.E.S. Cuautitlán UNAM.

MATERIAL DE LABORATORIO

Agujas vacutainer

Tubos vacutainer con EDTA

Tubos capilares con heparina

Porta objetos

Lancetas

Jeringas desechables estériles

Agujas #18

Gotero

Metanol absoluto

Colorante de Giemsa

Microscopio óptico (Olympus y Zeiss)

Microscopio de luz ultravioleta (Zeiss)

Placas para microtitulación (Nunc)

Micropipetas

Bomba de vacío

Desecador

Probetas

Viales Ependorff de 500 μ l y de 1 ml

Vasos de precipitado

Agitador magnético

Cajas y vasos de Copling

Reloj

Balanza analítica (Cenco)

Matraz volumétrico 1 y 2 litros

Lápiz de cera

Cámara húmeda

Gradillas

Pipetas de 10 ml

Porta tubos capilares

Centrífuga refrigerada (International Equipment Co.)

Centrífuga Biofuge-A (American Scientific Products)

Centrífuga para hematocrito (Solbat)

Potenciómetro (Jenco)

Hematocitometro (Solbat)

Balanza granataria (Sartorius)

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH 7.2

HCl 1 N

NaOH 1 M

Agua destilada

Aceite de inmersión

Congelador (Revco)

Mechero y/o plastilina

Dipropionato de Imidocarb (Imizol)

Perlas de vidrio

Tubos de centrifuga 50ml

Placas 24 pozos (Nunc)

Botellas de cultivo 75cm²

Mezcla de gas (CO₂ 5%, O₂ 5%, N₂ 90%)

Incubadora (Narco)

Contenedor de N₂ líquido (MVE)

MATERIAL BIOLÓGICO

Bovino donador de eritrocitos sanos

Eritrocitos

Suero bovino

Estabilizado de eritrocitos infectados

46 bovinos experimentales

Suero bovino patrón anti-*Babesia* (FAO)

Suero bovino negativo a *Babesia* (FAO)

RESULTADOS

EXPERIMENTO I FASE DE VACUNACIÓN

Temperatura rectal: Aquí se observó que todos los grupos de animales vacunados sufrieron un incremento en el promedio de la temperatura rectal a diferencia del grupo control el cual no fue vacunado. El grupo vacunado que presentó un mayor incremento en su promedio de temperatura fue el grupo con dosis de 10^9 , el cual presentó un marcado incremento al día 5 pos-vacunación, promediando 41°C , bajando su promedio los siguientes días pos-vacunación para alcanzar la normalidad el día 15 pos-vacunación. Los demás grupos vacunados sufrieron incremento en su promedio al día 8 pos-vacunación, encontrándose éste en un rango de entre 40.3 y 40.6°C , pero al día 15 pos-vacunación se encontraron con promedio normal de temperatura rectal (ver FIG.3, GRAFICAS de la A a la F).

Hematocrito: El promedio de hematocrito de los animales vacunados sufrió un marcado descenso (% de caída) entre los días 8 y 27 pos-vacunación, observándose hasta un 41% de caída en el grupo vacunado con dosis de 10^9 al día 8 pos-vacunación; al día 15 pos-vacunación observamos que el promedio del hematocrito había caído hasta el 30% en todos los grupos vacunados, pero al día 23 pos-vacunación encontramos un menor porcentaje de caída en todos los grupos vacunados, estando éste entre el 18 y 22%. Al día 27 pos-vacunación

el promedio de porcentaje de caída de los grupos 10⁹ y 10⁸ volvió a caer hasta un 30% a diferencia de los grupos 10⁷, 10⁶ y 10⁵ en donde su promedio de % de caída se mantuvo por abajo del 22%. Al día 32 pos-vacunación todos los grupos se encontraron con un promedio de % de caída estable. (ver FIG. 3 GRAFS. A...F).

Parasitemia: La presencia del parásito se observó desde el día 5 pos-vacunación encontrándose en los grupos vacunados con dosis de 10⁹, 10⁸ y 10⁵ observándose ya formas clásicas de *B. bovis*, estas formas clásicas se dieron en solo 2 animales uno del grupo 10⁹ y otro del grupo 10⁵ el cual presentó un PEP de 0.115%. en el grupo 10⁸ solo se observaron formas sugerentes de *Babesia bovis* (que son trofozoítos dentro de los eritrocitos con cromatina muy condensada, de fases muy tempranas de infección por parte del parásito), el PEP < 0.01%. Al día 8 pos-vacunación encontramos formas clásicas solo en un animal del grupo 10⁹, mientras que la mayoría de los demás animales de los otros grupos solo presentaron formas sugerentes de *B. bovis*, PEP < 0.01%. Al día 15 pos-vacunación observamos formas clásicas en dos animales del grupo 10⁹ y en otro del grupo 10⁶ el cual fue el único que presentó parasitemia. En los grupos de animales vacunados con dosis de 10⁸ y 10⁷ observamos formas sugerentes de *B. bovis* en la mayoría de los animales, y en el grupo vacunado con dosis 10⁵ solo un animal presentó formas sugerentes de *B. bovis*. El día 23 pos-vacunación

observamos la presencia de formas sugerentes de *B. bovis* solo en un animal del grupo vacunado con dosis de 10^6 , mientras que los demás animales de los otros grupos fueron negativos a la presencia de *B. bovis*. Al día 35 pos-vacunación no se observó la presencia del parásito en ningún animal de los grupos vacunados(ver cuadro 1).

FIGURA No. 3 Gráficas A y B de los promedios de temperatura y porcentaje de caída del hematocrito del experimento I fase de vacunación. Grupos 10^6 y 10^5

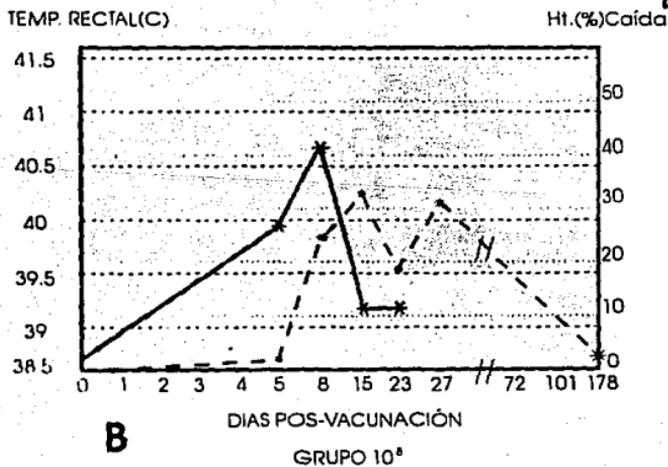
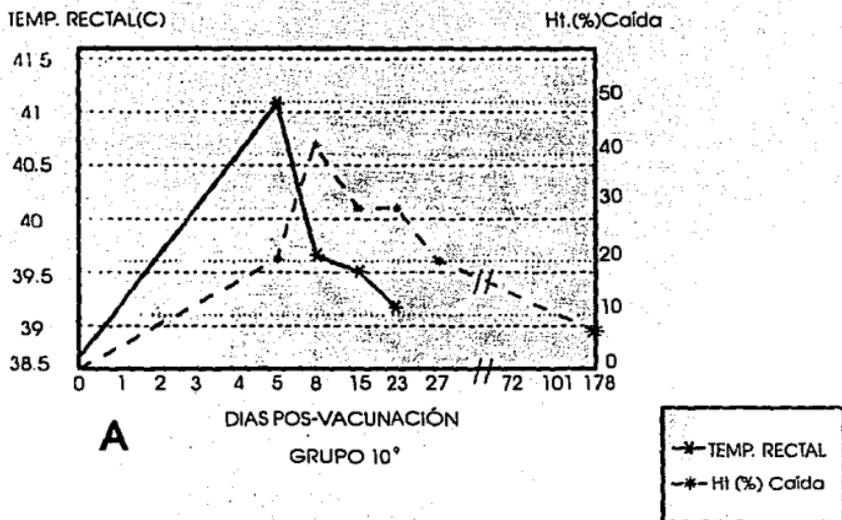


Figura No. 3: Gráficas C y D de los promedios de temperatura y porcentaje de caída del hematocrito del experimento I fase de vacunación, grupos 10^7 y 10^6

