

5
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE
Babesia bovis Y *Babesia bigemina* EN
CULTIVO CELULAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
YAZMIN ALCALA CANTO

ASESORES: MVZ Phd. LEOPOLDO HENRI PAASCH MARTINEZ
Phd. DVM GERALD GALE WAGNER



MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE *Babesia bovis* Y *Babesia bigemina* EN CULTIVO CELULAR

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

por

Yazmin Alcalá Canto

Asesores: MVZ PhD. Leopoldo Henri Paasch Martínez
PhD. DVM Gerald Gale Wagner

México, D.F.
1997

DEDICATORIA

Con respeto dedico el presente trabajo:

A mis padres: Alfonso Alcalá Ancona y Martha Georgina Canto de Alcalá por su amor, su dedicación, su apoyo moral en todos los aspectos de mi vida y por impulsar mis proyectos.

A mis hermanos y su familia: Itzhel, Wendy y Mario Alfonso por su apoyo incondicional y su gran cariño.

A Jorge Lechuga Alcalá: Por dar ilusión y alegría a la familia.

A Edgar y su familia: Lic. Jaime Sánchez, Profra. Martha Celada-Castillo, Lic. Martha Leticia Sánchez de Espinosa, Lic. Enrique Espinosa y a todos aquellos amigos que forman parte de esa gran familia por su nobleza, gratitud e incomparable lealtad.

A mi Universidad, maestros, compañeros y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Doy las gracias:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por todas las oportunidades y apoyo que me brindaron para mi formación profesional.

A la Fundación UNAM y a Texas A&M University por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a mis asesores los Doctores Leopoldo Henri Paasch Martínez y Gerald Gale Wagner por su valioso tiempo, confianza y apreciable sustento para la elaboración de esta tesis.

A los honorables miembros del Jurado por las valiosas aportaciones que le hicieron al presente trabajo.

A la Dra. Patricia J. Holman por su apoyo en la metodología de este estudio, además de su amistad y ayuda para la elaboración del mismo.

Al Dr. Arturo Alonso P., Dr. Francisco Trigo T., la Sra. Olga Sánchez, Dra. Rosa Ma. García Escamilla, Dr. Rodrigo Rosario y David Cruz por todos sus consejos, amistad y atenciones.

Al Lic. Ricardo Castro Jiménez, Dra. Ma. de Jesús Tron e I.Q. Susana Ramírez por la motivación, la sonrisa y la confianza que me brindaron para realizar este estudio.

Al MVZ Aldo Alberti Navarro por su apoyo incondicional, consejos, enseñanzas, tiempo y amistad.

Al MVZ Jaime A. Navarro por su ayuda en el análisis estadístico, amistad y valioso tiempo.

A la División de Estudios Profesionales por su apoyo. En especial a Rosy por su paciencia y su amistad y a la Dra. Graciela Tapia por su ayuda.

A la Oficina de Servicios Escolares por su ayuda, especialmente a la Sra. Rebeca López por su sonrisa y tiempo.

A mis amigos, profesores y compañeros por estar siempre a mi lado.

A ellos, los animales, por haberme mostrado la grandeza de la naturaleza y por motivarme para ser mejor estudiante y ser humano. Gracias por su vida.

Y como todo en mi vida **GRACIAS A DIOS.**

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
HIPOTESIS	29
OBJETIVOS	30
MATERIAL Y METODOS	31
RESULTADOS	45
DISCUSION	48
CONCLUSIONES	52
LITERATURA CITADA	53
CUADROS	62
FIGURAS	72

RESUMEN

ALCALÁ CANTO, YAZMÍN. Desarrollo y caracterización de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en Cultivo Celular (bajo la dirección de MVZ PhD. Leopoldo Henri Paasch Martínez y DVM PhD. Gerald Gale Wagner).

Babesia bovis y *Babesia bigemina* son los hemoprotozoarios causales de la babesiosis bovina. Esta es una enfermedad transmitida por garrapatas del género *Boophilus* spp y se presenta en aquellas áreas geográficas en las cuales el vector es capaz de sobrevivir. El cultivo *in vitro* es un medio importante para la obtención de clonas puras de estos parásitos, los cuales pueden ser utilizados en varios estudios. En este estudio, *Babesia bovis* y *B. bigemina* fueron cultivadas en eritrocitos de bovino y el medio estuvo constituido por 58% de M-199, 40% de suero de bovino adulto sano y 2 % de solución buffer TES. Se utilizaron dos tipos de sales balanceadas incluidas en el Medio 199. Los cultivos establecidos fueron alimentados, subcultivados y criopreservados utilizando polivinilpirrolidona como crioprotector. La viabilidad se evaluó por medio de frotis sanguíneos de gota delgada teñidos mediante la técnica de Giemsa y la antigenicidad se verificó a través de la prueba de inmunofluorescencia indirecta. El porcentaje de eritrocitos parasitados aumentó cuando se empleó la solución salina balanceada de Earle. El cultivo *in vitro* de estos parásitos puede ser aplicado para obtener poblaciones puras que podrán ser utilizadas para elaborar una vacuna. Además, esta técnica permite desarrollar y mejorar métodos diagnósticos sensibles y específicos.

INTRODUCCIÓN

La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México es uno de los principales promotores de las actividades agrícolas y participa activamente en el desarrollo de modelos eficientes de producción integral de los recursos agropecuarios. La FMVZ tiene la intención de concientizar a los productores mexicanos acerca de la necesidad de tener un papel dominante en investigación con el objeto de llevar a cabo programas de medicina preventiva y de mantener e incrementar las exportaciones de ganado; las cuales representan un ingreso anual de 450 millones de dólares (33). De esta manera, México puede ser altamente competitivo al participar en el Tratado de Libre Comercio (TLC).

Latinoamérica tiene el doble de ganado bovino que EE.UU., pero produce menos de la mitad de carne de res. Las garrapatas y las enfermedades transmitidas por éstas han sido incriminadas como uno de los principales obstáculos para una producción eficiente. Presionados por la necesidad de un mejoramiento económico, los países latinoamericanos han intentado incrementar la eficiencia de las operaciones comerciales de ganado mediante la importación de razas más productivas procedentes de países con climas templados. Sin embargo, los animales importados son altamente susceptibles a las enfermedades transmitidas por garrapatas y se desempeñan pobremente cuando son introducidos en áreas endémicas (63).

La babesiosis es una enfermedad de distribución cosmopolita causada por un protozoario del género *Babesia*. Los agentes infecciosos de este género parasitan a los bovinos, ovinos, equinos, caninos, porcinos, felinos, roedores y al hombre (61).

Ésta es una de las enfermedades con mayor importancia en las áreas tropicales, subtropicales y en algunas templadas, en donde 600 millones de cabezas se encuentran en riesgo (24, 94). La babesiosis es una enfermedad transmitida por garrapatas de la familia *Ixodidae* y clínicamente se manifiesta por la presencia de anemia, hemoglobinuria ocasional e ictericia (77). Las sinonimias de la babesiosis son: Fiebre de Texas, Fiebre de las Aguas Rojas (Redwater fever), Fiebre de la garrapata del ganado, Tristeza, Chorro de Madera, Hemoglobinuria del ganado, Ictericia Maligna, Fiebre Biliar, Ranilla o Piroplasmosis en México (61).

Epidemiológicamente, se reconocen dos condiciones de presentación de *Babesia*:

- a) Babesiosis: Corresponde al estado de enfermedad clínica y se presenta en poblaciones de bovinos susceptibles.
- b) Babesiasis: Se refiere a la enfermedad subclínica que se observa en animales que se han recuperado de la enfermedad o en animales jóvenes, inmunizados por medio de garrapatas infectadas o por transfusión de sangre infectada en zonas endémicas (88).

El género *Babesia* *Starcovici* es un miembro de la familia *Babesiidae* *Poche*, orden *Piroplasmorida* *Wenyon*, en el phylum *Apicomplexa*. Las características principales de *Babesia* spp incluyen

- a) Su transmisión transovárica en la garrapata (ocurre solamente en aquellas de un sólo hospedador)
- b) La transmisión entre los hospedadores vertebrados a través de los vectores
- c) La residencia en eritrocitos de estos últimos, en donde se divide sin formar pigmentos a partir de la hemoglobina de la célula del hospedador (4,15).

La babesiosis bovina es causada por las siguientes especies:

Babesia bigemina (Smith y Kilborne, 1893)

Babesia bovis (Babes, 1888; Starcovici, 1893)

Babesia divergens (McFadyean y Stockman, 1911)

Babesia major (Sergent, Donatien, Parrot, Lestoquard y Plantureaux, 1926) (77)

En América son importantes dos especies que afectan al ganado bovino, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. La distribución de esta enfermedad hemotrópica en ecosistemas tropicales, templados y subtropicales está íntimamente relacionada con aquella del (los) vector (es) del agente infeccioso. Las garrapatas del género *Boophilus* son los únicos vectores de la babesiosis en este hemisferio (14). Los vectores de *B. bigemina* son principalmente *Boophilus decoloratus*, *B. microplus* y *B. annulatus*. Las áreas en donde se encuentra esta garrapata son Centro y Sudamérica, África, India, Sudeste de Asia y Australia. De las 250 millones de cabezas de ganado bovino estimadas en Centro y Sudamérica, aproximadamente 175 millones (70%) se encuentran en regiones infestadas por garrapatas entre las latitudes 33° Norte y 35° Sur del ecuador (1, 63). (Cuadro 1)

B. bigemina parece ser la más prevalente de las especies de *Babesia*, sin embargo, *B. bovis* es la más patógena (67). El ciclo de vida y la transmisión de *Babesia* en las garrapatas han sido estudiados ampliamente. Cada especie del hemoparásito es relativamente específico para su vector. Los cambios del desarrollo y la multiplicación ocurren en las garrapatas plétoras, en los huevos y en la progenie resultante. Los esporozoitos son liberados en la saliva de los vectores que se alimentan del vertebrado. La temperatura ambiental afecta el desarrollo y la supervivencia de los esporozoitos en las garrapatas infectadas (15).

Al alimentarse de sangre, el vector ingiere los eritrocitos parasitados. Los trofozoitos de *Babesia* se liberan del glóbulo rojo mediante una digestión.

Los que sobreviven se dividen y forman vermiculos, los cuales al romperse la célula pasan a la hemolinfa de la garrapata. Llegan a las células de los túbulos de Malpighi y se dividen de nuevo dando lugar a vermiculos hijos que pasan a los ovarios e invaden los huevos. Al desarrollarse la larva, pasan a las células del epitelio intestinal en donde se repite el proceso de fisión múltiple y se producen más vermiculos o merozoitos. Las células epiteliales se rompen y éstos pasan a las glándulas salivales hasta la fase de ninfa, en la cual crecen, se redondean y se produce otra división binaria múltiple, lo cual da lugar a una gran cantidad de elementos piriformes que penetran al hospedador vertebrado junto con la saliva cuando la garrapata se alimenta de él. Los hemoparásitos aparecen en los eritrocitos entre los 8 y 12 días (77).

Babesia se parece a *Plasmodium* en el sentido de que ingresa al eritrocito sin lisar la membrana celular. La penetración es un proceso activo con cinco fases iniciales (89):

1. Contacto entre el merozoito y el eritrocito
2. Orientación del polo apical del parásito hacia el eritrocito
3. "Fusión" de membranas entre el merozoito y el eritrocito
4. Liberación del contenido de los rhoptries
5. Cambios en la membrana del eritrocito en el sitio de unión, lo cual resulta en su invaginación y en la entrada del merozoito.

La membrana invaginada se fusiona después en sus límites externos para formar una vacuola parasitófora. La membrana celular del hospedador que se encuentra dentro de la vacuola se desintegra, lo cual pone en contacto directo al parásito con el citoplasma. La morfología y características de comportamiento de los eritrocitos se ven alterados.

Vistas microscópicamente, las células infectadas pueden diferir de las no infectadas en tamaño, forma y características de tinción (15).

Los signos clínicos varían en intensidad dependiendo de la virulencia de la cepa, el volumen del inóculo, edad del animal, estrés y en los animales jóvenes de zonas endémicas del grado de inmunidad conferido por el calostro. En la patogenia de la babesiosis existen dos eventos importantes:

① Liberación de sustancias farmacológicamente activas que provocan un estado de choque en el animal: El parásito activa el sistema del Complemento, de las cininas, de la coagulación y de la fibrinólisis provocando un síndrome semejante al de la coagulación intravascular diseminada. Esto se complica por la presencia de complejos antígeno-anticuerpo que se depositan en el riñón, lo cual llega a provocar glomerulonefritis y la consiguiente retención de sustancias tóxicas en la sangre. Los animales enfermos presentan hipocomplementemia. El Complemento (vía clásica) podría activarse a través de sustancias liberadas por el parásito o por las anafilotoxinas (C_{3b} , C_{5b}), las cuales producirían la liberación de sustancias vasoactivas. Por otra parte, en los bovinos hay disminución marcada de los niveles de cininas circulantes durante la presentación de los signos clínicos. Las cininas provocan entre otros efectos una fuerte vasodilatación e incrementan la permeabilidad de los vasos sanguíneos, llegando a presentarse éstasis circulatorio y una obstrucción de la circulación local.

② Anemia: Se produce independientemente del grado de parasitemia, ya que se ha observado que ocurre con la misma intensidad en animales con 10% de los eritrocitos parasitados o con menos del 0.01%.

Por lo tanto, la anemia no se debe a la acción física de la entrada y salida de los eritrocitos, sino que probablemente tenga una base inmunológica. Hay varias hipótesis:

1. El antígeno de la *Babesia* se adhiere a la superficie de los eritrocitos, lo cual provoca que éstos sean reconocidos como extraños.
2. El antígeno activa el sistema properdina permitiendo la fijación del complemento hasta C_{3b} y C_{5b} , que estimularían la fagocitosis al adherirse al eritrocito.
3. Los anticuerpos contra el antígeno actúan como opsoninas sobre los eritrocitos.
4. Los anticuerpos fijan el complemento hasta C_9 , provocando eritrolisis. (66)

Los signos principales se manifiestan después de un periodo de incubación de 8 a 10 días, aunque puede ser más largo y son: fiebre (41° a 42°C en el adulto), depresión, anorexia, atonía ruminal, constipación, aumento del pulso y respiración, disminución rápida de la producción en vacas lecheras, aborto, hemoglobinuria, anemia e ictericia. En casos severos el ganado se postra después de tres o cuatro días y a la semana siguiente del ataque hay quejidos y dolor, temblor muscular, lagrimeo y salivación con rápida caída de la temperatura abajo del nivel normal (77).