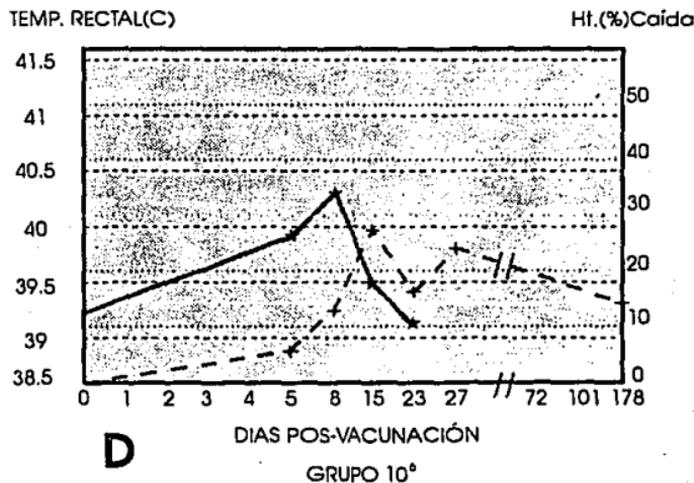
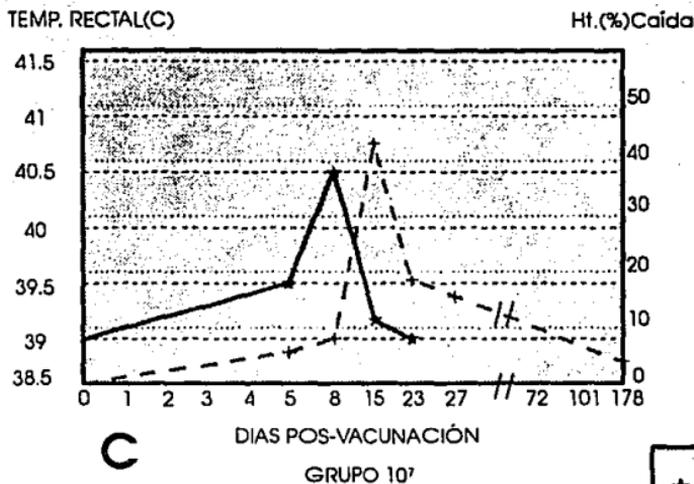
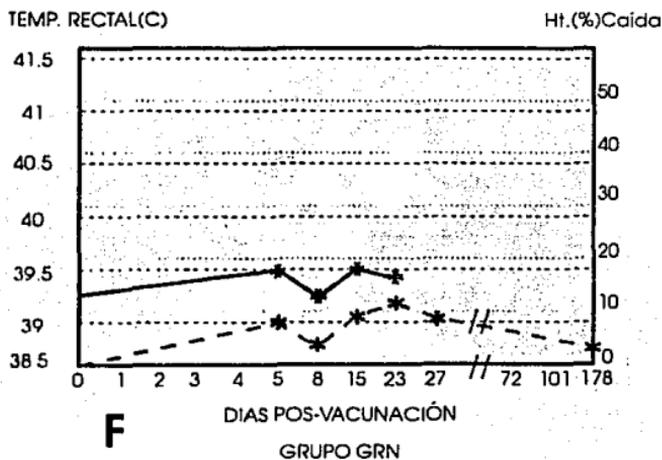
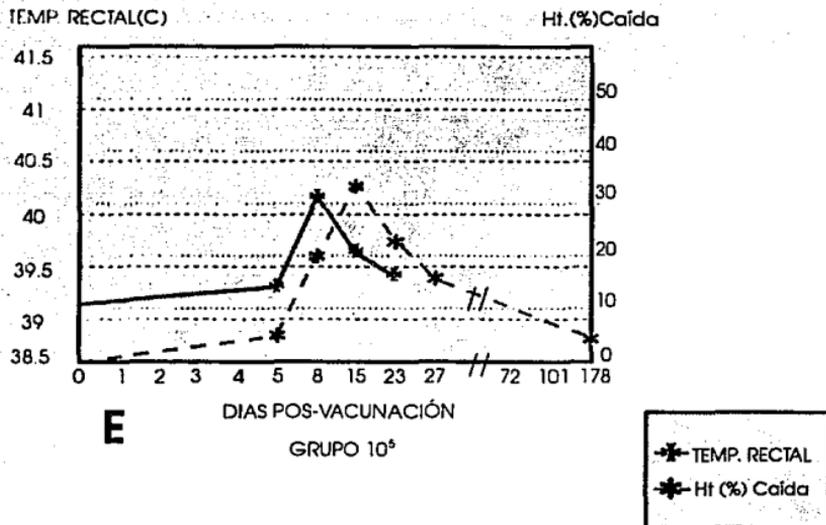


Figura No. 3 Gráficas E y F de los promedios de temperatura y porcentaje de caída del hematocrito del experimento I fase de vacunación, grupos 10^5 y GRN



CUADRO No.1 Porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) por Babesia bovis (parasitemia) en los animales los días siguientes de la vacunación.

Días pos-vacunación	12-3-93	15-3-93	24-3-93	30-3-93	12-5-93
	5	8	15	23	35
Grupos/ Animales/Identificación	PEP*				
10 ⁹ 0504	0.01	0.021	RIP	-	-
SN2	-	0.020	-	-	-
0476	0.033	0.022	-	-	-
0507	0.01	-	0.04	-	-
10 ⁸ 3325	-	0.01	0.068	-	-
3306	0.01	0.01	0.02	-	-
3369	0.019	0.01	0.01	-	-
3322	0.032	0.018	0.01	-	-
10 ⁷ 0490	-	0.014	0.01	-	-
3352	-	0.015	0.01	-	-
3341	0.016	0.032	0.01	-	-
3320	-	0.017	0.011	-	-
10 ⁶ 0491	-	0.01	0.023	-	-
0500	-	0.01	-	-	-
0503	-	0.01	0.01	-	-
3350	-	0.01	0.037	-	-
10 ⁵ ON1	-	0.01	0.029	0.022	-
0541	0.013	-	-	-	-
3323	-	0.01	-	-	-
3345	0.115	-	0.037	-	-

- No presencia de Babesia bovis
- * PEP-Porcentaje de eritrocitos parasitados

La muerte del animal 0504 del grupo vacunado con dosis de 10⁹ se dio el día 11 pos-vacunación por lo tanto sus datos posteriores ya no se pudieron tomar. No hubo necesidad de aplicar tratamiento, aunque el estado físico en general de los animales vacunados con dosis altas fue estable, poca pérdida de peso y de la condición en general, las cuales recuperaron con el tiempo.

Inmunofluorescencia indirecta: Todos los grupos evaluados con esta prueba serológica se encontraron negativos al día 8 pos-vacunación, pero al día 15 pos-vacunación ya se encontraban positivos (seroconvirtieron) a esta prueba todos los grupos vacunados. A los sueros del día 23 pos-vacunación que seroconvirtieron se les tituló; al titularse encontramos que los niveles de anticuerpos en promedio de todos los grupos vacunados se habían elevado, alcanzando el grupo vacunado con dosis de 10^9 el mayor nivel con un título promedio de 1:6000, el grupo que presentó el menor nivel en promedio de anticuerpos titulados fue el grupo vacunado con dosis de 10^5 con un promedio de 1:850. Al día 50 pos-vacunación encontramos que todos los grupos se mantuvieron positivos y es aquí en donde encontramos los mayores promedios en el nivel de anticuerpos titulados, en donde el grupo vacunado con dosis de 10^9 presentó un promedio de titulación de 1:10240 y el grupo vacunado con dosis de 10^8 presentó un promedio de 1:7680 y en donde el grupo vacunado con dosis de 10^6 repuntó un poco en su promedio para llegar a 1:2560. El grupo vacunado con dosis de 10^7 presentó un promedio bajo en comparación con la fecha anterior en donde fue de 1:3840 y en esta fecha presentó un promedio de 1:1440; el promedio en el nivel de titulación más bajo fue para el grupo de 10^5 que presentó un promedio de 1:480. En fechas subsiguientes de evaluación todos los grupos permanecían serológicamente positivos, pero ya no se

encontraron promedios altos en el nivel de titulación, a excepción del grupo vacunado con dosis de 10^7 el cual presentó un nivel un poco más elevado en su promedio al día 71 pos-vacunación siendo éste de 1:900, los demás grupos se encontraron en promedio por abajo del 1:600 para este día pos-vacunación; en las demás fechas pos-vacunación se encontraron con un promedio por abajo del 1:100 en el nivel de anticuerpos titulados (ver gráfica 1).

EXPERIMENTO II

FASE DE DESAFÍO ANIMALES VACUNADOS

Temperatura rectal: Al día 0 pos desafío encontramos que la temperatura se encontró alrededor de los 39 a 40°C debido a que se tomó alrededor del mediodía, estando los animales expuestos al sol por alrededor de 2 horas. En el día 5 pos-desafío observamos que los grupos vacunados con dosis de 10^9 y 10^7 y el grupo control se encontraron cerca de los 40°C en promedio, no así los tres grupos restantes los cuales se encontraron cerca de los 39°C en promedio; los días 6 y 7 pos-desafío observamos que el grupo control presentaba su promedio de temperatura por arriba de los 40°C, en cambio los demás grupos bajaron su promedio de temperatura rectal alrededor de los 39°C; el día 8 pos-desafío el grupo control presentó su promedio de temperatura rectal cerca de los 41°C, para llegar a ellos el día 9 pos-desafío en el cual se les aplicó tratamiento a los animales y es por eso que al día 10 pos-desafío el promedio de temperatura rectal de este grupo descendió por abajo de los 40°C, los demás grupos desafiados se mantuvieron dentro del promedio normal de temperatura rectal en estos días pos-desafío (ver FIG. 4 GRAFS. A...F).

Hematocrito: Aquí observamos que el promedio de porcentaje de caída del Ht no sufrió una variación muy significativa antes del día 9 pos-desafío, ya que

en este día el grupo control empezó a tener un mayor porcentaje de caída, pero al día 10 pos-desafío encontramos que este grupo desafiado sufrió una caída de 27% la cual de acuerdo con los parámetros establecidos supero el grado permitido de caída del hematocrito (ver FIG. 4, GRAFICAS de la A a la F).

Parasitemia: La parasitemia en los grupos de animales vacunados si se observó, pero de una forma muy tenue en la cual solo observamos un PEP de 0.01 por *B. bovis*, mientras que en los animales del grupo control se observaron parasitemias más altas, siendo la mayor la presentada por el animal 0557 de 0.491% de *B. bovis*, esto se dió en todos los días pos-desafío en este grupo. El grupo vacunado con dosis de 10^8 presentó una parasitemia mayor a la de los demás grupos vacunados en donde los días 6 y 7 pos-desafío se encontraron parasitemias mayores de 0.01 de *B. bovis* (ver cuadro 2).

Figura No. 4 Gráficas A y B de los promedios de temperatura y porcentaje de caída del hematocrito del experimento II fase de desafío, grupos 10^9 y 10^8

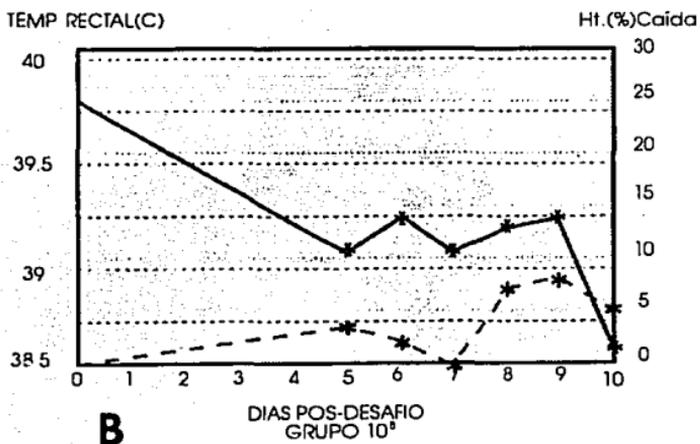
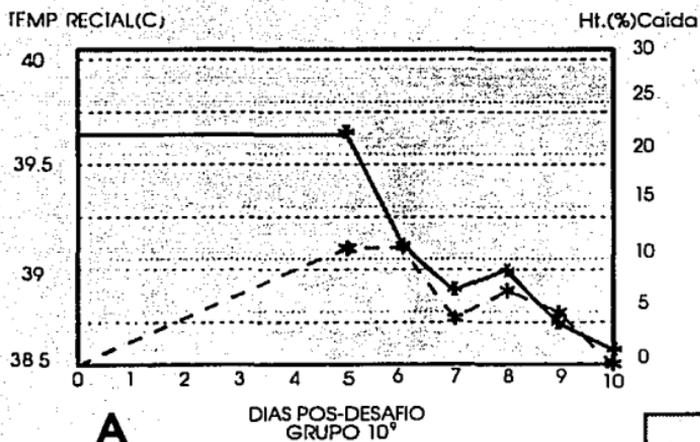


Figura No. 4: Gráficas C y D de los promedios de temperatura y porcentaje de caída del hematocrito del experimento II fase de desafío, grupos 10⁷ y 10⁸

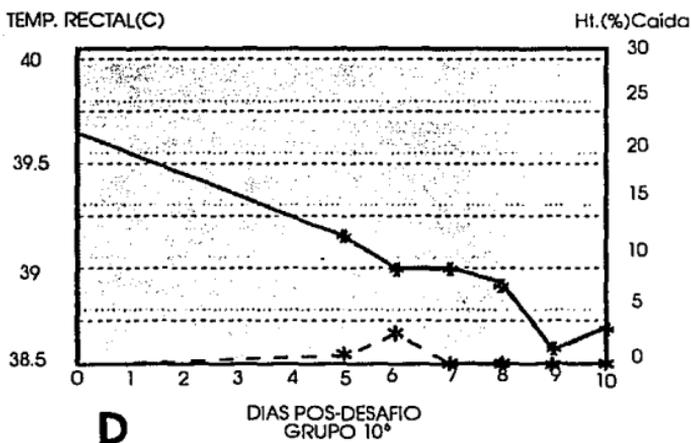
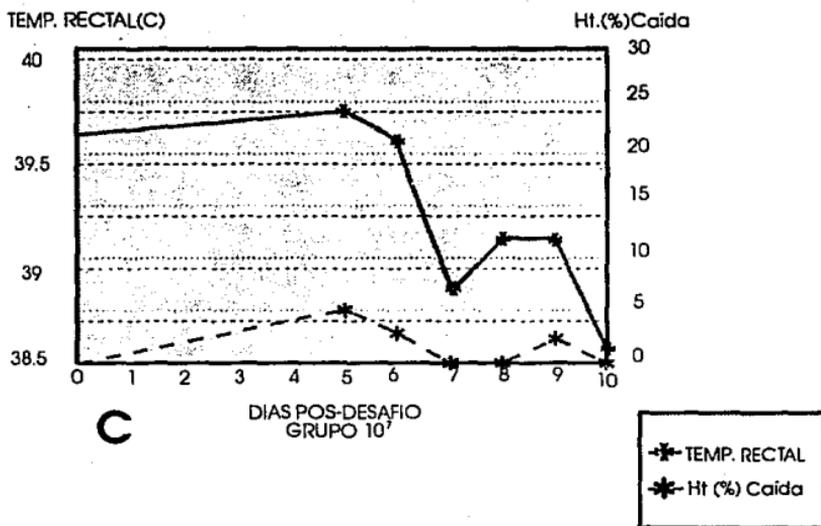
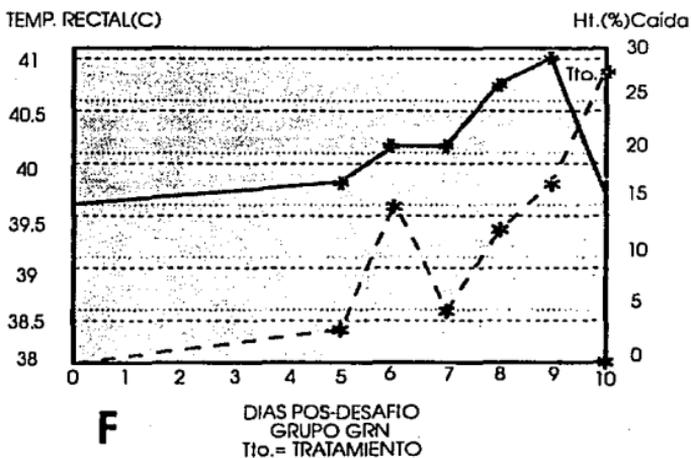
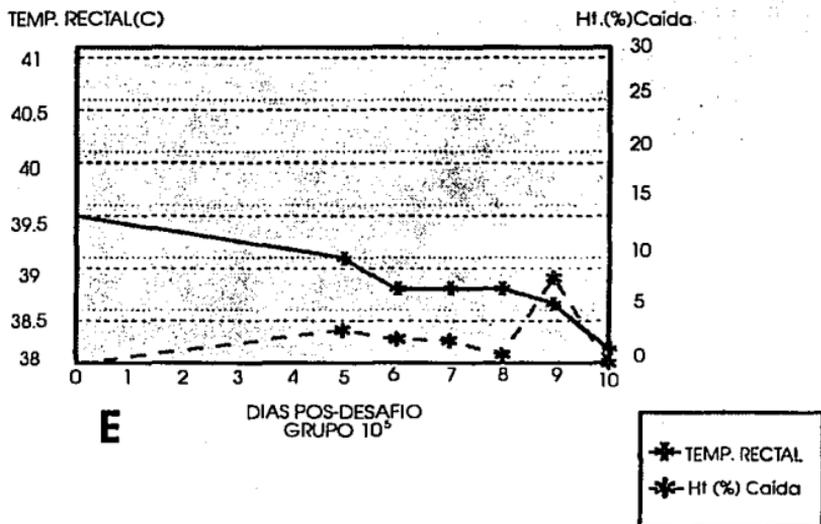


Figura No. 4: Gráficas E y F de los promedios de temperatura y porcentaje de caída del hematocrito del experimento II fase de desafío, grupos 10^5 y GRN



CUADRO No.2 Porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) por Babesia bovis (parasitemia) en los animales los días siguientes al desafío.

Días pos desafío	3-9-93	8-9-93	9-9-93	10-9-93	11-9-93	12-9-93
	0	5	6	7	8	9
Grupos/ Animales/Identificación	PEP					
10' SN2	-	-	-	-	-	-
0476	-	-	-	-	-	-
0507	-	-	-	-	-	-
10' 3325	-	-	-	-	-	-
3306	-	-	-	-	-	-
3369	-	0.082	0.059	0.0235	0.057	-
3322	-	-	-	0.063	0.125	-
10' 0490	-	-	-	-	-	-
3352	-	-	-	-	0.092	-
3341	-	-	-	-	-	-
3320	-	-	0.038	-	-	-
10' 0491	-	-	-	-	-	0.032
0500	-	-	-	-	-	-
0503	-	-	-	-	-	-
3350	-	-	-	-	-	-
10' ON1	-	-	-	-	-	-
0541	-	-	-	-	-	-
3323	-	-	-	-	0.035	-
3345	-	-	-	-	-	-
GRN 0506	-	-	-	0.018	0.240	0.020
				0.049	0.282	
0535	-	-	0.031	-	0.062	-
					0.013	
0557	-	0.023	-	0.060	0.065	0.401
3337	-	-	-	0.01	0.092	0.099
						0.228

- No presencia de Babesia bovis
- * PEP-porcentaje de eritrocitos parasitados.

Análisis estadístico:

Se utilizó la prueba de $\chi^2(70)$, para estimar que diferencia estadística hay entre los animales vacunados y los del grupo control tomando como variable la aplicación o no del tratamiento, tomando como referencia la presencia de los parámetros establecidos que justificaron el tratamiento específico.

	Con Tratamiento	Sin Tratamiento	
Animales con babesiosis	4	2	
Animales sanos	0	16	
Total	4	18	22

Resultados:

I	J	OBSERVADA	ESPERADA	CHI-CUA
1	1	4	1.090909	7.757576
1	2	2	4.909091	1.723906
2	1	0	2.909091	2.909091
2	2	16	13.09091	.6464647

Estadística chi-cuadrada para un grado de libertad: 13.03704

Chi cuadrada recalculada con corrección de Yates: 8.940682

Al comparar la χ^2 de tablas $\times 2$ (.01,1) = 6.635 con el resultado de la prueba podemos observar que la χ^2 calculada es mayor (13.03704 > 6.635) que la χ^2 de tablas. Por lo tanto estos resultados sugieren una relación significativa entre los animales tratados que sufrieron la babesiosis y los no tratados que no la sufrieron y los sanos.

Inmunofluorescencia indirecta: Aquí se observó que los promedios en el nivel de titulación de anticuerpos estuvieron por abajo de la dilución 1:1000 en la mayoría de los grupos vacunados, dando el mayor promedio en el nivel de titulación el grupo vacunado con la dosis de 10^9 siendo su promedio de 1:1200 el día 8 pos-desafío. El grupo control presentó un marcado incremento en su promedio de nivel de titulación de anticuerpos solo hasta el día 10 pos-desafío, en el cual obtuvo un promedio de 1:6000 en su nivel de anticuerpos titulados (ver gráfica 1).