Los animales infestados con los hemoparásitos *B. bovis* y *B. bigemina* representan un impacto negativo en las actividades económicas del sector agropecuario. El mayor impacto económico de la enfermedad se concentra en áreas en donde es mantenido el ganado *Bos taurus* altamente susceptible.

Las pérdidas ocurren generalmente cuando la estabilidad endémica de la enfermedad se ve alterada, ya sea por la introducción de ganado nuevo dentro de áreas endémicas o por el control no confiable y esporádico de las garrapatas (67).

El movimiento de ganado susceptible de áreas libres de los vectores hacia estas regiones resulta desastroso. Desde que la enfermedad se erradicó de Norteamérica, la importación de ganado de EE.UU. y Canadá a estas regiones es igualmente riesgoso (1, 82).

México ha llevado a cabo una campaña para erradicar a *Boophilus microplus* y a *B. annulatus* desde 1976. La mayoría de los esfuerzos se han concentrado en la región Noreste del país, en donde existe un cinturón de cuarentena entre la frontera de México y Texas (EE.UU.). Los estudios seroepidemiológicos en los estados de Nuevo León, Tamaulipas y Coahuila demostraron unas tasas de prevalencia en hato de 50% y 56% para *B. bovis* y *B. bigemina* respectivamente; mientras que en Veracruz se demostró una prevalencia más baja, la cual fue de 24.5% (63). De esa manera, todos los factores ecológicos favorecen la interacción del vector biológico, los hospedadores y el parásito.

Es importante conducir diversas investigaciones epidemiológicas y diagnósticas de una naturaleza sensible y específica para poder crear sistemas preventivos derivados de estudios biotecnológicos y microbiológicos.

Epidemiología: La gran complejidad de la relación *Babesia*-Garrapata-Bovino ha dirigido los esfuerzos hacia la obtención de mejores métodos de diagnóstico para prevenir la enfermedad clínica y para determinar el papel del animal portador en la epidemiología de la enfermedad así como la infectividad de los vectores con el objeto de producir una vacuna segura y duradera contra la babesiosis (82).

Las especies del género *Babesia* le permiten a las poblaciones de organismos el alcanzar un equilibrio llamado "Estabilidad Endémica" sin causar signos clínicos a su hospedador (16).

Los animales que se recuperan de la infección natural quedan protegidos contra un desafío. Permanecen como portadores del parásito a niveles muy bajos y desarrollan una fuerte inmunidad en contra de futuras infecciones (15, 82, 89).

La resistencia natural de algunos bovinos a la babesiosis existe y está dada por varios factores. Con respecto a la raza, parece ser que el *Bos indicus* tiene mayor resistencia que *Bos taurus*. En cuanto a la edad, en áreas endémicas los becerros de menos de un año de edad rara vez muestran signos de la enfermedad; sin embargo, en estudios de laboratorio es posible infectar a becerros desde los pocos días de edad, lo que indica que quizá la edad no sea importante, sino que probablemente exista una inmunidad de hato que es transmitida de la madre al producto (66). La hemoparasitosis es más común en los animales jóvenes (mayores de un año de edad) que en los adultos. Esto se debe entre otros factores a que los animales adultos han tenido un período mayor de exposición a la enfermedad, por lo cual han desarrollado un mayor grado de inmunidad (32). Dentro de la resistencia natural, el grado de actividad del sistema retículo endotelial y fundamentalmente del bazo juegan un papel muy importante. Cuando se elimina el bazo a los bovinos, hay un incremento considerable en la susceptibilidad a *Babesia* spp. En cuanto a la inmunidad específica, cuando un animal sufre una infección y luego se recupera, éste queda inmune por un período variable. Sin embargo, durante ese período es posible aislar al parásito de la sangre, lo cual indica que éste debe estar presente para que haya inmunidad.

Por otra parte, en ocasiones se ha logrado demostrar que es posible que hay inmunidad sin

que esté presente la *Babesia*, y esto puede durar hasta cuatro años cuando se desafía con la misma cepa (66).

En la mayoría de los países, el control de la babesiosis ha consistido en el uso de fármacos quimioprolácticos y quimioterapéuticos. En muchas ocasiones, estas medidas de control han resultado ser caras, difíciles y poco prácticas, ya que elevan los costos de producción (63).

Quimioterapia: Se utilizan frecuentemente los derivados de la diamidina (Berenil®, Ganaseg®, Pirobenz®). El dipropionato de imidocarb (Imizol®) puede prevenir la enfermedad clínica hasta por 30 días. Sin embargo, este fármaco es caro y nefrotóxico (36). El tratamiento ideal podría actuar específicamente sobre los eritrocitos infectados sin afectar los no infectados, lo cual reduciría los efectos colaterales (51). Otros fármacos que se han utilizado son el Piritrexim y el Trimetrexate, antifolatos cuya toxicidad detiene la acción de la dihidrofolato reductasa (71). El tratamiento con estos medicamentos antes o después del uso de vacunas premunizantes es común para evitar la severa respuesta a la vacunación que se presenta ocasionalmente (25, 36, 64, 83).

Control de Garrapatas: En el año de 1880, en Australia, se presentó una enfermedad nueva para los productores de ganado bovino, a la cual llamaron "Redwater" o "Aguas Rojas". La etiología era completamente desconocida y para el año de 1887 dicha patología se había dispersado del Norte del país hacia el Golfo. Esto estimuló la investigación científica, la cual comenzó con C.J. Pound (Director del Stock Institute) y J.S. Hunt (Cirujano del Gobierno). Pound fue el primero en describir a los organismos en la sangre de los animales infectados.

pero fue Hunt, en 1895, quien estableció la naturaleza de la enfermedad al demostrar que podía ser transmitida de un animal infectado a otro no infectado por medio de la inoculación de sangre, lo cual era provocado por las garrapatas. Hunt visitó los EE.UU. en 1896 para investigar la "Tick Fever" ("Fiebre de las Garrapatas") y junto con una Comisión se estableció que el organismo australiano era idéntico a aquél descrito por Smith y Kilborne como el agente causal de la "Fiebre de Texas" en 1893 (54). Esta enfermedad fue endémica en el sur del paralelo 35 en los EE.UU., pero en 1906 se llevó a cabo una campaña en la cual bañaban al ganado con productos acaricidas para erradicar a *Boophilus annulatus* y esto eliminó la enfermedad en 1940. Este esfuerzo fue exitoso debido al alto grado de especificidad que tiene ese artrópodo por el hospedador bovino, ya que difiere de *B. microplus* en que esta última especie infesta a un amplio rango de hospedadores (28). La problemática generada por las garrapatas, demanda, para ser comprendida y así formular programas adecuados de erradicación o control, un enfoque ecológico-epidemiológico a través del cual sea posible observar y analizar simultáneamente los mecanismos de la infestación; de la transmisión de las enfermedades y las consecuencias de éstas; lo relacionado con su control y la interacción que existe con los hospedadores, otras especies de garrapatas y la vegetación (88). Guglielmono *et al*, en 1990 demostraron que las hembras de *B. microplus* alcanzan su pico de abundancia cuando el ganado se encuentra en pastos nativos dentro de áreas deforestadas, y dicho pico se presentó a fines del mes de marzo cuando se realizó ese estudio (56).

Hablar de garrapatas en México nos obliga a priorizar dentro de un inventario de 77 especies

identificadas, a las 3 de mayor importancia para el ganado bovino: *Boophilus microplus*, *Boophilus annulatus* y *Amblyomma cajennense*. La primera presenta en el país una amplia área de distribución que abarca zonas tropicales, templadas y áridas. En conjunto, se considera que cubre el 53% del territorio nacional teniendo como límite o frontera marginal, parte del norte árido del país (estados de Chihuahua, Coahuila y Nuevo León). El esquema de distribución de *Boophilus annulatus* es muy diferente, presentándose una mayor afinidad por zonas áridas y templadas y abarca una superficie que corresponde al 27% del territorio nacional. Estos datos consideran el estado que se presentaba en 1983, cuando se había logrado avanzar en la erradicación de *Boophilus* spp en un número significativo. Actualmente existe la reinfestación de algunos de estos municipios. En cuanto a *Amblyomma* spp, se considera que es el género más abundante, pues cubre una superficie que corresponde al 31% del territorio nacional. Sin embargo, no es transmisora de la babesiosis. En México, además del ganado bovino, *Boophilus* parasita a otros mamíferos, destacando por su importancia los caprinos, equinos, porcinos, perros, rumiantes silvestres y en menor grado el humano (88). El control de vectores consiste principalmente en el uso de piretroides, formamidine, organofosforados, flumetrina (a través de aplicadores duncan), uso de pastos anuales (inicialmente libres de larvas) (56), rotación de praderas combinada con acaricidas, modificación del hábitat (quema de los pastos, cambio de variedad de pasto, irrigación y frecuencia, corte manual de pasto, uso de pastos con propiedades físicas como gomas o muscilagos que hagan que las larvas queden aprisionadas en ellos), uso de ganado genéticamente resistente, como el *Bos indicus*, y también se han elaborado vacunas a partir de antígenos de garrapatas (5, 12, 35, 72, 90). En un principio, los esfuerzos dirigidos hacia

la erradicación de los vectores de esta enfermedad, indujeron a México a comprometerse con campañas caras y no exitosas para el control de garrapatas. Este depende ampliamente del uso de productos químicos, con los consecuentes problemas de resistencia a acaricidas y la posible presencia de residuos químicos (100). Las zonas libres ocupan una superficie de 94.4 millones de hectáreas, lo que corresponde al 47.9% del territorio nacional, las áreas de erradicación cuentan con 1.1 millones de Has (0.5%) y las áreas en fase de control ocupan 101.6 millones de Has (51.5%). Las estrategias actuales han intentado erradicar a estos artrópodos en áreas submarginales y controlar al vector en áreas endémicas. Este último objetivo depende de la decisión que tome el dueño de los animales para la reducción de las poblaciones de garrapatas (63). Debido al estado de estabilidad endémica que se establece en zonas densamente pobladas por lo vectores de la babesiosis, las medidas preventivas para abatir la prevalencia deben estar basadas en el suficiente conocimiento acerca del estatus inmune del hato y de la dinámica de la transmisión de estos microorganismos, pues al abatir la población de vectores en forma drástica y artificial puede llevar a la aparición de brotes (22).

Se ha demostrado que la vacunación del ganado con un extracto crudo de los órganos internos de garrapatas semiplétoras puede producir una inmunidad efectiva. Esta inmunidad actúa mediante la destrucción del intestino de la garrapata a medida que ésta crece. La primera dificultad que se presentó al desarrollar una vacuna comercialmente útil a partir de dichas observaciones fue la necesidad de identificar el antígeno o antígenos efectivos. Un antígeno protector ha sido aislado de la garrapata, caracterizado y producido como una proteína recombinante efectiva.

Una vacuna que incorpora este antígeno está siendo sometida actualmente a pruebas de campo (100). La exclusión de venados mediante el uso de cercos es un componente efectivo en el manejo de poblaciones de garrapatas (91). El baño convencional es inadecuado debido al alto nivel persistente de la infestación de vectores durante los meses de primavera y verano (20). Las elevaciones en la temperatura ambiental entre 20° y 28°C provocan un aumento en las infestaciones (14). Por esta razón el ganado susceptible no es llevado a áreas tropicales en México. La introducción de razas europeas a regiones tropicales y subtropicales de México fracasa debido a las altas pérdidas causadas por las garrapatas y la babesiosis (1, 73).

Inmunización: Durante la fase aguda de la babesiosis se han encontrado 3 antígenos: el primero corresponde a complejos poliméricos de haptoglobina modificada del hospedador, el segundo corresponde a grupos sanguíneos del vertebrado y el tercero es el antígeno específico del protozoario. En la respuesta inmune humoral el bazo juega un papel muy importante, ya que es el órgano encargado de producir anticuerpos en forma inmediata contra el parásito y de esa manera controla la cepa original para evitar que ocurran variantes antigénicas de *Babesia* y la consiguiente recaída del animal. Además de la presencia de anticuerpos se ha sugerido que exista un mediador capaz de lesionar al protozoario dentro del eritrocito y sería producido por los linfocitos T (9, 66). El parásito es capaz de evadir el sistema inmune del hospedador a través de mecanismos como su variación antigénica, liberación de antígenos solubles que forman complejos inmunes produciendo bloqueo de células K así como saturación del sistema reticuloendotelial, y localización intracelular (66).

La preinoculación o inmunidad infecciosa es una infección inducida (2) que consiste en la transferencia de sangre de un bovino recuperado o portador a bovinos susceptibles. El uso de éstos se basa en el conocimiento empírico de que la sangre de estos animales induce reacciones menos severas en los receptores que la de animales con la enfermedad clínica. La preinoculación en regiones tropicales con ganado nativo como donador conlleva pérdidas considerables en ganado procedente de zonas libres. Este procedimiento fue primero empleado en Australia. Originalmente se obtenía sangre de bovinos portadores y de esta manera pudieron controlar una epidemia en 1897. Este método de control se empleó hasta 1964, cuando Callow y Mellors (1966) estandarizaron el número de parásitos en cada dosis y utilizaron beceros esplenectomizados en vez de simples portadores. Este proceso redujo la fluctuación en el número de parásitos (3).

En el presente, solamente se cuenta con vacunas vivas que se encuentran disponibles en un limitado número de países. Su uso ha sido precluido en la mayoría de los países latinoamericanos debido a que ofrecen serias desventajas tales como una vida de almacén corta (una semana), dependencia estricta en una cadena fría (4°C), infectividad y morbilidad variable y el riesgo de estar contaminadas con otros patógenos (11, 37, 63). Con respecto a *B. bovis*, se ha estado utilizando una vacuna viva atenuada en Australia durante algunos años, pero esto tiene importantes desventajas. Aproximadamente 5% de los animales reaccionan severamente a la vacunación y requieren de tratamientos con fármacos para sobrevivir. Estas reacciones severas pueden ser reducidas mediante la administración

profiláctica de tetraciclinas de larga acción, pero ello eleva notablemente los costos de producción (47). Debido a que la vacuna atenuada se produce en becerros esplenectomizados, existe la posibilidad de que se presente contaminación con otros patógenos. Finalmente, puede llegar a ocurrir la reversión de la virulencia y la transmisión por medio del vector (100). Las cepas vacunales vivas de *Babesia bovis* que no son transmitidas por las garrapatas son más seguras que aquéllas transmitidas por las mismas debido a que los organismos se mantienen solamente en el ganado vacunado (55). Las vacunas vivas son generalmente atenuadas por medio de pasajes sanguíneos e irradiación (92). Las técnicas nucleares también se han utilizado para atenuar a los parásitos vivos (101) resultando en una protección variable con la desventaja de que la mejor protección es con cepas homólogas, ya que ésta es escasa o nula con cepas heterólogas (66). La falta de una vacuna enteramente satisfactoria contra la babesiosis ha creado la imperiosa necesidad de producir vacunas seguras y efectivas. Por consiguiente, el desarrollo de un control inmunológico efectivo de *B. bovis* y *B. bigemina* con vacunas muertas tiene una gran importancia económica (8, 9, 53,98). Para lograr este objetivo se están realizando estudios acerca del desarrollo de vacunas mejoradas, convencionales e inactivadas a partir de exoantígenos derivados de cultivos *in vitro* y libres de organismos (11, 64), así como del uso de tecnología de DNA recombinante para la expresión de antígenos seleccionados (44, 86, 101). Se han preservado en congelación vacunas vivas experimentales que contienen *B. bovis* y *B. bigemina* multiplicadas *in vitro* mediante el uso de nitrógeno líquido después de una criopreservación simultánea utilizando glicerol como un crioprotector. Los organismos

vacunales derivados de sistemas de cultivo *in vitro* podrían reemplazar a los antígenos obtenidos *in vivo* para producir una vacuna contra la babesiosis bovina (57).

Estas cepas congeladas utilizadas para la producción de vacunas han sido exitosamente aceptadas en Australia (52). La vacunación del ganado con diferentes cepas de *B. bovis* derivadas del cultivo *in vitro* ha dado como resultado una inmunidad protectora en contra del desafío (9). El estudio y uso de clonas definidas por antígenos de superficie del merozoito pueden contribuir a la inmunidad (85).

En conclusión, las medidas aceptables de control de las enfermedades transmitidas por garrapatas en México deben estar basadas en la integración de actividades dirigidas al vector, al parásito y/o al hospedador. Esto ha obligado a identificar una serie de métodos y estrategias generales, los cuales son aplicables a la babesiosis bovina. Dentro de éstos se incluyen:

1. Control del vector
2. Control de la movilización de ganado
3. Quimioterapia y quimioprofilaxis
4. Uso de ganado resistente
5. Inmunización (3)

Diagnóstico : Para llevar a cabo estudios epidemiológicos es deseable el poder detectar las especies específicas en los animales portadores.

Ambrosio & DeWall en 1990 revisaron los avances recientes en el diagnóstico de enfermedades parasitarias. Ellos enfatizaron la importancia de poder contar con pruebas altamente sensibles y específicas (10). El diagnóstico de las infecciones causadas por *Babesia* en los bovinos depende de la observación microscópica del parásito en frotis sanguíneos teñidos. La detección del hemoparásito no es común durante las etapas tempranas de la infección o después de que se ha establecido el estado de portador. Esto es debido a los bajos números o a la ausencia de parásitos circulantes. Existen cuatro diferentes fases durante la infección por *B. bigemina*. Cada una debe ser considerada con el fin de llegar a un diagnóstico exacto. La primera es la fase parasitémica baja durante la incubación de la enfermedad, en la cual menos de un eritrocito de cada mil está infectado. Con este nivel de parasitemia, la infección es indetectable bajo condiciones de campo. Si se emite un diagnóstico temprano, el tratamiento puede ser exitoso. La segunda fase corresponde a la infección aguda, en la cual los parásitos son fácilmente detectables en frotis sanguíneos teñidos y observados en el microscopio óptico. El diagnóstico exacto es importante para seleccionar la quimioterapia apropiada. La tercera fase se presenta durante la recuperación del animal. El hecho de que la parasitemia vaya descendiendo facilita la capacidad de juzgar la efectividad de la quimioterapia. La cuarta fase es un periodo variable de varios meses después de la recuperación; cuando el animal se vuelve un "portador" y desarrolla anticuerpos contra *B. bigemina*. Durante esta fase la parasitemia es extremadamente baja y por consiguiente es difícil detectar la infección. Es importante reconocer la fase de portador y el poderla diferenciar de la infección temprana.

Es en la cuarta fase cuando los anticuerpos específicos proveen una información importante para estudios epidemiológicos. Las cuatro fases descritas anteriormente pueden ser identificadas mediante una o varias pruebas (67).

Los métodos directos de diagnóstico incluyen la microscopía óptica, en la cual los parásitos intraeritrocíticos que miden de 2.5 a 3.5 μm son observados en frotis sanguíneos teñidos con el colorante de Giemsa. Los trofozoitos (estadios vacuolados redondos sencillos) o los merozoitos (estadios piriformes) pueden ser observados. La desventaja de los frotis de gota delgada consiste en que únicamente un pequeño volumen de sangre puede ser examinado, lo cual dificulta la detección de parasitemias bajas en animales portadores (10). La aplicación de microscopía óptica también se ha utilizado para registrar la longitud, ancho y posición de los cinetos del núcleo de *B. bovis* y *B. bigemina* en la hemolinfa de garrapatas hembras plétoras *Boophilus microplus* artificialmente infectadas. La forma de los cinetos de *B. bovis* fueron registrados como curvos, semicurvos o enderezados (31). La Microscopía de Fluorescencia consiste en la examinación de frotis sanguíneos teñidos con naranja de acridina en el microscopio de luz ultravioleta. Esto aumenta la sensibilidad de la detección de *B. bigemina* en comparación con los frotis teñidos con Giemsa. El método de Capa Flogística Cuantitativa (QBC) es una técnica nueva en la cual se tiñe y se concentra la sangre infectada. Este método permite obtener un diagnóstico más rápido que con los frotis teñidos con Giemsa cuando se trata de infecciones tempranas (10). Con esta prueba se pueden monitorear muestras negativas rápidamente y no se encuentran falsos positivos, ya que es muy sensible.

Además, utiliza un adaptador (UV ParaLens de Becton Dickinson) que elimina la necesidad de contar con un microscopio de fluorescencia (58).

La era de la biotecnología ha expandido la investigación de las enfermedades parasitarias, y la mayoría de las contribuciones provienen del campo de ingeniería genética. El desarrollo y uso de secuencias específicas de DNA de parásitos puede eliminar mucha de la ambigüedad y subjetividad en la identificación de los mismos y puede permitir el desarrollo de tratamientos más eficientes (102).

Uno de los métodos más importantes en el área de biología molecular, y probablemente es aquél que va a revolucionar las pruebas diagnósticas que se conducirán en el futuro es la prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). Esta prueba amplifica pequeñas cantidades de DNA hasta que éstas sean detectables. La DNA polimerasa es la enzima que sintetiza nuevas cadenas de DNA. La prueba se lleva a cabo en 3 pasos que se repiten de 30 a 40 veces:

1. Desnaturalización de la enzima a 95°C
2. Hibridización del "primer" (pequeños pedazos de DNA) de 37° a 56°C
3. Polimerización a 72°C

De esta manera, el DNA es efectivamente amplificado. La PCR puede ser utilizada en pruebas diagnósticas para amplificar el ácido nucleico de *Babesia*. Otra prueba que ha sido desarrollada gracias a la biotecnología es la de Restricción del polimorfismo de la longitud de fragmentos (Restriction fragment length polymorphism), la cual utiliza enzimas de restricción que cortan el DNA en una secuencia específica conocida como sitio de reconocimiento para determinar si son similares dos pedazos del ácido nucleico (23, 102).

La prueba llamada "Secuenciación de Acido Nucleico", en la cual se determina el orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un gen (23, 45). La biotecnología aplicada a las pruebas diagnósticas ha sido utilizada en el caso de *Babesia*, y como ejemplo existe el desarrollo de sondas de DNA para la detección e identificación del hemoparásito (23, 50)

Las Pruebas de Diagnóstico Inmunológico incluyen:

- a) Fijación del Complemento (CF): Esta prueba ha sido utilizada por varios grupos de investigadores para detectar anticuerpos en contra de *Babesia* en diferentes especies. Es una de las pruebas oficiales para detectar a los animales positivos o negativos a esta enfermedad. Tiene ventajas como el bajo índice de reacciones de falsos positivos, pero requiere sangre con más del 60% de parasitemia (75). La prueba de Fijación del Complemento fue originalmente desarrollada utilizando antígenos crudos. Este procedimiento ha sido evaluado por muchos investigadores y se ha reportado que los animales infectados/portadores reaccionan positivamente de 7 a 12 meses. Algunos investigadores han reportado que al método le falta sensibilidad para detectar animales portadores de *B. bovis* y *B. bigemina* (10).
- b) Prueba Directa de Inmunofluorescencia: Consiste en obtener sangre de animales sospechosos y hacerlos reaccionar con un suero anti-*Babesia* fluorescente. No es muy usada porque la prueba de laminilla de gota gruesa o delgada teñida con Giemsa es más sensible.
- c) Prueba indirecta de Hemoaglutinación : El antígeno se produce a partir de sangre infectada (citratada) y lisada por medios físicos generalmente. El antígeno se purifica y el resultado depende de la preparación y manejo de los antígenos.

d) **Hemoaglutinación Pasiva:** Utiliza antígeno por desintegración sónica de eritrocitos parasitados, el cual se pasa a través de Sephadex G-200. Detecta más del 95% de animales infectados y anticuerpos en calostro. Pero es muy laboriosa debido a que se requiere sensibilizar eritrocitos y la vida del complejo antígeno-eritrocito es muy corta.

e) **Aglutinación en tubos y placa:** Los antígenos son los parásitos liberados de los eritrocitos infectados. En la de placa se agrega un colorante para hacer más visible la reacción. Necesitan un medio de temperatura controlado y sueros inactivados. Se presentan muchos falsos positivos y negativos (27, 75)

Además existen pruebas como aglutinación en látex y en eritrocitos parasitados, contraimmunoelectroforesis, Ensayo inmunológico ligado a enzimas (ELISA) y la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFA) entre otras. Esta última es la más ampliamente utilizada, y el antígeno en esta prueba puede derivarse de los merozoitos cultivados *in vitro* o puede obtenerse del animal infectado y también sirve para evaluar la premunición (17, 21, 30, 75). Esta prueba tiene una alta sensibilidad y especificidad en comparación con otras pruebas y es útil en situaciones experimentales cuando está involucrada la infección con *B. bigemina*. Se ha reportado que la prueba de IFA ha detectado actividad de anticuerpos contra *B. bigemina* por 10 días y hasta por 275-564 días (10). Sin embargo, tiene una limitante como herramienta epidemiológica debido a su reactividad cruzada de un solo sentido con sueros que contienen anticuerpos contra *B. bovis*. Esta limitante también se presenta con la prueba de ELISA debido al uso de antígenos crudos que muestran reacciones cruzadas con otros hemoparásitos (27, 67).

Se ha estudiado la causa del alto nivel de reacciones de fondo, las cuales disminuyen la aplicación de ELISA como una prueba diagnóstica de campo para el caso de *B. bigemina*. Se ha notado que el fibrinógeno contribuye a resultados positivos de ELISA más que la presencia del antígeno específico de *B. bigemina*. Con el fin de poder confiar en la aplicación de la prueba de ELISA para diagnosticar infecciones por *B. bigemina*, debe existir un antígeno purificado específico o anticuerpos específicos monoclonales (21, 53). Estos últimos han sido producidos a partir de ratones inmunizados con rhotrios aislados de algunas cepas, como la México (98). Los anticuerpos monoclonales han sido identificados y probados con las cepas México y Kenya (86). La prueba de ELISA tiene la ventaja de que puede ser automatizada para procesar un grand número de muestras (18). Los procedimientos convencionales usan extractos solubles de eritrocitos infectados derivados tanto de animales infectados como de cultivos *in vitro*. Algunos de los procedimientos que utilizan antígenos crudos son altamente sensibles, pero carecen de especificidad para distinguir entre anticuerpos contra *B. bovis* y *B. bigemina* (10).