EXPERIMENTO PARA OBTENER LA DOSIS DE DESAFÍO ANTES DE DESAFIAR A LOS ANIMALES VACUNADOS

Temperatura rectal: Aquí se pudo observar que los grupos de animales inoculados con las dosis 10^4 y 10^5 de la cepa de campo de *B. bovis* no sufrieron aumento notable en su promedio de temperatura, los animales de los grupos 10^6 y 10^7 si sufrieron aumento notable en su promedio de temperatura, el cual estuvo por arriba de los 40°C desde el día 6 pos-inoculación hasta el día 9 pos-inoculación en el grupo inoculado con dosis de 10^7 en donde la mayoría de los animales de este grupo fueron tratados y de los cuales uno murió. El promedio del grupo inoculado con dosis de 10^6 llegó a ser de 40°C solo hasta el día 8 pos-inoculación y se elevó solo un poco el día 9 pos-inoculación, después de este día bajó y solo uno de los animales de este grupo recibió tratamiento. Mientras que en los animales del grupo inoculado con la dosis de 10^8 sufrieron un marcado incremento del promedio de temperatura rectal a partir del día 5 pos-inoculación hasta el día 9 en donde recibieron tratamiento y uno de ellos murió, el promedio de temperatura rectal se mantuvo por arriba de los 41°C todos estos días. (ver FIG. 5 GRAFS. 1..5)

Hematocrito: En la mayoría de los grupos de animales utilizados se encontró que el promedio en el porcentaje de caída no sufrió cambios severos en

todos los días pos inoculación, solo el grupo inoculado con la dosis de 10^8 sufrió una marcada caída en su porcentaje promedio y esto solo sucedió hasta el día 9 pos inoculación en el cual el promedio llegó a estar por arriba del 41% de caída, lo cual indicó el tratamiento de los animales ya que la temperatura también se encontraba elevada. (ver FIG.5 GRAFICAS de la 1 a la 5).

Parasitemia: Está solo se observó hasta el día 8 pos-inoculación en los grupos inoculados con dosis de 10^7 y 10^8 en donde en el primer grupo solo se observaron formas sugestivas de *Babesia bovis* y en el segundo grupo observamos formas sugestivas en algunos animales y formas clásicas en uno de ellos de *B. bovis*. Al día 9 pos-inoculación observamos formas clásicas de *B. bovis* también en el grupo inoculado con dosis de 10^6 , así como en los animales de los grupos siguientes, esto también indicó el tratamiento de los animales, dos animales del grupo inoculado con dosis de 10^6 , y todos los animales de los grupos inoculados con dosis de 10^7 y 10^8 (Ver Cuadro No. 3)

Cabe hacer notar que dos animales de los grupos inoculados con las dosis más altas (10^7 y 10^8) murieron y antes de que esto sucediese presentaron los signos clínicos de la enfermedad observándose también la marcada presencia de desordenes de tipo encefalítico, en donde se observó ataxia, apetito pervertido (tragaban tierra) ; etc. Esto y la presencia de los parámetros establecidos en todos los animales del grupo desafiado con dosis de 10^8 , (aumento en la

temperatura, baja en el hematocrito y la presencia de parásitos) nos dieron la pauta para tomar a está como dosis de desafío.

CUADRO No.3 Presencia de Babesia bovis (parasitemia) en los animales los días siguientes al desafío con la cepa de campo.

Días pos-desafío	12-8-93	17-8-93	18-8-93	19-8-93	20-8-93	21-8-93
	0	5	6	7	8	9
Grupos/ Animales						
10 ⁴	608	-	-	-	-	-
	3383	-	-	-	-	-
	601	-	-	-	-	-
	3390	-	-	-	-	-
10 ⁵	3590	-	-	-	-	-
	618	-	-	-	-	-
	607	-	-	-	-	-
	3363	-	-	-	-	-
10 ⁶	3372	-	-	-	-	++
	586	-	-	-	-	-
	3371	-	-	-	-	++
	609	-	-	-	-	+
10 ⁷	3385	-	-	-	-	-
	0617	-	-	+	+	+
	3389	-	-	-	-	++
	555	-	-	-	-	++
10 ⁸	622	-	-	-	+	++
	0610	-	-	-	++	++
	3370	-	-	-	+	++
	NA587	-	-	-	-	++

- No presencia de B. bovis
- + Presencia de formas sugerentes de B. bovis.
- ++ Presencia de formas clásicas y sugerentes de B. bovis.

Figura No 5 Graficas 1 y 2 de los promedios de temperatura y porcentaje de caída del hematócrito del experimento en donde se obtuvo la dosis de desafío, grupos 10^2 y 10^5

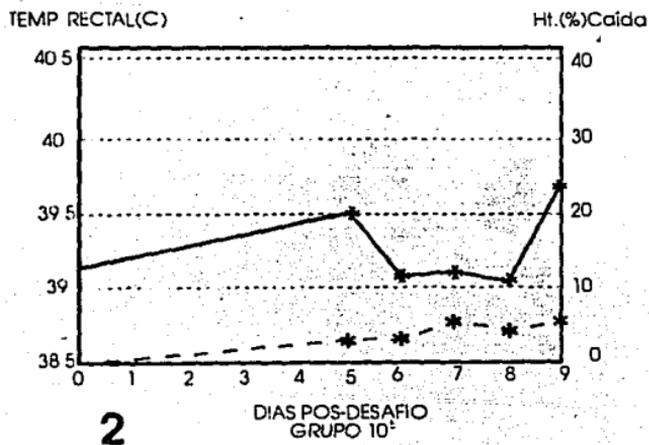
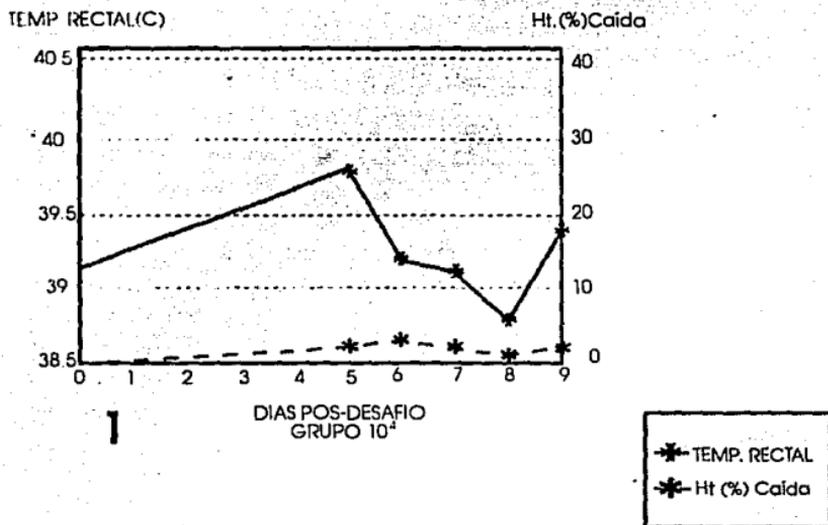


Figura No. 5 Graficas 3 y 4 de los promedios de temperatura y porcentaje de caída del hematocrito del experimento en donde se obtuvo la dosis de desafío, grupos 10^5 y 10^7

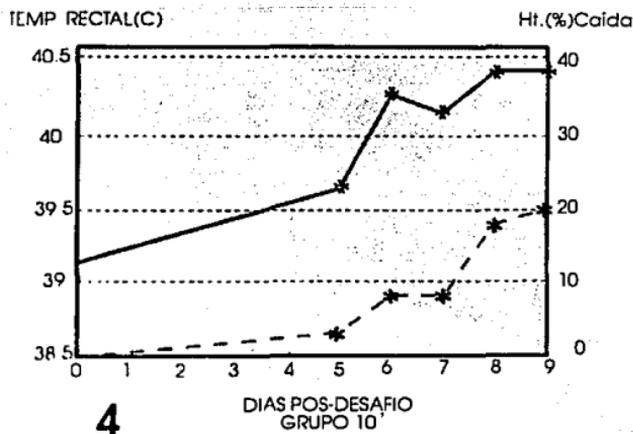
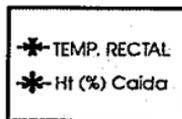
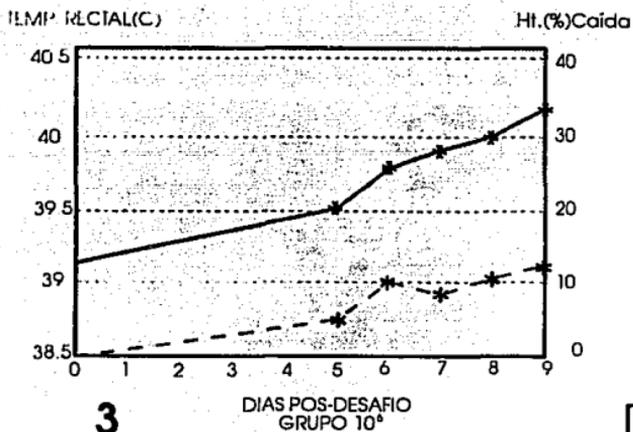
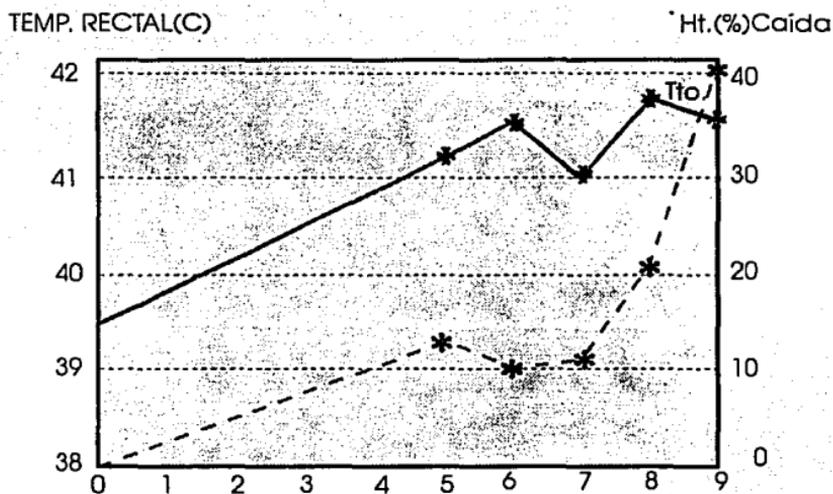
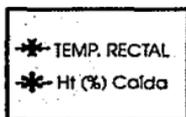


Figura No. 5: Gráfica .5 de los promedios de temperatura y porcentaje de caída del hematocrito del experimento en donde se obtuvo la dosis de desafío, grupo 10*



5

DIAS POS-DESAFIO
GRUPO 10^a
Tto.= TRATAMIENTO



DISCUSION

La viabilidad de la cepa irradiada utilizada como inmunógeno quedo demostrada en el presente trabajo; las manifestaciones clínicas observadas en los animales vacunados con la dosis de 10^9 , así como con la muerte de uno de los animales de este grupo, probablemente debido a la gran cantidad de parásitos inoculados y no a la patogenicidad de la cepa utilizada, ya que en los demás grupos vacunados la manifestación clínica de la enfermedad no fue significativa a la pos-vacunación. Al desafío la capacidad inmunoprotectora de la cepa irradiada se demostró, ya que la mayoría de los animales vacunados no sufrieron la enfermedad, siendo significativa la diferencia entre los animales vacunados y los del grupo control demostrandose esto en la prueba de "ji cuadrada", con la excepción de dos animales que presentaron ligeras manifestaciones clínicas en cuanto a temperatura y presencia del parásito en los frotis (un animal del grupo vacunado con dosis 10^6 y otro del grupo 10^7), esto se puede deber a otro tipo de circunstancias etiológicas como podría ser una inmunosupresión ocasionada por algún virus del Complejo Respiratorio Bovino o a la posible presencia de Tuberculosis como entidad patológica en estos animales así como una probable reacción al tipo de eritrocitos inoculados, ya que existen diferentes grupos

sanguíneos en los bovinos o a probables factores idiosincráticos.

Buening y *col.* en 1986 demostraron que al utilizar una cepa clonada de *Babesia bovis*, así como el cultivo original del cual fue obtenida la clona, utilizando una dosis vacunal de 10^9 observó que el porcentaje de caída del hematocrito fue del 50% en promedio, así como una respuesta febril marcada y parasitemia por alrededor de 3.8 días en promedio, también obtuvo títulos en IFI de 1:10,240 a los 77 días pos-inoculación. Al desafío los animales vacunados con estas clonas no presentaron alguna reacción clínica(9).

Yunker y *col.* en 1987 observaron en bovinos esplenectomizados inoculados con una cepa atenuada de *Babesia bovis* mediante cultivo *in vitro* que el porcentaje en promedio de caída del hematocrito fue del 49%, en la temperatura obtuvo un promedio de alrededor de 41°C , encontrando una parasitemia no $> 0.1\%$, quedando así demostrada la capacidad inmunoprotectora de la cepa utilizada (KBb) de la cual se derivó la clona irradiada utilizada en este trabajo(82).

Bock y *col.* observaron en 1991 que al utilizar una cepa irradiada de *Babesia bovis* el promedio en la caída del hematocrito fue alrededor de 43.2%, así mismo al desafío observaron una pobre protección inmunológica dada por esta cepa "L"(7).

De la misma forma, Hernández, al utilizar una clona de *Babesia bigemina* irradiada observó una reducción del hematocrito del 35%, mientras que al utilizar

una cepa de campo la reducción fue de un 66%(30). En 1974 Bishop y Adams al inocular *B. bigemina* irradiada en bovinos intactos obtuvieron una reducción del hematocrito del 26%, en comparación del 18% obtenido en bovinos inoculados con parásitos no irradiados(5).

Pérez en 1992 menciona que al inocular *B. bovis* irradiada a diferentes dosis se obtuvieron valores de disminución del hematocrito diferentes, por ejemplo en un grupo obtuvo una disminución del 14%, que fue el grupo vacunado con la dosis más baja (10^6) y en el grupo vacunado con dosis de 10^9 obtuvo un promedio de baja del hematocrito del 27%(55).

En este trabajo se obtuvieron diferentes promedios de reducción en el porcentaje de caída del hematocrito esto dependió de las diferentes dosis vacunales aplicadas, siendo el mayor encontrado al desafío, en los animales del grupo control en donde estuvo por alrededor del 27% de caída, y en donde la temperatura se mantuvo por arriba de los 40°C durante por lo menos 4 días posdesafío.

La importancia de la presencia de anticuerpos en los animales vacunados no es relevante, debido a que estos alcanzan su presencia mayor en cuanto a dilución por la prueba de IFI alrededor de los 30 días pos-vacunación y encontrándose bajos al momento de ser desafiados los animales. Meeusen y col, mencionan la teoría que señala que los niveles constantes o altos de anticuerpos quizá se deban al desarrollo de una respuesta humoral anamnésica mediada y

dependiente de la proliferación de células B de memoria(47).

James y col. en 1981 encontraron que los niveles de anticuerpos en el suero bovino, despues de haber vacunado dos veces con antígenos solubles de *B. bovis* ocasionan una respuesta anamnésica fuerte y una gran presencia de anticuerpos en las diluciones para la prueba de IFI sucediendo esto en los animales vacunados al desaffo, en contraste encontraron que los animales del grupo control presentaban niveles relativamente bajos en comparación con los animales vacunados en cuanto a la presencia de anticuerpos pero demostraron una rápida respuesta al desaffo.

Ellos encontraron que los niveles bajos de anticuerpos están presentes cuando se encuentran los niveles más altos en la parasitemia, mencionan también una variación constante en los niveles de anticuerpos quizá debida al estrés constante al que eran sometidos sus animales utilizados(32).

Figuroa y col. en 1992 encontraron en un grupo de animales que su nivel de anticuerpos para *B. bigemina* seguía igual si habfan sido desafiados con una cepa homóloga y de no ser así, al utilizar una cepa heteróloga el nivel de anticuerpos se incrementaba aún más que en el primer contacto(28).

En el presente trabajo podemos deducir que los animales una vez vacunados adquieren cierta inmunoprotección, ya sea esto con dosis altas o dosis bajas, y que al desaffo se comportan de forma buena con sus dos excepciones.

Ristic en 1984(60) hizo una tabla en la cual comparó los diferentes tipos de vacunas utilizadas contra el control de la babesiosis ubicando a las vacunas irradiadas con categoría de buenas y quedo de la siguiente forma(ver tabla de la pag. 68). El no encontró información en lo que respecta a una posibilidad de causar infección por parte de la vacuna de parásitos irradiados, en este trabajo observamos que al Inocular dosis vacunales muy altas se puede prevocar una infección, así como la muerte de los animales, pero tampoco encontramos información de que este tipo de vacunación pueda revertir a la virulencia. La producción de este tipo de vacunas es muy costosa y es por eso que su reproductibilidad es mala así como su posible comercialización es casi nula. En cuanto a la capacidad de dar un adecuada protección podríamos decir que es buena y que valdría la pena hacer más estudios para saber en un futuro que otras alternativas nos pudiera dar.

Métodos de vacunación contra la babesiosis bovina: ventajas y desventajas (60).

Tipo de vacuna	Reproduc-tibilidad	Potencial de comer-cialización	Potencial de causar infección	Posibilidad de revertir a la virulencia	Grados de inmuniza-ción	Eficacia de protección
1.- Viva						
a. Premunización	Mala	No	Si	Si	Bajos	Buena
b. Parásitos irradiados	Mala	No	Ni	Ni	Bajos	Buena
c. Atenuada por pasaje	Variable	No	Si	Si	Bajos	Buena
2.- Inactivada						
a. Corpuscular	Mala	No	Ninguno	Ninguno	Altos	Poca
b. Antígenos solubles	Mala	No	Ninguno	Ninguno	Altos	Poca
c. Antígenos solubles del plasma	Mala	No	Ninguno	Ninguno	Bajos	Poca
d. Exoantígenos derivados de cultivo celular	Buena	Si	Ninguno	Ninguno	Bajos	Moderada

Ni = No información

CONCLUSIONES Y/O RECOMENDACIONES

- Queda demostrada la capacidad inmunoprotectora de la clona irradiada 5b de *Babesia bovis*.
- La inmunoprotección otorgada por este tipo de vacuna es buena y puede ser una excelente alternativa para el control de la babesiosis en México.
- Podemos sugerir que la dosis adecuada para el uso como vacuna sea la de 10⁶ GR, ya que confiere protección, es fácil de producir, fácil de administrar y no provoca reacciones severas a la pos-vacunación, pero con su adecuado seguimiento en este período se puede garantizar su completo éxito, el único problema con el que nos enfrentaríamos sería el de su conservación a largo plazo.
- De la misma forma se sugieren mayores estudios en cuanto a la capacidad de la vacuna en un desafío en el campo, ya que es ahí donde realmente se evaluaría su capacidad inmunoprotectora y si es o no viable como inmunógeno, para que pueda ser producido a grandes escalas.
- Así mismo se sugiere que se sigan los estudios en cuanto a la importancia de la babesiosis, para poder seguir desarrollando más tecnología y vacunas que puedan ser más viables en cuanto a su utilización, su conservación y su producción.

-Mientras tanto no se llegue a tener un adecuado medio de prevención de la babesiosis esta seguirá teniendo una gran relevancia dentro de la ganadería mexicana y de todo el mundo, así como un gran peso dentro de la economía de todas las naciones que la padezcan.

APENDICE No. 1

PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA EL DIAGNOSTICO DE *Babesia spp.*

Desarrollo de la prueba.

1.- Las laminillas o frotis de antígeno se desecan introduciendolas en un matraz que contenga Cloruro de Calcio, conectado a una bomba de vacío durante 1 hora.

2.- Se fija el antígeno en acetona durante 30 min. y se dejan secar al aire inmediatamente.