La prevención de la babesiosis se ha visto obstaculizada por la ausencia de métodos para la producción de antígeno en cantidades elevadas, ya que hasta hace poco tiempo la única fuente de parásitos era el hospedador del bovino infectado, lo cual limitaba grandemente la población de microorganismos disponibles para estudio. Este problema se ha llegado a resolver por el desarrollo de los métodos de cultivo *in vitro* (84). *Babesia canis* fue cultivada a principios de este siglo en tubos sellados con algodón. Bass y Johns cultivaron parásitos del género *Plasmodium* spp en 1912 y se manejaron diferentes conceptos tales como: esterilidad, uso de sangre defibrinada, temperatura, adición de glucosa, condiciones

de anaerobiosis, niveles de fluidos y la eliminación de células blancas del paquete celular. En 1976, Trager y Jansen fueron capaces de mantener a *Plasmodium falciparum* en ciclos de replicación continua en una atmósfera con baja concentración de oxígeno (62, 81). El cultivo de *Babesia bovis* fue reportado por vez primera en México por Erp *et al* en 1978 (80). Utilizaron eritrocitos de bovino suspendidos en un medio químico definido suplementado con 10% de suero fetal de bovino ajustado a un pH de 7.4 con una atmósfera de 5% de CO₂. El mismo autor en un procedimiento modificado usó el 50% de eritrocitos en suspensión y 50% de medio suplementado con suero. Irvin *et al* en 1978 mantuvieron a *Babesia divergens* y *B. major* por 24 horas en un medio suplementado con 10% de suero fetal bovino, al cual añadieron antibióticos y HEPES (N-2 Hidroxietilpiperazina N¹-2 ácido etanosulfónico) como sal (62). La técnica fue mejorada por Levy y Ristic en 1980 (81,84). Ellos fueron quienes desarrollaron el procedimiento conocido como Fase Estacionaria Microaerofílica (MASP). Estos investigadores redujeron la cantidad de eritrocitos a 10% y utilizaron matraces de 100 ml en lugar de platos de 96 pozos y mantuvieron los niveles de fluidos del medio de cultivo en una atmósfera de 5% de CO₂ (62, 80). Timms (1980) logró cultivar a *B. bigemina*, *B. bovis* y *B. rodhaini* con resultados positivos pero por períodos cortos. Rehbién *et al* cultivó *B. equi* al emplear linfocitos y eritrocitos de caballo, mientras que Vayrynen y Tuomi en 1982 mantuvieron cultivos de *B. divergens*. Ese mismo año Molinar *et al* cultivaron a *B. canis* (62). El sistema de MASP fue mejorado por Palmer, quien en 1981 sustituyó el HEPES por TES (N-tris[hidroximetil]metil-2-ácido aminoetanosulfónico) con el fin de obtener una mejor capacidad para mantener el pH.

Rodriguez *et al* redujeron el volumen de paquete celular a 2.5% (80) y Vega *et al* lograron cultivar exitosamente a *B. bigemina* (95). *Babesia bovis* y *B. bigemina* se han cultivado a través de la técnica de Fase Estacionaria Microaerofílica (MASP) (37, 38, 41, 43, 59, 60). (Cuadro 2)

Los estudios acerca de la babesiosis bovina se han dificultado, en parte debido a que no se cuenta con cantidades suficientes de antígenos para establecer diversas pruebas de laboratorio para conocer la respuesta del hospedador a esta enfermedad. Los antígenos que más se han utilizado son los obtenidos a partir de eritrocitos de bovinos infectados experimentalmente con cepas de campo, pero el grado de parasitemia alcanzada es por lo general menor al 2% (6). Con la aplicación de la tecnología de cultivo *in vitro* de *Babesia* spp, incluyendo la clonación de la misma, ha sido posible obtener subpoblaciones de comportamiento homogéneo. La identificación de éstas como subpoblaciones atenuadas, permitirían su uso como agentes inmunizantes, además, al utilizar la tecnología de cultivo celular, se disminuiría la posible transmisión de otros agentes infecciosos (13, 81).

El parásito se desarrolla *in vitro* en un medio suplementado con suero bovino (24, 59, 60, 94). Algunos autores han mencionado el uso de suero humano, en el cual se puede cultivar al agente infeccioso al menos por 48 horas. Otros autores han apoyado el hecho de que el suero bovino liofilizado ofrece ventajas sobre el suero congelado con respecto al transporte del material a distancias largas. Además, este tipo de suero permanece sin cambio cuando se le transporta a temperatura ambiente (24). El suero caprino también puede ser utilizado para cultivar a *B. bovis* y de ese modo estudiarla para la elaboración de una vacuna, reduciendo así el costo de las investigaciones en países tropicales (59).

La técnica de MASP tiene la gran ventaja de que remueve los contaminantes de la sangre, tales como *Theileria*, *Eperythrozoon*, y *Anaplasma* spp. aislando de esa manera a *B. bovis*, lo cual elimina la necesidad de utilizar fármacos y de realizar pasajes continuos y costosos en el ganado (46).

El uso de antígenos solubles derivados de los sobrenadantes de cultivos de *Babesia* en las pruebas de ELISA, RIA y aglutinación en látex ha incrementado la sensibilidad y especificidad en la detección de anticuerpos anti-*Babesia* (79). Los exoantígenos liberados por los parásitos en los sobrenadantes del cultivo son una fuente potencial de antígenos que pueden ser utilizados para inducir una inmunidad protectora (74).

Los antígenos solubles derivados del cultivo *in vitro* también han sido utilizados para producir una vacuna contra *B. bovis* y *B. bigemina* en Venezuela. Estas vacunas no poseen las características problemáticas de las vivas y tienen además la ventaja adicional de poder ser desecadas por congelación para un almacenamiento prolongado. Sin embargo, se encontró protección inadecuada contra el desafío heterólogo con antígenos derivados de algunas cepas de *B. bovis* (15).

Otros autores afirman que en la actualidad los mayores esfuerzos hacia el mejoramiento de vacunas vivas están dirigidos hacia la meta de reemplazar a los parásitos derivados de sangre y garrapatás por aquellos cultivados *in vitro* bajo condiciones controladas estandarizadas (76). *Babesia bigemina* también ha sido cultivada *in vitro* en Australia para producir una vacuna viva (48). Las técnicas de cultivo están disponibles para la propagación *in vitro* continua y a corto plazo de las especies de *Babesia* económicamente más importantes. El método MASP es el más aplicado y confiable.

En él, una cepa de *B. bovis* adaptada a suero equino perdió virulencia sin que se observara una pérdida aparente de la inmunogenicidad. El mantenimiento de cepas vacunales de *B. bovis* y *B. bigemina* en cultivos MASP durante 174 y 100 días respectivamente, no afectó la infectividad, virulencia o inmunogenicidad de las cepas probadas en el ganado receptor. Un cultivo *in vitro* de 18 meses de *B. divergens* redujo su virulencia al ser probada en gerbos. Sin embargo, el volumen bajo de inóculo infeccioso que se obtiene de cultivos MASP disminuye su ventaja como una fuente potencial de parásitos para vacunas vivas (15). Se ha utilizado una combinación de cultivo estacionario y en suspensión para producir cantidades adecuadas de *B. bovis* que puedan resolver el problema anterior. La cepa vacunal australiana Ka de ese hemoparásito se mantuvo continuamente en cultivos MASP y después en matraces por un corto tiempo. Esto no alteró su virulencia ni inmunogenicidad comparadas con parásitos derivados de animales infectados (93).

Algunos autores mencionan que el sistema de pases puede influir sobre la infectividad, inmunogenicidad y virulencia. Con respecto a estas dos últimas características, se realizó la comparación entre un aislado mexicano de campo de *B. bigemina* mantenido en becerros por medio de pasajes y otro cultivado *in vitro*. Se reportó que únicamente el aislado de campo mantenido *in vivo* produjo la enfermedad clínica en los animales, mientras que el que se mantuvo en cultivo celular produjo cambios hematológicos menos severos (37).

Sin embargo, la mayoría de los hallazgos remarcan el riesgo de extrapolar los resultados obtenidos a partir de organismos cultivados *in vitro* a las relaciones naturales entre hospedador-agente.

La virulencia relativamente baja de los parásitos de portadores clínicamente recuperados comparada con aquéllas de los que se encuentran infectando agudamente al ganado ha sido explotada en ensayos prácticos de vacunación. Los cambios que se producen mediante los pases con jeringas se ejemplifica a través de estudios en *B. bovis*. Estos pases continuos en bovinos tuvieron como resultado una pérdida permanente de la infectividad hacia el vector. El efecto fue asociado con la morfología anormal de los parásitos en el intestino de la garrapata (15). Se ha observado una reducción de la virulencia de *B. bovis* mediante pases en becerros esplenectomizados. Para ello se requieren hasta 23 pases (7).

La preservación de bacterias, virus, cultivos celulares, espermatozoides, médula ósea e incluso productos vegetales, etc. a temperaturas por debajo de los 0°C, se ha practicado con varias finalidades. Los objetivos principales han sido: la conservación de la viabilidad, morfología, características de crecimiento, patrones cromosómicos y actividad enzimática (19). En la criopreservación o congelamiento de protozoarios de la familia *Babesiidae* se han logrado buenos resultados, destacando los métodos de:

- a) Palmer: se utiliza 10% de polivinilpirrolidona-40 (PVP) como crioprotector (68)
- b) Glicerol: el agente se preserva en 5% de esta sustancia (69)
- c) Crowe: El crioprotector utilizado es 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) en glucosa salina de Puck con glucosa extra (70)

Los hemoparásitos se criopreservan en nitrógeno líquido (-196°C) y así pueden durar años.

HIPÓTESIS

Los hemoparásitos *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* cultivados *in vitro* son viables y conservan su antigenicidad.

OBJETIVOS

- a) Desarrollo de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en cultivo celular utilizando dos tipos distintos de sales balanceadas.
- b) Criopreservación y recuperación de los hemoparásitos cultivados.
- c) Evaluación de los antígenos derivados del cultivo *in vitro* de *B. bovis* y *B. bigemina* mediante la prueba de Inmunofluorescencia indirecta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Equipo de Laboratorio

Con el fin de llevar a cabo cultivos celulares, es necesario contar con un extenso rango de equipo. Éste puede ser clasificado dentro de dos categorías:

- a) Cultivo celular
- b) Biología celular

El equipo diseñado para el trabajo químico y biológico es óptimo para el estudio y caracterización de las propiedades biológicas y bioquímicas de *B. bovis* y *B. bigemina*. Por lo tanto, se debe considerar al equipo de laboratorio para biología celular como un requerimiento para alcanzar los objetivos.

Cepas de *Babesia* spp

Los aislados de *Babesia bovis* y *B. bigemina* utilizados en este estudio fueron originalmente obtenidos en 1986 a partir de garrapatas colectadas en bovinos de un rancho en Santa Fe, Tamaulipas, México.

Se usaron dos cultivos criopreservados de *B. bigemina*: un pase alto (P54 HC 12/17/86) y uno bajo (2 LH 11/3 HC 7/28/86). En el caso de *B. bovis* se utilizó el aislado congelado con la etiqueta P100 08/10/95.

Donador de eritrocitos y suero

Se utilizó un bovino hembra (identificado con el número 3041) de 6 años, cruce de Hereford, criada en Texas A&M University (College Station, TX). Las muestras sanguíneas son frecuentemente examinadas en el laboratorio de diagnóstico para tener la seguridad de que el animal se encuentra libre de Leucosis bovina, Lengua azul, Babesiosis y Anaplasmosis. La vaca se encuentra en condiciones libres de *Babesia* spp y garrapatas.

I. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A. Obtención de sangre para el cultivo:

La sangre se colectó asépticamente del bovino #3041 mediante venopunción yugular con dos jeringas de 60 ml y se depositó en dos matraces de 150 ml cada uno con perlas de cristal en su interior. Los matraces se agitaron inmediatamente con objeto de defibrinar la sangre. En la cabina de flujo laminar se transfirió la sangre a tubos de centrifuga y se sometió a una centrifugación a 2000 RPM durante 30 minutos. El suero fue removido y guardado para ser utilizado en el medio. Las células blancas se eliminan al apartar 1/3 de la capa celular. Se introdujo una pipeta al fondo de cada tubo de centrifuga con el objeto de obtener los eritrocitos. Se colocó 1 ml de eritrocitos en cada uno de los tubos de ensaye que contenían un volumen igual (1 ml) de glucosa salina de Puck más glucosa (PSG Gibco/BRL Cat. No. 310-4100). Esta última sustancia fue preparada al agregar 10 g de glucosa a 500 ml de PSG en un mezclador vórtex con un agitador magnético. Esta solución se filtró a través de una membrana de 0.22 μ m. La suspensión de eritrocitos y PSG+G se almacenó a 4°C (7, 25, 29, 39, 40).

B. Obtención de suero para el medio de cultivo:

La sangre se colectó asépticamente mediante venopunción yugular con jeringas de 60 ml y se depositaron 40 ml de ésta en ocho tubos de centrifuga de 50 ml. Se formaron los coágulos en cada uno de los tubos a temperatura ambiente, y se despegaron los pellets de las paredes del tubo con el uso de un palillo de madera largo. Los tubos fueron refrigerados durante toda la noche y al día siguiente centrifugados a 2000 RPM durante 30 minutos. El suero fue colectado de cada tubo evitando la contaminación con eritrocitos. Si esto último ocurría, se procedía a realizar otra centrifugación hasta eliminar por completo los eritrocitos. El suero no utilizado de inmediato se congelaba a -70°C para su uso posterior.

C. Preparación del medio de cultivo:

El medio consta de los siguientes componentes:

□ 58% de Medio-199 sin L-glutamina con solución salina balanceada de Hank (JHR Biosciences M-199/HBSS 500 ml Cat. No. 51-50171) del día 1 al 29 y con solución salina balanceada de Earle (JHR Biosciences M-199/EBSS 500 ml Cat. No. 51-31178) del día 30 al 45. En 1950, Morgan y sus colaboradores reportaron sus esfuerzos para producir una fuente nutricional para cultivos celulares. Sus experimentos fueron conducidos con varias combinaciones de vitaminas, aminoácidos y otros factores. Éstos revelaron que el crecimiento de los tejidos podría ser medido en lo que se conoce actualmente como Medio 199. Sin embargo, se descubrió que el cultivo de células a largo plazo requería de la adición de un suplemento sérico. Cuando se encuentra adecuadamente suplementado, el Medio 199 tiene una aplicación amplia, particularmente para la producción de vacunas (45). (Cuadro 3)

Sus propiedades son las siguientes:

pH: 7.4 con rojo de fenol como indicador. Se torna anaranjado a un pH de 7.0, amarillo a 6.5, amarillo limón debajo de 6.5, rosa a 7.6 y morado a 7.8.

Buffer: Se utiliza el bicarbonato por su baja toxicidad, costo accesible y beneficio nutricional para el cultivo.

Temperatura: Tiene un efecto directo sobre el crecimiento.