3.- Con lápiz graso se marcan círculos y se colocan los sueros diluidos (1:80) en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2.

4.- Incubar en cámara húmeda a 37° C durante 30 min., posteriormente se efectuan dos lavados con PBS y una vez con agua destilada, se dejan secar las laminillas.

5.- El conjugado una anti-IgG bovina en conejo con Isotiocianato de fluoresceína (Cappel Lab.), diluida 1:40 con PBS, se aplica en cada uno de los círculos trazados, y se incuba a 37° C durante 30 min. en cámara húmeda. Enseguida se lavan las laminillas con PBS(2) y agua destilada(1), se dejan secar.

6.- Se agrega una gota de glicerina fosfatada en cada círculo y se observa al microscopio de luz ultravioleta.

7.- La interpretación se hace mediante la presencia de los cuerpos babesiales fluorescentes en el suero control positivo y su ausencia en el suero control negativo.

APENDICE No.2

TEMPERATURAS Y HEMATOCRITOS DE LOS ANIMALES DEL GRUPO 10⁹

DIA/ANIMAL	504	SN2	476	507
0	39/32	38.5/32	38.7/31	38.5/31
5	41/26	41/24	- / 26	41/23
8	40.5/21	40/16	38.9/21	40/16
15	RIP	39.5/20	39.6/27	39.5/20
23	"	39.3/24	39.2/28	39.2/23
27	"	/17	/27	/-
72	"	/27	/30	/32
101	"	/27	/35	/29
128	"	/28	/27	/29
157	"	/29	/31	/28
180	"	39.7/27	39.5/24	40/28
184	"	39.6/25	40.1/24	39.5/24
185	"	39.4/24	38.8/23	39.4/26
186	"	38.2/27	38.7/27	38.8/25
187	"	39.4/27	38.7/26	38.9/25
188	"	39.1/21	38.4/24	38.9/25
189	"	38.9/24	38.5/27	38.4/28

TEMPERATURAS Y HEMATOCRITOS DE LOS ANIMALES DEL GRUPO 10⁸

DIA/ANIMAL	3325	3306	3369	3322
0	38.6/32	38.2/28	39/29	39/32
5	38.7/30	- / 34	40/28	41/32
8	40.9/23	40.8/30	39.9/22	41/23
15	39.5/24	39/22	- / -	39/ -
23	39.1/27	39.1/23	39.4/ -	39.2/24
27	/28	/ -	/21	/ -
72	/31	/32	/29	/32
101	/35	/32	/27	/22
128	/32	/32	/28	/29
157	/28	/31	/26	/28
180	40/28	40.2/27	39.3/25	39.7/29
184	39/24	39.2/26	38.6/26	39.8/29
185	39.1/30	38.7/26	38.9/26	40.6/27
186	38.7/29	38.5/29	38.8/27	40.3/29
187	38.7/26	38.4/ -	39/29	40.7/25
188	39.6/26	38.8/29	38.8/25	40.5/22
189	38.5/29	38.7/29	39.7/29	38.8/23

TEMPERATURAS Y HEMATOCRITOS DE LOS ANIMALES DEL GRUPO 10⁷

DIA/ANIMAL	490	3352	3341	3320
0	39/32	39.1/35	39.2/33	39/27
5	39.4/31	39.8/32	39.5/29	39.2/29
8	40.7/28	41/30	39.8/32	40.4/26
15	39/28	39.5/25	39/28	38.8/14
23	39.2/25	39/30	38.8/26	39/23
27	/-	/-	/26	/25
72	/31	/32	/-	/30
101	/25	/33	/31	/23
128	/23	/29	/27	/29
157	/23	/31	/27	/28
180	RIP	38.9/27	40/27	40/25
184	"	39.3/25	39.1/26	41.1/24
185	"	39.4/25	38.7/27	40.8/34
186	"	39/28	38.7/28	38.8/28
187	"	41.2/27	38/30	38.6/25
188	"	40.6/27	38.5/27	38.7/23
189	"	38.6/27	38.8/29	38.4/28

TEMPERATURAS Y HEMATOCRITOS DE LOS ANIMALES DEL GRUPO 10⁶

DIA/ANIMAL	491	500	503	3350
0	- /35	39.5/31	39.3/39	39.2/30
5	39.1/32	39.5/30	- /34	40.7/30
8	40.7/27	39.2/32	40.2/31	41/27
15	38.8/22	38.9/28	39.9/26	39.8/22
23	39/25	39.4/28	39.3/30	39.3/29
27	/27	/-	/-	/-
72	/27	/28	/30	/29
101	/17	/26	/30	/20
128	/28	/-	/32	/29
157	/25	/35	/32	/29
180	39.6/23	39.5/29	39.9/30	39.9/25
184	39/26	39/32	39.4/29	39.3/26
185	38.7/27	39/25	39.5/32	39/26
186	38.2/27	39.3/24	39.1/29	38.7/26
187	38.7/26	38.9/33	39/30	39.2/30
188	38.3/29	38.8/33	38.3/30	39.2/25
189	39/34	38.4/33	38.4/35	39.4/30

TEMPERATURAS Y HEMATOCRITOS DE LOS ANIMALES DEL GRUPO 10'				
DIA/ANIMAL	ON1	541	3323	3350
0	39.1/32	39.5/31	39.2/34	39.2/32
5	39.4/28	38.9/30	39.4/32	39.5/36
8	40.7/20	40.0/26	39.7/31	40.3/27
15	38.9/24	39.6/27	39.7/27	40.2/21
23	39.2/21	39.5/23	39.2/28	39.9/28
27	/26	/-	/29	/28
72	/29	/29	/32	/-
101	/32	/24	/26	/29
128	/29	/27	/35	/30
157	/28	/27	/27	/27
180	38.9/25	39.5/27	39.4/27	40.1/26
184	38.8/25	39.1/24	39.3/26	39.2/25
185	38.5/27	38.6/24	39.2/29	39/26
186	38.2/27	39.3/24	39.1/29	38.7/26
187	38.2/26	38.7/26	39.1/27	39.2/-
188	38.6/25	38.3/22	38.7/25	39.2/22
189	38.4/27	38.4/27	38/27	38.6/27

TEMPERATURAS Y HEMATOCRITOS DE LOS ANIMALES DEL GRUPO GRN				
DIA/ANIMAL	506	3337	557	535
0	39.2/32	39.1/33	39.1/30	39/37
5	39.8/30	39/33	39.3/27	39.8/31
8	39/31	38.4/33	39.3/26	39.8/31
15	39.4/33	39.6/31	39.6/31	39.5/34
21	39.1/29	39/28	39.6/30	39.9/29
27	/-	/-	/31	/35
72	/31	/31	/-	/31
101	/25	/27	/27	/30
128	/28	/31	/30	/29
157	/26	/28	/30	/30
180	39.4/25	39.8/25	39.8/29	39.6/27
184	40/25	40/24	40.3/28	39.4/27
185	40.3/20	40.6/24	40.1/25	39.9/21
186	40.1/25	41.2/25	39.9/25	39.6/25
187	41.6/22	41.2/22	40.3/23	40.2/25
188	41.5/23	41.2/20	40.3/22	41/22
189	39.7/22	39.7/21	40.1/21	39.8/21

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alvarez J.A. y Cantó G.: Epidemiología de la Babesiosis. En: "**PARASITOLOGIA**" Vol. Conmemorativo. 25 Aniv. de la Soc. Mex. de Para. Vol. 1:54-72 (1985).
- 2.- Anon.: Studies on Cattle Tick, Tick Fever and Tick Control. Final Report of Project DAQ12 for Australian Meat Research Committee. Queensland Department of Primary Industries, Brisbane (1981). In: Callow, L.L. Protozoal and Rickettsial Diseases. In: Animal Health in Australia. Vol. 5: *Australian Government Publishing Service*. 123-160, 1984.
- 3.- Babes, V.: Sur l'hémoglobinurie bactérienne du boeuf. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Paris*. 107:692-694, (1888). Citado por: Kutler, K.L.: World-wide impact of babesiosis. In: Babesiosis of Domestic Animals and Man. *CRC Press, Boca Raton, Fl.*, 1-22, 1988.
- 4.- Barnett, S.F.: Economical aspects of protozoan tick-borne diseases of livestock in parts of the world other than Britain. *Bull. Off. Int. Epiz.* 84:183-196, (1974).
- 5.- Bishop, J.P. and Adams, L.G.: *Babesia bigemina*: Immune response of cattle inoculated with irradiated parasites. *Exp. Parasitol.*, 35: 35-43, (1974).
- 6.- Blood, D.C., Radostits, O.M., Arundel, J.H. y Gay, C.C.: Medicina Veterinaria. 7a Ed. en Español. Vol. II. Edit. *Interamericana-McGraw-Hill*, México, 1059-1067, 1992.
- 7.- Bock, R.E., de Vos, A.J., Kingston, T.G., Shields, I.A. and Dalgliesh, R.J.: Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. *Vet. Parasitol.* 43: 45-56, 1992.
- 8.- Brocklesby, D.W.: Recent observations on tick-borne protozoa. (1976). In: Tick-borne Diseases and Their Vectors. Edited by: Wilde, J.K.H.: *Centre for Tropical Veterinary Medicine*. University of Edinburgh, 263.
- 9.- Buening, G.M., Kutler, K.L. and Rodríguez, S.D. Evaluation of a cloned *Babesia bovis* organism as a live immunogen. *Vet. Parasitol.*, 22: 235-24, (1986).

- 10.- Callow, L.L. Tick-borne livestock diseases and their vectors, 3. Australian methods of vaccination against anaplasmosis and babesiosis. *Wild. Anim. Rev.*, 18: 9-15, (1976).
- 11.- Callow, L.L. Protozoal and Rickettsial Diseases. In: Animal Health in Australia. Vol. 5. Australian Government Publishing Service., 123-160, 1984.
- 12.- Callow, L.L. and Dalglish, R.J. 1980.: The development of effective, safe vaccination against babesiosis and anaplasmosis in Australia. In: Tick and Tick-borne Diseases. Edited by: Jhonston, L.A.I. and Cooper, M.G., 4-8. *Proc. 56th Ann. Conf. Aust. Vet. Assoc.* Townsville, Australia.
- 13.- Callow, L.L. and McGavin, M.D.: Cerebral babesiosis due to *Babesia argentina*. *Aust. Vet. J.*, 39: 15-21, (1963).
- 14.- Callow, L.L. and Mellors. L.T.: A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomized cattle. *Aust. Vet. J.*, 42:464-465, (1966).
- 15.- Callow, L.L. and Tammemagi, L.: Vaccination against bovine babesiosis. Infectivity and virulence of blood from animals either recovered from or reacting to *Babesia argentina*. *Aust. Vet. J.*, 43: 249-256, (1967).
- 16.- Castro, E.R. and Canabéz, F.: Propiedades biológicas y características de *Babesia bigemina*: Efectos de radiaciones iónicas sobre la infecciosidad de sangre total infectada. *Bol. Chileno. Parasitol.*, 23: 30-33, (1968). Citado por: Irvin, A.d., Brocklesby, D.W. and Purnell, R.E.: Radiation and isotopic techniques in the study and control of piroplasmosis of cattle: A review. *Vet. Parasitol.*, 5: 17-28, (1979).
- 17.- Curnow, J.A.: *In vitro* agglutination of bovine erythrocytes infected with *Babesia argentina*. *Nature.*, 217: 267-268, (1968). En: Morilla, A.G.: Inmunología de la babesiosis. *Ciencia Veterinaria. Mex.*, 3: 240-275, (1981).
- 18.- Dalglish, R.J.: Field observations on *Babesia argentina* Vaccination in Queensland. *Aust. Vet. J.*, 44: 103-104, (1968) Citado por: Callow, L.L.: Protozoal and Rickettsial Diseases. In: Animal Health in Australia. Vol. 5. Australian Government Publishing Service., 123-160, 1984.

- 19.- Dalglish, R.J., Dimmock, C.K., Hill, M.W.M. and Mellors, L.T.: *Babesia argentina*: Disseminated intravascular coagulation in acute infections in esplenectomized calves. *Exp. Parasitol.* 40: 124-131, (1976). Citados por: Callow, L.L.: Protozoal and Rickettsial Diseases. In: *Animal Health in Australia. Vol. 5. Australian Government Publishing Service.*, 123-160, 1984.
- 20.- Dalglish, R.J., Dimmock, C.K., Hill, M.W.M. and Mellors, L.T.: The protamine sulphate test as a screening test for intravascular coagulation in experimental *Babesia bovis* infections. *Res. Vet. Sci.* 23: 105-108, (1977). Citados por: Callow, L.L.: Protozoal and Rickettsial Diseases. En: *Animal Health in Australia. Vol. 5. Australian Government Publishing Service.*, 123-160, 1984.
- 21.- Dalglish, R.J., Callow, L.L., Mellors, L.T. and McGregor, W.: Development of a highly infective *Babesia bigemina* vaccine of reduced virulence. *Aust. Vet. J.*, 57: 8-11, (1981).
- 22.- Delegación Mexicana, FAO.: Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 93: 903-915, (1981).
- 23.- Dimmock, C.K.: Blood group antibody production in cattle by vaccine against *Babesia argentina*. *Res. Vet. Sc.*, 15: 305-309, (1973). Citado por: Callow, L.L.: Protozoal and Rickettsial Diseases. In: *Animal Health in Australia. Vol. 5: Australian Government Publishing Service.*, 123-160, 1984.
- 24.- Dimmock, C.K. and Bell, K.: Haemolytic disease of the new born calves. *Aust. Vet. J.* 46: 44-47 (1973). Citados por: Callow, L.L.: Protozoal and Rickettsial Diseases. In: *Animal Health in Australia. Vol. 5: Australian Government Publishing Service.* 123-160, 1984.
- 25.- Dowsett, K.F., Dimmock, C.K., and Hill, M.W.M.: Haemolytic disease in new born calves. *Aust. Vet. J.*, 54: 65-67, (1978). Citados por: Callow, L.L.: Protozoal and Rickettsial Diseases. En: *Animal Health in Australia. Vol. 5: Australian Government Publishing Service.*, 123-160, 1984.
- 26.- Figueroa, J.V.: "Studies on antigen identification and characterization of the protozoan parasite of cattle *Babesia bigemina*". Tesis de Doctorado (Ph. D.). *College of Veterinary Medicine, University of Missouri Columbia, Columbia, MO.*, 5-86., 1989.

- 27.- Figueroa, J.V., Chieves, L.P., Jhonson, G.S. and Buening, G.M.: Detaction of *Babesia bigemina*-Infected Carriers by Polymerase Chain Reaction Amplification. *J. Clin. Microbiol.*, 30(10): 2576-2582, (1992).
- 28.- Figueroa, J.V., Alvarez, J.A., Buening, G.M., Cantó, G.J., Hernández, R., Monroy, M., Ramos, J.A. y Vega, C.A.: Antibody Response to *Babesia bigemina* in calves measured by ELISA and Immunoblotting technique. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 34: 267-273, 1992.
- 29.- Harris, E.: Report of the N.Y. state catle commissioners, in connection with the special report of the Metropolitan Board of Health on the Texas Catle Disease. Transactions of the New York State Agricultural Society. Vol. XXVIII; Part II, (1867). Albany Benthuyesen and San's Steam Printing House, 1868., 985-1170. Citado por: Figueroa, J.V.: "Studies on antigen identification and characterization of the protozoan parasite of catle *Babesia bigemina*". Tesis de Doctorado (Ph. D.). *College of Veterinary Medicine*, University of Missouri Columbia, Columbia, MO., 5-86., 1989.
- 30.- Hernández, R.: Estudios sobre el Efecto de Cuatro Aislamientos de *Babesia bigemina*, en Bovinos y Garrapatas. Tesis de Maestría. *Facultad Ciencias Agropecuarias*, U.A.E.M., Cuernavaca, Mor. 1991.
- 31.- Hoyte, H.M.D.: The tick fever parasites of catle. *Proc. R. Soc. Queensl.* 87: v-xlii, (1976). Citado por: Figueroa, J.V.: "Studies on antigen identification and characterization of the protozoan parasite of catle *Babesia bigemina*". Tesis de Doctorado (Ph. D.). *College of Veterinary Medicine*, University of Missouri Columbia, Columbia, MO., 5-86., 1989.
- 32.- James, M.A., Kutler, K.L., Levy, M.G. and Ristic, M.: Antibody kinetics in response to vaccination against *Babesia bovis*. *Am. J. Vet. Res.*, 42, 1999., 1981. In: James, M.A.: Immunology of the babesiosis. In: Babesiosis of domestics animals and man. *CRC Press*, Boca Raton, FL., 119-130, 1988.
- 33.- James, M.A.: Inmmunology of the babesiosis. In: Babesiosis of domestics animals and man. *CRC Press*, Boca Raton, FL., 119-130, 1988.
- 34.- Jennings, F.W.: The anaemias of parasitic infections. In: Pathophysiology of Parasitic Infections. Edited by E.J.L. Soulsby, *Academic Press, Inc.*, Nueva York, Londres. 41-67, 1976.

- 35.- Kutler, K.L.: World-wide impact of babesiosis . In: Babesiosis of Domestic Animals and Man. *CRC Press*, Boca Raton, FL., 1-22, 1988.
- 36.- Langford, G., Knott, S.G., Dimmock, C.K. and Derrington, P.: Haemolytic disease of newborn calves in a dairy herd in Queensland. *Aust. Vet. J.* 47: 1-4, (1971). Citado por: Callow, L.L.: Protozoal and Rickettsial Diseases. In: Animal Health in Australia. Vol. 5: *Australian Government Publishing Service.*, 123-160, 1984.
- 37.- Levine, N.D.: Taxonomy of the piroplasmas. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 90(1): 2-33, (1971).
- 38.- Levine, N.D.: Apicomplexa. In: Synopsis and Classification of Living Organisms. *McGraw-Hill Book Co.*, 571-587, 1982.
- 39.- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich III, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vura, J. and Wallace, F.G.: A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27(1): 37-58, (1980)
- 40.- Lignieres, J.: La piroplasmose bovine. Nouvelles recherches et observations sur la multiplicite de parasites, leur evolution, la transmission de la maladie et vaccination. *Arch. Parasitol.* 7: 398,(1903). Citado por: Kutler, K.L.: World-wide impact of babesiosis . In: Babesiosis of Domestic Animals and Man. *CRC Press*, Boca Raton, FL., 1-22, 1988.
- 41.- Lignieres, J.: La prophylaxie et la pathologie des maladies protozoaires (piroplasmoses, trypanosomoses, etc.) avec demonstration des parasites specifiques et des animaux transmetteurs (tigues, moustiques, etc.), *Trans. 9th Int. Vet. Congr.* (The Hague, 1901) 1, (S.G. 7, 3), 1., (1910). Citado por: Kutler, K.L.: World-wide impact of babesiosis . In: Babesiosis of Domestic Animals and Man. *CRC Press*, Boca Raton, FL., 1-22, 1988.
- 42.- MacFadyean, J. and Stockman. S.: A new especies of piroplasm found in the blood of British cattle. *J. Com. Pathol.* 24: 340, (1911). Citado por: Figueroa, J.V.: "Studies on antigen identification and characterization of the protozoan parasite of cattle *Babesia bigemina*". Tesis de Doctorado (Ph. D.). *College of Veterinary Medicine*, University of Missouri Columbia, Columbia, MO., 5-86., 1989.