Espuma: Los efectos de la formación de espuma no han sido definidos claramente. Sin embargo, es preferible evitarla debido a que la tasa de desnaturalización de las proteínas puede incrementar, además de que aumenta el riesgo de contaminación si la espuma alcanza la parte superior del pozo de cultivo (26).

Con respecto a las soluciones salinas balanceadas, cabe señalar que éstas se componen de sales inorgánicas. Existen varios tipos de soluciones de este tipo. En este experimento se utilizaron dos tipos de sales incluidas por separado en el Medio-199: la solución salina balanceada de Earle (EBSS) y la de Hank (HBSS). La diferencia entre estas dos es que la primera contiene bicarbonato de sodio y debe ser utilizada en una atmósfera con 5% de CO₂ mientras que la de Hank está diseñada para bufferar el medio en una atmósfera de aire, más que de CO₂ (26). (Cuadro 4)

40% de Suero de bovino adulto normal: Como fuente de polipéptidos y minerales principalmente.

2 % de TES (Sigma Chemical Company TES Cat. No. T 6022): Es un buffer biológico que se adiciona al M-199. Para prepararlo se disolvieron 22.9 g de TES en 100 ml de agua destilada. La solución se esterilizó por filtración (membrana de 0.22 µm) y se refrigeró.

□ **Antibióticos y antimicóticos:** Su uso no debe ser considerado un sustituto de una técnica aséptica, debido a que muchos de éstos ejercen efectos tóxicos a concentraciones mínimamente más elevadas que las dosis recomendadas (26). (Cuadro 5) Se adicionaron 0.01 ml de gentamicina al medio. (24, 29, 46, 94).

Los reactivos mencionados se mezclaron en un matraz de 250 ml. La solución final (100 ml) fue filtrada a través de una membrana de 0.45 μm , transferida a cuatro frascos estériles con tapón de rosca y se almacenó en refrigeración. Cada frasco se identificó con etiquetas que contenían la siguiente información:

Medio de cultivo para *Babesia* :

Frasco uno: *bovis*
Frasco dos: *bigemina* pase alto
Frasco tres: *bigemina* pase bajo
Frasco de 25 cm²: *bovis*

Fecha de elaboración del medio

Nombre

Todo el trabajo de cultivo celular se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar. El aire estéril sobre la superficie de trabajo permite tener un mayor control de la asepsia a un costo mucho menor que el tener que contar con un cuarto estéril por separado. La cabina es individual y móvil. En ella solamente se introducen los brazos del operador al área estéril. La puerta debe estar alejada de esta área y la preparación de reactivos y maniobras de centrifugación y lavado deben llevarse a cabo del lado opuesto del cuarto de cultivo.

II. MÉTODOS

Es importante señalar que todos los procedimientos fueron realizados bajo condiciones de asepsia en un cuarto de cultivo. La superficie de trabajo de la cabina de flujo laminar siempre fue limpiada con etanol antes y después de llevar a cabo los procesos necesarios para el cultivo de cada una de las especies.

A. Iniciación y mantenimiento de cultivos:

1. Se recuperaron tres cultivos mantenidos en ampulas criopreservadas dentro de un tanque de nitrógeno líquido. Cada una contenía aproximadamente 0.5 ml de cultivo criopreservado de *B. bovis*, de *B. bigemina* fase alto (HP) y *B. bigemina* fase bajo (LP)

a. Las ampulas fueron removidas del tanque de nitrógeno líquido

b. Se descongelaron a 37°C a baño maría en un recipiente con tapa (ya que la tapa del ampula puede proyectarse a gran velocidad debido al cambio brusco de temperatura). Las ampulas se manejan con forceps, manteniendo la tapa de éstas siempre en dirección opuesta a los ojos.

4. Una vez descongeladas, se enjuagaron con etanol al 70% y se abrieron.

5. *Babesia bovis*, *B. bigemina* HP y LP fueron mantenidas por separado en platos de 24 pozos de acuerdo con Levi y Ristic y Vega *et al* (24). Cada plato se identificó con una etiqueta que decía el nombre del parásito (y pase en el caso de *B. bigemina*). El procedimiento de cultivo fue idéntico para los tres aislados. También se realizó un cultivo de *B. bovis* en un frasco de 25 cm² (Becton Dickinson) con tapa de rosca.

6. El cultivo fue iniciado en dos pozos. Se depositaron 0.9 ml del medio de cultivo y 0.1 ml de la suspensión de eritrocitos en cada pozo.

7. Se colocaron 0.25 ml de cultivo descongelado en cada pozo.

Los platos de pozos están manufacturados con poliestireno libre de metales pesados y cuidadosamente seleccionados para cultivos celulares. Están esterilizados por radiación y certificados como no-pirogénicos. Cuentan con una tapa que minimiza la evaporación durante la incubación.

El plato de cultivo mide aproximadamente 0.85 mm x 128 mm y tiene un grosor de 22 mm (con tapa) (78).

8. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda de 2% de oxígeno, 5% de dióxido de carbono y 93% de nitrógeno (42). Esta atmósfera se logró al colocar los platos de cultivo dentro de un satélite que contenía de 10 a 15 ml de agua destilada y mediante la adición de la mezcla gaseosa con una presión de 2 libras durante 2 minutos.

A. Alimentación de los cultivos: Los cultivos fueron alimentados cada 24 horas (40).

1. De cada pozo se eliminaron 0.9 ml del medio que se encontraba encima de la capa celular sin tocar esta última.

2. Con el objeto de evaluar el crecimiento diario de los cultivos, se realizaba un frotis sanguíneo de gota delgada y se teñía con Giemsa (Giemsa Stain Modified 0.4% SIGMA) después de diluirlo 1:20 en agua destilada. Los frotis teñidos eran observados para contar las formas diversas de los merozoitos que estaban dentro de los eritrocitos. Las formas fueron clasificadas como: piriforme sencilla, piriforme doble, piriforme múltiple y eritrocito no infectado. El porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) se determinó mediante la cuenta de 500 eritrocitos por laminilla (24, 39).

3. Se adicionaron 0.9 ml de medio fresco (entibiado previamente a baño maría) a cada pozo.

B. Subcultivos:

Un subcultivo consiste en cosechar las células de un cultivo para iniciar uno nuevo. Este término es sinónimo de pasaje, que es el proceso de transferir o transplantar una población celular de un cultivo a otro (49).

1. Los subcultivos se realizaron cada 48-72 horas, es decir, cuando el PEP había aumentado. Primero se depositaron 0.9 ml de medio fresco y 0.1 ml de eritrocitos en dos pozos nuevos.
2. Se removieron 0.9 ml del medio sobrenadante de cada uno de los dos pozos que se iban a subcultivar.
3. Sin tocar la capa celular, se tomó una muestra pequeña con una pipeta Pasteur para hacer un frotis y teñirlo con Giemsa.
4. Se adicionaron 1.8 ml de medio nuevo a uno de los pozos originales y se mezcló con el paquete celular.

5. Se transfirió esa suspensión al siguiente pozo y se resuspendió.

6. Se pipetearon 1.75 ml de la suspensión y se depositaron 0.25 ml de ésta dentro de cada uno de los pozos nuevos y los 1.25 ml restantes se colocaron en uno de los pozos originales para que éste fuera utilizado como "pozo de respaldo".

C. Cultivo en Frasco Estéril de 25 cm² (50 ml) (Becton Dickinson Falcon®) : Este se realizó únicamente para *Babesia bovis* :

1. Del plato de 24 pozos se subcultivaron 3 ml.

2. Se depositaron 11 ml de medio fresco y 1 ml de eritrocitos en el frasco de cultivo.

3. Alimentación del cultivo en frasco de 25 cm²:

Los cultivos se alimentaron diariamente

El frasco se inclinaba cuidadosamente y se eliminaban 10 ml del sobrenadante.

Se tomaba una muestra con pipeta Pasteur para hacer un frotis y teñirlo con Giemsa.

Se depositaron 10 ml de medio fresco al frasco de cultivo.

4. La tapa del frasco no debía ser cerrada herméticamente a fin de que la mezcla gaseosa pudiera penetrar en él.

5. El frasco de 25 cm² se colocó dentro de la incubadora con 5% de CO₂.

6. Subcultivos:

Se colocaron 11 ml de medio fresco en un nuevo frasco de 25 cm².

Se inclinó cuidadosamente el frasco y se eliminaron 10 ml del sobrenadante.

Se tomó la muestra para hacer un frotis y teñirlo con Giemsa.

Se depositaron 10 ml de medio fresco.

Se mezclaron las células con el medio hasta hacer una suspensión.

Se colocaron 3 ml dentro del nuevo frasco que contenía los 11 ml de medio fresco.

Se depositaron 1.1 ml de eritrocitos en este nuevo frasco de cultivo.

El frasco de cultivo fue mantenido en incubación a 37°C con una atmósfera húmeda de 2% de oxígeno, 5% de dióxido de carbono y 93% de nitrógeno.

D. Criopreservación de los cultivos:

Babesia bovis y *B. bigemina* pueden criopreservarse con varios fines, entre los que se encuentra la posible inoculación de estos organismos a los animales. El reestablecimiento de los cultivos eliminaría el riesgo de manejar animales infectados. Además, la criopreservación podría permitir la recuperación de semillas de cepas de *Babesia* spp para la elaboración de una vacuna (97). El almacenamiento en nitrógeno líquido es comúnmente el método más satisfactorio para la preservación de células cultivadas. La suspensión celular debe ser congelada lentamente, a razón de 1°C por minuto en presencia de polivinilpirrolidona de preferencia, debido a que las células se conservan por un periodo más largo entre el descongelamiento y su uso (26, 57, 68).

Método:

1. Se preparó una solución al 10% de polivinilpirrolidona (SIGMA PVP-40 Cat. No. P-0930) en PSG-G al disolver 1.1 g de la primera en 0.9 ml de PSG-G.
2. El matraz que contenía esa solución fue almacenado a temperatura ambiente en una atmósfera normal por 4 a 6 horas.
3. Se eliminó el sobrenadante de los cultivos.
4. Estos fueron revisados para verificar las siguientes propiedades:

a) crecimiento saludable

b) ausencia de contaminación

5. Los cultivos fueron sometidos a centrifugación a 1000 RPM durante 10 minutos.

6. Se añadió un volumen igual de solución al 10% de PVP-PSG-G al pellet.

7. Se depositaron 500 µl de la suspensión celular dentro de crioampolletas de 1- ó 2- ml y éstas se sellaron perfectamente.

8. Se revisó que no existieran derrames al colocar las ampulas en un plato con 1% de azul de metileno disuelto en alcohol al 70% a 4°C durante 10 minutos antes de congelar los cultivos.

9. Las ampulas se colocaron en un recipiente con hielo y dentro de un contenedor con etanol al 70%.

10. El contenedor fue sometido a una temperatura de -70°C durante 24 horas.

11. Este fue transferido al tanque de nitrógeno líquido con lentes protectores y guantes (37, 40). Esto fue realizado rápidamente, ya que las células se deterioran si la temperatura se eleva sobre los -50°C (26).

12. Una vez que las ampulas fueron colocadas dentro del tanque, se registraron con los siguientes datos:

a) Parte del tanque en el que se depositaron

b) Cepa de *Babesia* spp utilizada, número de pase y donador, fecha e iniciales del operador.

**PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA *Babesia* spp
(99)**

A. Preparación de las células del cultivo utilizadas en la prueba de inmunofluorescencia indirecta:

1. Los cultivos se suspendieron en un matraz y se colocaron en un tubo de centrifuga de 15 ml.
2. Se centrifugaron a 1000 RPM durante 10 minutos.
3. Se eliminó el sobrenadante.
4. Se resuspendieron en solución salina buferada y se mezclaron.
5. Se centrifugó de nuevo.
6. Los pasos 4-5-6 se repitieron hasta completar un total de tres lavados.
7. Se preparó una solución al 3.5% de ovalbúmina (GIBCO) en solución salina buferada.
8. Se mezcló esta solución con las células.
9. Se prepararon laminillas utilizando de 5 a 10 μ l de la suspensión (que cubrieran por completo el portaobjetos).
10. Las laminillas fueron colocadas en un recipiente con hielo y en un congelador.

B. Prueba de inmunofluorescencia indirecta:

1. Se preparó una solución 1x de solución salina buferada (PBS) a partir de una solución 20x de la misma:
 - a. Se diluyó 1 ml de solución 20x PBS en 10 ml de agua destilada y se aforó a 1000 ml.

b. 20x PBS:

NaCl	160 g
KCl	4 g
Na ₂ HPO ₄	23 g
KH ₂ PO ₄	4 g

c. Se esterilizó en autoclave a 250°C por 30 minutos en pequeñas cantidades.

d. Se almacenó en refrigeración y se revisó el pH (7.0 a 7.4)

2. Se diluyeron 1:80 los sueros testigo positivo y el negativo en 1xPBS:

10 µl de suero (+) a *Babesia bovis* (#41) : 790 µl de 1xPBS

10 µl de suero (+) a *Babesia bigemina* (#80) : 790 µl de 1xPBS

10 µl de suero (-) (#1) : 790 µl de 1xPBS

Todas las soluciones con PBS se mantuvieron frías.

3. Las laminillas se registraron en el libro de control de la prueba.

a. Las laminillas se sacaron del congelador, se marcaron y se dejaron secar a temperatura ambiente.

b. Se dibujaron tres filas de seis círculos de 4mm de diámetro aproximadamente con barniz de uñas y se dejaron secar.

4. Las diluciones de los sueros y testigos fueron realizadas y colocadas en el círculo apropiado a razón de 10 µl/círculo.

a. Todos los sueros y diluciones se mantuvieron fríos en un recipiente con hielo.

b. Los tres primeros pozos se utilizaron como testigos:

Ⓐ Positivo

Ⓑ Negativo

Ⓒ PBS

5. Las laminillas se colocaron en un contenedor húmedo.
6. Se incubaron a 37°C durante 40 minutos.
7. Las laminillas se lavaron con PBS utilizando una piseta.
8. Estas se secaron utilizando la temperatura fría de una secadora de pelo.
9. El conjugado (SIGMA Antiserum: FITC-Protein G) se diluyó. 1:300, *i.e.*, 3 ml PBS en una ampolleta de Proteína G y se almacenó a -20°C hasta ser usado.
10. Se añadió el conjugado a las laminillas.
11. Las laminillas se colocaron en un contenedor húmedo y se incubaron a 37°C durante 40 minutos.
12. Se lavaron con PBS y se dejaron secar protegiéndolas de la luz.
13. Las laminillas se observaron en el microscopio de luz ultravioleta de inmediato.

RESULTADOS

Babesia bovis y *B. bigemina* (pase alto y bajo) se establecieron en un cultivo de eritrocitos de bovino adulto. Los parásitos fueron identificados mediante frotis sanguíneos teñidos con Giemsa y se observaron las siguientes formas:

- a) Cuando se utilizó el medio de crecimiento M-199 con la solución salina balanceada de Hank (HBSS) las formas predominantes fueron sencillas (anillos).
- b) Al usar el M-199 con la solución salina balanceada de Earle (EBSS) predominó la morfología de merozoitos piriformes sencillos y dobles.

Los subcultivos se realizaban cuando el porcentaje de eritrocitos parasitados aumentaba (cada 24-48 horas). Cuando los parásitos con apariencia óptima disminuían, se procedía a resuspender los pozos.

Cuando se presentaba un importante decremento en la parasitemia, haciéndola casi imperceptible, se añadían gotas frescas de eritrocitos a los pozos problema. (Cuadro 6)

Estas células duraban 4 semanas, por lo cual, fue necesario tomar otra muestra sanguínea al animal a mediados del mes de julio (considerando que la primera muestra fue obtenida el 16 de junio).

El medio de crecimiento M-199 fue cambiado de HBSS a EBSS el día 29, ya que era notable el descenso en el porcentaje de eritrocitos parasitados. Además, se observaban numerosos hemoprotozoarios fuera de las células. Al cambiar el medio, se notó un importante incremento en la parasitemia, el cual fue evaluado estadísticamente (Cuadro 7)

Los datos más importantes de este análisis son las diferencias altamente significativas entre los promedios de los días 1-29 (M-199/HBSS) y 30-45 (M-199/EBSS). (Cuadro 8)

Se llevaron a cabo análisis de control de observaciones individuales y de rangos móviles con el objeto de obtener las diferencias en el crecimiento de los parásitos; teniendo en cuenta que las actividades que se realizaban tenían influencia sobre las que se hacían posteriormente.

Es posible observar en las figuras 1 y 2 que entre los días 1-29 (cuando se utilizó el M-199/HBSS) y 30-45 (M-199/EBSS) existe una diferencia altamente significativa, pues dentro del primer rango mencionado, el porcentaje de eritrocitos parasitados se mantiene entre el límite de control inferior y el de control superior, mientras que en el rango de los días 30-45 días la parasitemia se eleva sobre el límite de control superior y se aleja completamente del promedio. Los valores situados encima del límite superior indican que no existe un control estadístico. Una vez que se hizo una determinación satisfactoria de la desviación patrón, los límites de control se colocaron en el equivalente de 3 desviaciones estándar con respecto a la línea central o promedio. (figuras 5, 6 y 7) Los valores se elevaban por encima del límite de control superior antes de cambiar las sales balanceadas, es decir, que existió una desviación de las observaciones más allá de tres desviaciones estándar ($RM=3$). Se consideró un rango móvil correspondiente a 3 días.

Los cultivos de *Babesia bigemina* se recuperaron de la criopreservación 10 años después de su congelación. En el caso de *B. bovis*, el cultivo fue reestablecido al año post-congelación.

Los organismos se encontraban en condiciones adecuadas, lo cual indica que la polivinilpirrolidona (PVP) tiene propiedades crioprotectoras apropiadas.

El establecimiento inicial de los cultivos de *B. bigemina* fue lento, pero los parásitos pudieron mantenerse con éxito y fueron sometidos a varios pases. Es importante mencionar que con la cepa correspondiente al pase alto de este protozoario se obtuvieron parasitemias más altas que con respecto al pase bajo. (Gráfica 3)

Babesia bovis requirió de un mayor número de subcultivos debido a que tuvo un crecimiento rápido. (Gráfica 4) Los eritrocitos infectados con parásitos eran menos abundantes 24 horas después de que se realizaban los subcultivos y predominaron las formas anulares.

Los cultivos fueron preservados en nitrógeno líquido utilizando PVP como crioprotector.

Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta:

Se realizó una prueba de inmunofluorescencia indirecta para evaluar a los antígenos derivados del cultivo *in vitro*. Estos no mostraron reacciones cruzadas y se observaron claramente pares y formas anulares fluorescentes. No hubo fluorescencia de fondo. Se utilizó el suero número 41, el cual es (+) a *Babesia bovis*. Con respecto a *B. bigemina*, el suero (+) utilizado fue el número 80 y el suero (-) fue el número 1. *B. bovis* reaccionó positivamente al suero #41, y *B. bigemina* (pase alto y bajo) al suero #80. Ninguno de los dos parásitos mostró reacción con el suero #1 ni con la sustancia testigo.

DISCUSIÓN

El propósito de una gráfica de control consiste en dar una advertencia en cuanto a la posibilidad de que surjan problemas en el método. Las causas de las variaciones alrededor de la media se clasifican como causas asignables. Estas son aquéllas que se pueden reconocer cuando la gráfica indica que el proceso está fuera de control. En este estudio, se detectó la desviación de las observaciones después del día 29 más allá de tres desviaciones patrón, lo cual se consideró como una advertencia de que el proceso estaba fuera de control estadístico, pues los puntos no estuvieron distribuidos uniformemente a ambos lados de la línea del promedio y dentro de las fronteras del límite inferior de control (es decir, dentro de las tres desviaciones estándar). La aplicación de gráficas de control permite vigilar la exactitud y precisión de las mediciones de laboratorio. Cuando se hacen éstas durante un periodo extenso, el control de calidad hace posible la pronta detección de deterioros en la técnica, los reactivos o el equipo. Los datos acumulados como parte de un programa de control de calidad son importantes para evaluar la confiabilidad de cada medición, así como para la detección de cambios que afectan adversamente la exactitud de las mediciones. La causa asignable fue el cambio del medio de crecimiento utilizado, lo cual se explica a continuación.

Los resultados observados mostraron que el Medio-199 que contenía la solución salina balanceada de Earle fue el mejor, ya que cuando fue adicionado al cultivo, se observó un incremento en el porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) que con relación al Medio-199 que contenía la solución salina balanceada de Hank. Cabe mencionar que con esta última, los parásitos comenzaron a perder sus propiedades infectantes y el PEP descendió.

Existió una diferencia estadística significativa entre el PEP observado al utilizar los dos medios ($P < 0.05$). Esto pudo deberse a que el M-199/HBSS está diseñado para ser utilizado en una atmósfera de aire y el M-199/EBSS se debe usar en una atmósfera de 5% de CO_2 . Los cultivos se mantuvieron bajo estas últimas condiciones, por lo cual se observó una mayor proliferación de la población cuando el Medio fue cambiado. Las concentraciones de CO_2 son muy importantes para el crecimiento de las especies de *Babesia* spp y la solución salina balanceada de Earle favorece el aprovechamiento de la atmósfera adecuada para el parásito. Cuando *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* crecen y se mantienen en condiciones óptimas, las formas observables en el microscopio son principalmente dobles. Esto fue visto claramente cuando se comenzó a utilizar el M-199/EBSS. La solución salina balanceada aunada a los demás reactivos permitió el mantenimiento exitoso de los cultivos. Del mismo modo, la adición de eritrocitos frescos y las resuspensiones realizadas incrementaban el porcentaje de eritrocitos parasitados, ya que los protozoarios no penetraban a las células cuando éstas comenzaron a envejecer o cuando no se mezclaban adecuadamente con la solución de glucosa salina de Puck adicionada con glucosa extra.

Los subcultivos se realizaron con el fin de que los parásitos pudieran crecer adecuadamente con el espacio y medio nutritivo adecuados. *B. bovis* proliferó más rápidamente que *B. bigemina*, ya que en general ésta última tiene un crecimiento más retardado (81). Con respecto a este protozoario, cabe señalar que el pase alto aumentó su población rápidamente, pues el parásito ya estaba más condicionado al cultivo celular, pues con él se realizaron 10 pases, dando un total de 65 pases. La cepa de pase bajo comenzó a adaptarse lentamente al cultivo, pero finalmente creció y se mantuvo con éxito y se completaron 24 pases en su registro total.

B. bovis permitió realizar 14 pases debido a su mayor adaptabilidad y con ello registró 115 pases en total. Es por ello que los investigadores han realizado numerosas pruebas para lograr aumentar el PEP en el caso de *B. bigemina* y lograr obtener parasitemias como las que se alcanzan con *B. bovis*. Para ello han ideado métodos como la concentración del volumen del paquete celular por medio de centrifugaciones continuas (97)

En este estudio, los aislados fueron exitosamente recuperados después de haber permanecido criopreservados en nitrógeno líquido utilizando polivinilpirrolidona como crioprotector por 10 años (en el caso de *B. bigemina* y por un año en el caso de *B. bovis*) y fueron mantenidos en cultivo celular, en el cual aumentaron su población. Existen varios crioprotectores, y en este caso se confirmó que la PVP tiene excelentes propiedades para ser utilizada en la criopreservación de cultivos de *Babesia* spp. Los organismos fueron criopreservados para que puedan ser utilizados en un futuro. La aplicación principal del cultivo fue la realización de una prueba serológica (Inmunofluorescencia indirecta). Esta es la prueba oficial en Texas, ya que los EE.UU. se encuentran libres de babesiosis. Además, es altamente específica y sensible. En el presente estudio, la prueba de inmunofluorescencia indirecta demostró la presencia de un antígeno derivado del cultivo *in vitro* y la reacción fue muy clara.

El reestablecimiento de cultivos celulares utilizando especímenes congelados podría eliminar la necesidad de mantener animales infectados, así como el riesgo de diseminar la enfermedad a animales susceptibles. Además, este procedimiento permite el establecimiento de cultivos de semilla de *Babesia* spp para estudios bioquímicos y vacunales, así como para el mejoramiento de métodos diagnósticos sensibles y específicos.

El desarrollo de la técnica de cultivo celular para el crecimiento de *Babesia* spp surgió en gran parte debido a la necesidad de producir una vacuna efectiva y segura y también para entender las propiedades bioquímicas y biológicas de los parásitos. La estandarización de las condiciones para el cultivo dio impetu al desarrollo de la tecnología moderna de cultivo celular. El abastecimiento comercial de medios confiables y el control de la contaminación con equipo que maneja aire estéril ha hecho que el cultivo *in vitro* sea accesible para un gran rango de intereses.

Una fuerza adicional de mucho peso por parte de la opinión pública ha sido la preocupación por parte de grupos que defienden los derechos de los animales y que pretenden evitar el uso de éstos en materia experimental. La principal ventaja del cultivo celular, es, como se explicó anteriormente, el control del ambiente fisicoquímico (pH, temperatura, O₂, CO₂) y de las condiciones fisiológicas, las cuales pueden mantenerse relativamente constantes, pero no pueden definirse siempre, como en el caso de la suplementación con suero.

Otra ventaja importante es la economía. Los eritrocitos bovinos pueden exponerse directamente al parásito a concentraciones más bajas con acceso directo de este último a la célula. De esa manera, se requieren menos cantidades que con respecto a una inyección *in vivo*, en la que se pierde el 90% por excreción y distribución (26).

CONCLUSIONES

En el presente estudio se observó que el Medio-199/EBSS fue el que mejor permitió el crecimiento de *Babesia bovis* y *B. bigemina*. El cultivo criopreservado en polivinilpirrolidona fue recuperado al año y a los 10 años respectivamente, lo cual indica que es un excelente crioprotector. La viabilidad del cultivo y su antigenicidad se evaluaron por medio de la prueba de inmunofluorescencia indirecta, la cual no mostró reacciones cruzadas ni de fondo. Esto califica al cultivo celular de *B. bovis* y *B. bigemina* como un medio adecuado para el desarrollo y caracterización de estos hemoprotozoarios.

El uso de sistemas de cultivo *in vitro* ha sido aceptado generalmente como una de las maneras más importantes para obtener antígenos vivos o inactivados. Esta tecnología ha sido utilizada como un medio de atenuación de los parásitos usados como inmunógenos vivos. El cultivo celular de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* tiene muchas aplicaciones. Permite el aislamiento directo de portadores de los parásitos, lo cual permite contar con un método menos costoso y que requiere menor tiempo y esfuerzo que la inoculación tradicional de animales susceptibles. El cultivo *in vitro* también permite obtener poblaciones homogéneas (clonas) para realizar estudios de sus características bioquímicas y biológicas con el objeto de poder desarrollar una vacuna y mejores métodos de diagnóstico.