ESTA TESIS NO DEBE
79 SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 43.- Mackellar, W.M.: Cattle tick fever U.S. Department of Agriculture, Yearbook of Agriculture, Bureau of Animal Industry, Washington. *Government Printing Office.*, 572-587, (1942). Citado por: Figueroa, J.V.: "Studies on antigen identification and characterization of the protozoan parasite of cattle *Babesia bigemina*". Tesis de Doctorado (Ph. D.). *College of Veterinary Medicine*, University of Missouri Columbia, Columbia, MO., 5-86., 1989.
- 44.- Mahoney, D.F.: *Babesia* of Domestic Animals. In: Parasitic Protozoa. Edited by J.P. Kreier, *Academic Press*, New York, U.S.A. vol. IV: 1-52, 1977.
- 45.- Mahoney, D.F., Wright, I.G. and Ketterer, P.J: *Babesia argentina*: The infectivity and immunogenicity of irradiated blood parasites for esplenectomized calves. *Int. J. Parasitol.* 3: 209-217, (1973).
- 46.- McKosker, P.J.: The global importance of Babesiosis. In: "Babesiosis" . Edited by: M. Ristic & I. Kreier. *Academic Press*, New York, N.Y., 1:24-217, 1981.
- 47.- Meeusen, E., Lloyd, S., and Soulsby, E.J.L.: Antibody levels in adoptively immunized mice after infection with *Babesia microti* or injection with antigen fractions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 63, 261. 1985. In: James, M.A.: Immunology of the babesiosis. In: Babesiosis of domestics animals and man. *CRC Press*, Boca Raton, FL., 119-130, 1988.
- 48.- Minami, T. and Ishihara, T.: *Babesia ovata* sp. n. isolated from cattle in Japan. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 20: 101-113, (1980).
- 49.- Minami, T., Yanabe, K., Hayashi, S. and Ishihara, T.: 1979. Serological relationship of a Japanese *Babesia* species and *Babesia bigemina* by the complement fixation and capillary-tube agglutination tests. *Vet. Parasitol.* 5: 29-38, (1979).
- 50.- Morel, P.C.: Tick-borne Diseases of Livestock in Africa. En: Manual of Tropical Veterinary Parasitology. Edited by Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux y Technical Centre for Agricultural and Rural Co-operation. Published by: *CAB Internacional*. English edition. 353-390, 1989.
- 51.- Morilla, A.G.: Inmunología de la babesiosis bovina. En: Memorias del Curso de Actualización de las Enfermedades Pasitarias del Ganado Bovino. UNAM., 41-56, (1978).

- 52.- Morilla, A.G.: Inmunología de la babesiosis. *Ciencia Veterinaria. Mex.* 3: 240-275. (1981).
- 53.- Morilla, A.G.: Manual de Inmunología. 1era. Ed. Editorial Diana. 97-125, 1986.
- 54.- Nikolskii, S.N., Nikiforenko, V.I. and Posov, S.A.: Epidemiology of piroplasmosis in Siberia. *Veterinariya (Moscow)* 4: 71-75, (1977). Citado por: Purnell, R.E.: Babesiosis in various hosts. In: "Babesiosis". Edited by: Ristic, M. and Kreier, J.P.: *Academic Press*, New York., 25-63, 1981.
- 55.- Pérez Soria, M.M.E. 1992 Determinación de una dosis premunizante contra *Babesia bovis* en bovinos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro.
- 56.- Purnell, R.E.: Vaccines against piroplasms. In: Vaccines against parasites. Edited by: Taylor, A.E.R. and Moller, R., *Symp. Brit. Soc. Parasitol. Vol. 18, Blackwell Scientific Publications*, Oxford, U.K., 25-63, 1980.
- 57.- Purnell, R.E.: Babesiosis in various hosts. In: "Babesiosis". Edited by: Ristic, M. and Kreier, J.P., *Academic Press*, New York., 25-63, 1981.
- 58.- Rees, C.W.: Characteristics of the piroplasm *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* in the United States. *J. Agric. Res.* 48: 427, (1934). Citado por: Kutler, K.L.: World-wide impact of babesiosis. In: Babesiosis of Domestic Animals and Man. *CRC Press*, Boca Raton, FL., 1-22, 1988.
- 59.- Ristic, M.: Babesiosis. In: "Diseases of the Cattle in the Tropics". Edited by: Ristic, M. and I. McIntyre. *Martinus Nijhoff Publishers*, The Hage., 443-468, 1981.
- 60.- Ristic, M.: Research on babesiosis vaccines. In: "Malaria and Babesiosis". *Martinus Nijhoff Publishers*, Boston 1984.
- 61.- Rogers, R.J, Dimmock, C.K, de Vos, A.J. and Rodwell, B.J.: Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced *in vivo* against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust. Vet. J.* 65(9): 285-287, (1988).
- 62.- Rodríguez, S.D.: Inmunochemical characterization of *Babesia bovis* clones. Tesis de Doctorado, PhD Dissertation. *College of Veterinary Medicine*, University of Missouri Columbia, Columbia, MO. 1985.

- 63.- Rodríguez, S.D., G.M. Buening, T.J. Green and C.A. Carson. Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Inf. Immun.* 42:15-18, (1983).
- 64.- Rodríguez S.D., G.M. Buening, C.A. and C.A Carson: Caracterización bioquímica preliminar de clones de *Babesia bovis* irradiadas con Co⁶⁰. *Tec. Pecu. Mex.* 37(1):16-24, (1993).
- 65.- Salas, T.E., García, G.J., Ramos, A.J. Rodríguez, R. E., Aboytes, T.R., Buening, G.M. and Vega, C.A.: Patogenia de una clona irradiada de *Babesia bovis* obtenida de cultivo *in vitro*. *Tec. Pec. Méx.* 26:36-45, (1988).
- 66.- Sergent, E., Donatien, A., Parrot, L., Lestoquard, F. y Plantureux, E. Les piroplasmoses dues aux *Babesiella* etude d'ensemble avec description d'une espece nouvelle, *Babesia major*, originaire de France. *Arch. Inst. Pasteur Alger.* 4: 318, (1926). Citado por: Figueroa, J.V.: "Studies on antigen identification and characterization of the protozoan parasite of cattle *Babesia bigemina*". Tesis de Doctorado (Ph. D.). *College of Veterinary Medicine, University of Missouri Columbia, Columbia, MO., 5-86., 1989.*
- 67.- Smith, R.D. Epidemiology of Babesiosis. In: Malaria and Babesiosis, research findings and control measures. Edited by: Ristic, M., Ambrose-Thomas, P. and Kreier, J.P. *Martinus Nijhoff Publishers, Boston., 213-232, 1984.*
- 68.- Smith, T.: Preliminary observations on the microorganism of Texas fever. *Med. News Philadelphia.* 55, 689, (1889). Citado por: Kutler, K.L.: World-wide impact of babesiosis . In: Babesiosis of Domestic Animals and Man. *CRC Press, Boca Raton, FL., 1-22, 1988.*
- 69.- Smith, T. and F.L. Kilbourne.: Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. U.S. Department of Agriculture, *Bureau of Animal Ind. Bull. No. 1:1-301, (1893).* Citado por: Kutler, K.L.: World-wide impact of babesiosis . In: Babesiosis of Domestic Animals and Man. *CRC Press, Boca Raton, FL., 1-22, 1988.*
- 70 - Snedecor W. George y Cochran G. William.: "Statistical Methods". 7th. edition. *The Iowa State University Press. USA. 1980.*
- 71.- Soulsby, E.J.L.: Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos. 7a.Ed. *Editorial Interamericana. 718-741, 1987.*

- 72.- Starcovici, C.: Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgerufenen Krankheiten, die Seuchenhafte Hamoglobinurie des Rinder (Babes), das Texasfieber (Th. Smith) und der Corceag der Schafe (Babes). *Zentralbl. Bakt. Parasitkd.* 14. 1. (1893). Citado por: Figueroa, J.V.: "Studies on antigen identification and characterization of the protozoan parasite of cattle *Babesia bigemina*". Tesis de Doctorado (Ph. D.). *College of Veterinary Medicine, University of Missouri Columbia, Columbia, MO.*, 5-86., 1989.
- 73.- Tizard, I.: *Veterinary Immunology*. 3rd. Ed., *W.B. Saunders Company*. 233-247, 1987.
- 74.- Vega y Murguía, C.A.: *Babesia bigemina: In vitro* cultivation and characterization. Tesis de Doctorado (Ph. D.). *College of Veterinary Medicine, University of Missouri Columbia, Columbia, MO.*, 1985.
- 75.- Wright, I.G.: Studies on the pathogenesis of *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in splenectomized calves. *Z. Parasitenk.* 39: 85-102, (1972a).
- 76.- Wright, I.G.: An electron microscopic study of intravascular agglutination in the cerebral cortex due to *Babesia argentina* infection. *Int. J. Parasitol.* 2: 209-215, (1972b).
- 77.- Wright, I.G.: Osmotic fragility of erythrocytes in acute *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in splenectomized *Bos taurus* calves. *Res. Vet. Sci.* 15: 299-305, (1973).
- 78.- Wright, I.G.: Biochemical Characteristics of *Babesia*. In: "Babesiosis". Edited by: M. Ristic & I. Kreier. *Academic Press, New York, N.Y.*, 171-205, 1981.
- 79.- Wright, I.G.: Nuclear techniques in babesiosis and anaplasmosis. In *Nuclear techniques in tropical animal diseases and nutritional disorders. Internacional Energy Agency*. Vienna., 169-187, (1984).
- 80.- Wright, I.G. and Goodger, B.V.: Proteolytic enzyme activity in the intraerythrocytic parasites *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. *Z. Parasitenk.* 42: 213-220, (1973).

81. Wright, I.G., Goodger, B.V., McKenna, R.V. and Mahoney, D.F.: Virulent and avirulent strains of *Babesia bovis*: the relationship between parasite protease content and pathophysiological effect of the strain. *J. Protozool.* 28(1): 118-120, (1981).
82. Yunker, C.E., Kutler, K.L. and Johnston, L.W.: Attenuation of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Vet. Parasitol.* 24: 7-13, (1987).