LITERATURA CITADA

- (1) Alonso, M. *et al.*: Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* , 11 : 713-733 (1992).
- (2) Alvarez, M.J.: Inmunidad humoral en la anaplasmosis y babesiosis bovinas en becerros mantenidos en una zona endémica. Tesis de Maestría. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1989.
- (3) Alvarez, M.J.: Métodos más comunes para la prevención de la babesiosis bovina. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal: Garrapatas y enfermedades que transmiten. Sede Centro Vacacional I.M.S.S. Oaxtepec, Morelos 9-11 octubre 1991. 200-208 *División de Educación Continua.* México (1991).
- (4) Andrews, A.H., Blowey, R.W., Boyd, H., and Eddy, R.R.: *Bovine Medicine Blackwell Scientific Publications USA*, 1992.
- (5) Barnard, D.R., Mount, G.A., Haille, D.G., and Daniels, E.: Integrated management strategies for *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) on pastured beef cattle. *J. Med. Entom.* , 31: 571-85 (1994).
- (6) Bautista, G.C., Rodríguez, C.S. y Morilla-González, A.: Pruebas preliminares de inmunosupresión experimental de bovinos para incrementar la parasitemia por *Babesia bovis*. *Tec. Pec. en Méx.* 32: 39-42 (1994)
- (7) Bock, R.E., De Vos, A.J., Kingston, T.G., Shiels, I.A. and Dalgiesh, R.J.: Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. *Vet. Par.* 43: 45-46 (1992).
- (8) Brown, W.C., Logan, K.S., Wagner, G.G., and Tetzlaff, C.L.: Cell-mediated immune responses to *Babesia bovis* merozoite antigens in cattle following infection with tick-derived or cultured parasites. *Inf. and Imm.* , 59: 2418-26 (1991).
- (9) Brown, W.C., Palmer, G.H., McElwain, T.T., Hines, S.A., and Dobbela, A.E.: *Babesia bovis*: Characterization of the T-helper cell response against the 42-kDa Merozoite Surface Antigen (MSA-1) in cattle. *Exp. Par.* , 77: 97-110 (1993).
- (10) Buening, G.M.: Diagnosis of babesiosis: Past, present and future. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal: Garrapatas y enfermedades que transmiten. Sede Centro Vacacional I.M.S.S. Oaxtepec, Morelos 9-11 octubre 1991. 180-189. *División de Educación Continua.* México (1991).
- (11) Buening, G.M., Kuttler, K.L., and Rodríguez, S.D.: Evaluation of a cloned *Babesia bovis* organism as a live immunogen. *Vet. Par.* 22: 235-242 (1986)

- (12) Camino, L.M. : Manejo y modificación del hábitat en el control de las garrapatas. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal: Garrapatas y enfermedades que transmiten. Sede Centro Vacacional I.M.S.S. Oaxtepec, Morelos 9-11 octubre 1991. 66-71. *División de Educación Continua*. México (1991).
- (13) Cantó-Alarcón, G.J., Figueroa, M.J., Alvarez, M.J., Ramos A. J. y Vega y Murguía, C.A.: Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de cultivo *in vitro*. *Téc. Pec. en Méx.* 34(3): 127-135 (1996).
- (14) Dalglish, R.J. and Stewart, N.P.: Some effects of time, temperature, and feeding on infection rates with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus* larvae. *Int. J. Par.*, 12: 323-6 (1982).
- (15) Dalglish, R.J.: Immunology and molecular biology of parasitic infections.--- Babesiosis. 3rd.ed. *Blackwell Scientific Publications*. Boston, 1993.
- (16) Dallwitz, M.J., Young, A.S., Mahoney, D.F., and Sutherst, R.W.: Comparative epidemiology of tick-borne diseases of cattle with emphasis on modelling. *Int. J. Par.*, 17: 629-237 (1987).
- (17) Davis, W.C., Wyatt, C.R., Hamilton, M.J., and Goff, W.L.: A rapid, reliable method of evaluating growth and viability of intraerythrocytic protozoan hemoparasites using fluorescence flow cytometry. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 87, Suppl. III*, 235-239 (1992).
- (18) Deechaide, S.T., Echaide, I.E., Gaido, A.B., Mangold, A.J., Lugaresi, C.I., Vanzini, V.R., and Guglielmonc, A.A.: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay kit to detect *Babesia bovis* antibodies in cattle. *Prev. Vet. Med.*, 24:277-283 (1995).
- (19) Domínguez, A.J.: Conservación y viabilidad de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* congeladas en nitrógeno líquido. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1971.
- (20) Duncan, I.M.: Tick control on cattle with flumethrin pour-on through a duncan applicator. *J. South Afr. Vet. Assoc.*, 63: 125-127 (1992).
- (21) Elghaysh, A., Sundquist, B., Christensson, D.A., Hilali, M., and Nassar, A.M.: Observations on the use of ELISA for detection of *Babesia bigemina* specific antibodies. *Vet. Par.*, 62:51-61 (1996).
- (22) Fernández, R.M., Cantó, A. G. y Aboytes, T.R.: Prevalencia de anticuerpos séricos en contra de *Babesia* spp y *Anaplasma marginale* en el municipio de Santiago Ixcuintla, Nayarit. *Rev. Vet. Méx.* 26 (4): 407-409 (1995)

- (23) Figueroa, J.V., Chieves, L.P., Johnson, G.S., and Bucning, G.M.: Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Par.* 50: 69-81 (1993)
- (24) Fish, L., Pipano, E., and Indrakamhang, P.: Lyophilised bovine serum as a substitute for frozen serum in the cultivation of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*. *Res. Vet. Sci.*, 52:115-6 (1992).
- (25) Fivaz, B.H. and De Waal, D.T.: An evaluation of strategic and short interval tick control in indigenous exotic and crossbred cattle. *Trop. Anim. Health and Prod.*, 25: 19-29 (1993).
- (26) Freshney, I.R.: Culture of Animal Cells. 3rd.ed. Wiley-Liss New York, 1994.
- (27) García-Vázquez, Z.S.: Avances en el conocimiento de la epidemiología de la babesiosis. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal: Garrapatas y enfermedades que transmiten. Sede Centro Vacacional I.M.S.S. Oaxtepec, Morelos 9-11 octubre 1991. 172-179 *División de Educación Continua*. México (1991).
- (28) Georgi, J.R. and Georgi, M.E.: Parasitology for Veterinarians. 5th.ed. *W.B. Saunders Company*, Philadelphia, 1990.
- (29) Goff, W.L., Jessup, D.A., Waldrup, K.A., Thomford, J.W., Conrad, P.A., Boyce, W.M., Gorham, J.R., and Wagner, G.G.: The isolation and partial characterization of a *Babesia* sp from desert bighorn sheep (*Ovis canadensis nelsoni*). *J. Euk. Microb.*, 40: 237-243 (1993).
- (30) Goldman, M., Pipano, E., and Rosenberg, A.S.: Fluorescent antibody tests for *Babesia bigemina* and *Babesia berbera*. *Res. Vet. Sci.*, 13: 77-81 (1972).
- (31) Guglielmone, A.A., Gaido, A.B., and Mangold, A.J.: Light Microscopy Diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* kinesis in the haemolymph of artificially infected *Boophilus microplus* engorged female ticks. *Vet. Par.*, 61:15-20 (1996).
- (32) Gutiérrez, C.J.: Prevalencia de la babesiosis bovina en tres municipios ganaderos de la costa de Chiapas. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1985.
- (33) Guzmán de Alba, R.: Conferencia en la Comercializadora Internacional Ganadera. *Infovet*, 4:12 (1995).
- (34) Hanks, J.: Hanks balanced salt solution and pH control. *Tissue Culture Association Manual*, 3:3 (1976).

- (35) Hardeng, F., Baalsrud, K.J., Overnes, G.: Controlling tick infestations and diseases in sheep by pour-on formulations of synthetic pyrethroids. A field study. *Vet. Res. Comm.*, 16: 429-436 (1992).
- (36) Hashemi-Feshank, R.: Ovine and caprine babesiosis in Iran: treatment with imidocarb. *Vet. Rec.*, 129:383-384 (1991).
- (37) Hernández-Ortiz, R., Alvarez-Martínez, J.A., Duening, G.M., Cantó-Alarcón, G.J., Monroy-Basilio, M., Ramos, A.J. y Vega y Murguía, C.A.: Differences in virulence and protection induction among isolates of *Babesia bigemina* derived from *in vitro* culture. *Téc. Pec. en Méx.*, 28(2): 51-61 (1990).
- (38) Holman, P.J., Chieves, L., Frerichs, W.M., Olson, D., and Wagner, G.G.: *Babesia equi* erythrocytic stage continuously cultured in an enriched medium. *J. of Par.*, 80:232-236 (1994).
- (39) Holman, P.J., Craig, T.M., Crider, D.L., Petrini, K.R., Rhyan, J., and Wagner, G.G.: Culture isolation and partial characterization of a *Babesia* sp. from a North American elk (*Cervus elaphus*). *J. of Wild. Dis.*, 30: 460-465 (1994).
- (40) Holman, P.J., Frerichs, W.M., Chieves, L., and Wagner, G.G.: Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *J. Clin. Microb.*, 31: 698-701 (1993).
- (41) Holman, P.J., Petrini, K., Rhyan, J., and Wagner, G.G.: *In vitro* isolation and cultivation of a *Babesia* from an American woodland caribou (*Rangifer tarandus caribou*). *J. of Wild. Dis.*, 30: 195-200 (1994).
- (42) Holman, P.J., Waldrup, K.A., and Wagner, G.G.: *In vitro* cultivation of a *Babesia* isolated from a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. of Par.*, 74: 111-115 (1988).
- (43) Holman, P.J., Waldrup, K.A., Droleskey, R.E., Corrier, D.E., and Wagner, G.G.: *In vitro* growth of *Babesia bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) erythrocytes. *J. of Par.*, 79:233-237 (1993).
- (44) Hotzel, I., Rhona, C.J., Julia T., Nara A.R., Farias, J.C.G. & Luiz S.O.: Extrachromosomal nucleic acids in bovine *Babesia*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 87 (Supl. III): 101-103 (1992).
- (45) Jackwood, M.W.: Biotechnology and the development of diagnostic tests in veterinary medicine. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 204: 1603-1605 (1994).
- (46) Jorgensen, W.K. and Waldron, S.J.: Use of *in vitro* culture to isolate *Babesia bovis* from *Theileria buffelii*, *Eperythrozoon wenyonii* and *Anaplasma* spp. *Vet. Par.*, 53: 45-51 (1994).

- (47) Jorgensen, W.K., Bock, R.E., Kingston, T.G., De Vos, A.J., and Waldron, S.J.: Assessment of tetracycline and *Babesia* culture supernatant as prophylactics for moderating reactions in cattle to live *Babesia* and *Anaplasma* vaccines. *Austr. Vet. J.*, 70:35-36 (1993).
- (48) Jorgensen, W.K., Waldron, S.J., McGrath, J., Roman, R.J., Vos, A.J. de, Williams, K.E., and De Vos, A.J.: Growth of *Babesia bigemina* parasites in suspension cultures for vaccine production. *Par. Res.*, 78: 423-426 (1992).
- (49) JRH Biosciences: Primary Response for Biotechnology Catalog and Handbook for the cell Culture Scientist. 1996.
- (50) Kawazu, S., Panchadcharam, Ch., Kawazu, T., Sekizaki, T., and Fujisaki, K.: Development of DNA probes for the detection and identification of *Babesia ovata*. *J. Protozool. Res.*, 3: 64-68 (1993).
- (51) Kerr, E.A. and Gero, A.M.: The toxicity of adenosine analogues against *Babesia bovis* *in vitro*. *Int. J. Par.*, 21: 747-751 (1991).
- (52) Lawrence, J.A., Malika, J., Whiteland, A.P., and Kafuwo, P.: Efficacy of an Australian *Babesia bovis* vaccine strain in Malasia. *Vet. Par.*, 132:295-296 (1993).
- (53) Madruga, C.R., Suarez, C.E., Mcelwain, T.F., and Palmer, G.H.: Conservation of merozoite membrane and apical complex B cell epitopes among *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* strains isolated in Brazil. *Vet. Par.*, 61:21-30 (1996).
- (54) Mahoney, D.F.: The development of control methods for tick fevers of cattle in Australia. *Austr. Vet. Jour.*, 71 (9): 283-289 (1994).
- (55) Mangold, A.J., Aguirre, D.H., Cafrune, M.N., de Echaide, S.T., and Guglielmo, A.A.: Evaluation of the infectivity of a vaccinal and a pathogenic *Babesia bovis* strain from Argentina to *Boophilus microplus*. *Vet. Par.*, 51: 143-148 (1993).
- (56) Mangold, A.J., Aguirre, D.H., Gaido, A.B., and Guglielmo, A.A.: Seasonal variation of ticks (Ixodidae) in *Bos taurus* x *Bos indicus* cattle under rotational grazing in forested and deforested habitats in northwestern Argentina. *Vet. Par.*, 54: 389-395 (1994).
- (57) Mangold, A.J., Vanzini, V.R., Echaide, I.E., Deechaide, S.T., Volpogni, M.M., and Guglielmo, A.A.: Viability after thawing and dilution of simultaneously cryopreserved vaccinal *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* strains cultured *in vitro*. *Vet. Par.*, 61:121-129 (1995).
- (58) Mattia, R.A., Waldron, M.A., and Sierra, L.S.: Use of the quantitative buffy coat system for detection of parasitemia in patients with babesiosis. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 2816-2818 (1993).

- (59) Mishra, A.K., Clabaough, G., Kakoma, I, and Ristic, M.: Goat serum, a substitute of bovine serum in cultivation of *Babesia bovis*. *Acta Vet. Hung.*, 39:25-28 (1991).
- (60) Mishra, A.K., Clabaugh, G., and Kakoma, I.: Human serum for *in vitro* cultivation of *Babesia bovis*. *Vet. Par.*, 45:153-156 (1992).
- (61) Monroy, A.V.: Respuesta serológica de bovinos a *Babesia argentina* cultivada *in vitro*. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1978.
- (62) Monroy, B.M.: Establecimiento en México del cultivo *in vitro* de *Babesia bigemina*. Tesis de licenciatura. *Fac. Est. Sup.-Cuautitlán.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1987.
- (63) Montenegro-James, S.: Prevalence and control of babesiosis in the Americas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil 87 (Suppl. III): 27-36 (1992).
- (64) Montenegro-James, S., Toro, M., Leon, E., and Guillen, A.T.: Field evaluation of an exoantigen-containing *Babesia* vaccine in Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil 87 (Suppl. III): 283-288 (1992).
- (65) Morgan, J.F., Morton, H.J., and Parker, R.C.: The nutrition of animal cells in tissue culture I. Initial Studies on a Synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 73:1-8 (1950).
- (66) Morilla, G.A.: Inmunología de la babesiosis bovina. Curso de Actualización. Enfermedades Parasitarias del Ganado Bovino. México, 1978.
- (67) Morzaria, S., Katende, J., Kairo, A., Nene, V. and Musoke, A.: New Methods for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil 87(Suppl. III): 201-205 (1992).
- (68) My, H.H., Holman, J.P., Waghela, S., Cruz, D., and Wagner, G.G.: Cryopreservation of *Babesia bovis* by Palmer's Method. Proceedings of the Student Research Conference. College of Veterinary Medicine. 1996. p 28 *Texas A&M University.* College Station (1996).
- (69) Nguyen, N.P., Holman, J.P., Waghela, S., Cruz, D., and Wagner, G.G.: Cryopreservation of *Babesia bovis* in glycerol as cryoprotectant. Proceedings of the Student Research Conference. College of Veterinary Medicine. 1996. p 34 *Texas A&M University.* College Station (1996).

- (70) Nguyen, P.C., Holman, J.P., Waghela, S., Cruz, D., and Wagner, G.G.: Cryopreservation of *Babesia bovis* by Crowe's Method. Proceedings of the Student Research Conference. College of Veterinary Medicine. 1996. p 32 *Texas A&M University*. College Station (1996).
- (71) Nutt, S.E. and Bagnara, A.S.: The toxicity of antifolates in *Babesia bovis*. *Int. J. Par.*, 23:399-402 (1993).
- (72) Opdebeeck, J.P., Wong, J.Y., Jackson, L.A., and Dobson, C.: Vaccines to protect Hereford cattle against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Immunology*, 63: 363-367 (1985).
- (73) Parker, R.J., Shepherd, R.K., Trueman, K.F., Jones, G.W., Kent, A.S., and Polkinghorne, I.G.: Susceptibility of *Bos indicus* and *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. *Vet. Par.*, 17:205-214 (1985).
- (74) Patarroyo, J.H., Prates, A.A., Tavares, C.A., Mafra, C.L., and Vargas, M.I.: Exoantigens of an attenuated strain of *Babesia bovis* used as a vaccine against bovine babesiosis. *Vet. Par.*, 59: 189-199 (1995).
- (75) Paz, de V.O.: Comparación entre la prueba de inmunofluorescencia indirecta y contrainmunolectroforesis para el diagnóstico de la babesiosis bovina. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1983.
- (76) Pipano, E.: Live vaccines against hemoparasitic diseases in livestock. *Vet. Par.*, 57: 213-231 (1995).
- (77) Quiroz, R.H.: Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. *Edit. Limusa México*, 1986.
- (78) Ramsey, W.S., Hertl, W., Nowlan, E.D., Binkowski, N.J.: Surface Treatments and Cell Attachment. *In Vitro*, 20: 802-808 (1984).
- (79) Reiter, I. and Weiland, G.: Recently developed methods for the detection of babesial infections [Review]. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*. 83 (Suppl.): 21-23 (1989).
- (80) Rodríguez, C.S., Aboytes, R., Figueroa, J.V., and Vega y Murguía, C.: Bovine babesiosis: a review of recent advances. *Arch. Med. Res.*, 25: 241-245 (1994).
- (81) Rodríguez, C.S., Buening, G., Green, T.J., and Carson, C.A.: Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Inf. and Imm.*, 42(1): 15-18 (1983).
- (82) Rodríguez, C.S., Vega y Murguía, C.A., Aboytes, T.R.: Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis. [Review]. *Arch. of Med. Res.*, 25: 247-252 (1994).

- (83) Rodríguez, R.I. and Trees, A.J.: *In vitro* responsiveness of *Babesia bovis* to imidocarb dipropionate and the selection of a drug-adapted line *Vet. Par.*, 62: 35-41 (1996).
- (84) Salas, T.E.: Comportamiento *in vivo* de una cepa atenuada de *Babesia bovis* obtenida de cultivo *in vitro*. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1986.
- (85) Schattschneider, W., Lopes, E.R., De Alencar, J.E., Bienzle, U., and Feldmeier, H.: A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas' disease in Brazilian patients. *Trop. and Geog. Med.*, 44: 210-218 (1992).
- (86) Shompole, S., Perryman, L.E., Rurangirwa, F.R., McElwain, T.F., Jasmier, D.P., Musoke, A.J., Wells, C.W., and McGuire, T.C.: Monoclonal antibody to a conserved epitope on proteins encoded by *Babesia bigemina* and present on the surface of intact infected erythrocytes. *Inf. and Imm.*, 63: 3507-3513 (1995).
- (87) Sigma Biosciences Cell Culture Catalogue and Price List, 1996.
- (88) Solís, S.S.: Epidemiología de garrapatas *Boophilus* y *Amblyomma* en México. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal: Garrapatas y enfermedades que transmiten. Sede Centro Vacacional I.M.S.S. Oaxtepec, Morelos 9-11 octubre 1991. 19-27 *División de Educación Continua*. México (1991).
- (89) Soulsby, E.J.L.: Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis. Vol. III. *CRC Press Inc.* Florida, 1987.
- (90) Spickett, A.M.: Tick Ecology. *Int. J. Par.*, 24: 845-849 (1994).
- (91) Stafford, K.C.: Reduced abundance of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with exclusion of deer by electric fencing. *J. Med. Entom.*, 30:986-996 (1993).
- (92) Thomford, J.W., Conrad, P.A., Boyce, W.M., Holman, P.J., and Jessup, D.A.: Isolation and *in vitro* cultivation of *Babesia* parasites from free-ranging desert bighorn sheep (*Ovis canadensis nelsoni*) and mule deer (*Odocoileus hemionus*) in California. *J. of Par.*, 79: 77-84 (1993).
- (93) Tinims, P. and Stewart, N.P.: Growth of *Babesia bovis* parasites in stationary and suspension cultures and their use in experimental vaccination of cattle. *Res. in Vet. Sci.*, 47: 309-314 (1989).
- (94) Vega y Murguía, C.A., Buening, G.M., Green, T.J., and Carson, C.A.: *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am. Jour. of Vet. Res.*, 46: 416-420 (1985).

- (95) Vega y Murguía, C.A., Buening, G.M., Rodríguez, S.D., and Andrew, C.C.: Concentration and enzyme content of *in vitro*-cultured *Babesia bigemina* - infected erythrocytes. *J. Protozool.*, 33(4): 514-518 (1986).
- (96) Vega y Murguía, C.A., Buening, G.M., Rodríguez, S.D., and Carson, C.A.: Cloning of *in vitro* propagated *Babesia bigemina*. *Vet. Par.*, 22: 223-233 (1986).
- (97) Vega y Murguía, C.A., Buening, G.M., Rodríguez, S.D., and Carson, C.A.: Cryopreservation of *Babesia bigemina* for *in vitro* cultivation. *Am. J. of Vet. Res.*, 46 :421-423 (1985).
- (98) Vidotto, O., McElwain, T.F., Machado, R.Z., Perryman, L.E., Suarez, C.E., and Palmer, G.H.: *Babesia bigemina* - identification of B cel epitopes associated with parasitized erythrocytes. *Exp. Par.*, 81:491-500 (1995).
- (99) Wagner, G.G. and Melendy, D.R.: IFA Test for *Babesia* spp. College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station.
- (100) Willadsen, P., Kemp, D.H., Cobon, G.S., and Wright, I.G.: Successful vaccination against *Boophilus microplus* and *Babesia bovis* using recombinant antigens. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil 87 (Suppl. III): 289-294 (1992).
- (101) Wright, I.G. *et al.*: The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Vet. Par.*, 44: 3-13 (1992).
- (102) Zarlenga, S.D.: Advances in parasite control through biotechnology. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 204: 1616-1621 (1994).

Cuadro 1

Estimación de pérdidas económicas relacionadas con
anaplasmosis y babesiosis en América (63)

Pais/Región	Ganado (millones de cabezas)	Estatus endémico del patógeno	Costo total (millones USD/año)	Costo promedio anual en USD	Referencia
México	35.0	endémico/no endémico	287	8.2	Masiga, 1981
Colombia	27.1	endémico/no endémico			
Brasil	122.6	endémico/no endémico			
Argentina (Norte)	22.0	endémico/no endémico	120		Guglielmo <i>et al.</i> , 1990
Venezuela	10.0	endémico/no endémico	23.3*		FONAIAP-MAC 1985
América Central	58.0	endémico/no endémico	850	3.12	PAHO, 1976
Sudamérica	215.6	endémico/no endémico	1365-1638	5.6	FAO, 1989

a. Mortalidad solamente

Cuadro 2

MODIFICACIONES EN EL SISTEMA DE FASE MICROAEROFÍLICA ESTACIONARIA (80)

PARÁMETRO	ERP <i>et al</i> 1980	Levy y Ristic 1980	Palmer 1981	Rodríguez <i>et al</i> 1983
Volumen del paquete celular	40%	10%	10%	2.5%
Buffer	HEPES ^a 25 mM	HEPES 25 mM	TES ^b 30 mM	TES 30 mM
Atmósfera	5%CO ₂ /95% aire	5%CO ₂ /95% aire	5%CO ₂ /95% aire	2%O ₂ , 5%CO ₂ , 93%N
Nivel de fluidos	100 ml			
Suspensión	6.2 mm	6.2 mm	4 mm	
Suero	50%	40%	40%	40%
Parasitemia inicial	1 a 5 %	0.5%	0.5%	Un eritrocito infectado
PEP ^c	5%	10%	15%	15%

^a N-2 Hidroxiethylpiperazina-N'-2 ácido etanesulfónico

^b N-tris[hidroximetil] metil-2-ácido aminoetanesulfónico

^c Porcentaje de eritrocitos parasitados

Cuadro 3

Fórmula del Medio 199 con EBSS (JRH Biosciences, Cat. No. 51- 31178) (49)

COMPONENTES		mg/litro
SALES INORGANICAS		
Cloruro de calcio		200.00
Nitrato férrico		0.72
Cloruro de potasio		400.00
Sulfato anhídrido de magnesio		97.67
Cloruro de sodio		6800.00
Bicarbonato de sodio		2200.00
Fosfato monobásico de sodio		140.00
OTROS COMPONENTES		
Sulfato de adenina		10.00
Trifosfato de adenosina		1.00
Monofosfato de adenosina		0.20
Colesterol		0.20
Deoxiribosa		0.50
Glucosa		1000.00
Glutación reducido		0.05
Guanina • HCl		0.30
Hipoxantina de sodio		0.354
Rojo de fenol		20.00
Ribosa		0.50
Acetato de sodio		50.00
Timina		0.30
TWEEN 80®		20.00
Uracilo		0.30
Xantina de sodio		0.344

Cuadro 3 (Continuación)

COMPONENTES	mg/litro
AMINOACIDOS	
DL-Alanina	50.00
L-Arguina • HCl	70.00
DL-Acido aspártico	60.00
L-cistina • HCL • H ₂ O	0.11
L-Cistina • 2HCl	26.00
DL-Acido glutámico • H ₂ O	150.00
L-Glutamina	100.00
Glicina	50.00
L-Histidina • HCl • H ₂ O	21.88
L-Hydroxyprolina	10.00
DL-Isoleucina	40.00
DL-Leucina	120.00
L-Lysina • HCl	70.00
DL-Metionina	30.00
DL-Fenilalanina	50.00
L-Prolina	40.00
DL-Serina	50.00
DL-Treonina	60.00
DL-Triptofano	20.00
L-Tyrosina 2Na • 2H ₂ O	57.66
DL-Valina	50.00

Cuadro 3 (Continuación)

COMPONENTES	mg/litro
VITAMINAS	
Acido ascórbico	0.05
DL- α -Fosfato de tocoferol 2Na	0.01
d-Biotina	0.01
Calciferol	0.10
D-Pantotenato de calcio	0.01
Cloruro de colina	0.50
Acido fólico	0.01
ino-inositol	0.05
Menadiona	0.01
Niacina	0.025
Niacinamida	0.025
PABA	0.05
Piridoxal • HCl	0.025
Piridoxina • HCl	0.025
Riboflavina	0.01
Tiamina • HCl	0.01
Acetato de vitamina A	0.14

Cuadro 4

Solución Salina Balanceada de Earle (87)

	mg / l	mM
<i>Salina base</i>		
NaCl	6800	117.2
KCl	400	5.4
CaCl ₂	200	1.8
MgSO ₄	96	0.4
NaHCO ₃	108	0.9
NaH ₂ PO ₄	2200	24.12
<i>Otros componentes</i>		
Glucosa	1000	5.54
Insulina	10	0.015

Cuadro 5

Antibióticos y Antimicóticos (49)

Producto	Concentración	GRAM +	GRAM-	Levaduras	Moho	Mycoplasma	Conc. efectiva	Conc. citotóxica	Cantidad a usar	Estable a 37°C
Fungizona	250 µg/ml			✓	✓		2.5 µg/ml	30 µg/ml	10 ml/l	3 días
Antibióco-Antimicótico	10000U/ml Penicilina 10 mg/ml Estreptomc 25 µg/ml Antitercina	✓	✓	✓	✓		100- 200U/ml 100 µg/ml 2.5 µg/ml	10000U/ml 20000µg/ ml 30 µg/ml	10 ml/l	3 días
Gentamicina	10 mg/ml	✓	✓			✓	50 µg/ml	>300 µg/ml	5 ml/l	5 días
Penicilina-Estreptomc-ina	10000U/ml P 10 mg/ml S	✓	✓				100- 200U/ml 100 µg/ml	10000U/ml 20000µg/ ml	20 ml/l	3 días

Cuadro 6
Procedimientos realizados en el Cultivo

	<i>Babesia bigemina</i> Pase Alto (en el día:)	<i>Babesia bigemina</i> Pase Bajo (en el día:)	<i>Babesia bovis</i> (en el día:)
Subcultivo	8,12,18,21,27,31,34, 37,40,42	8,13,17,21,26,30,34, 37,39,44	6,9,12,15,17,20,23, 26,31,33,37,39,42, 44
Resuspensión en el pozo	15,24	15,25,32,41	4,18,29,35
Adición de eritrocitos frescos	28	28	28
Cambio del M-199/IBSS a M-199/EBSS	29	29	29

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Cuadro 7
Análisis Estadístico del Porcentaje de Eritrocitos Parasitados al utilizar dos tipos de sales balanceadas incluidas en el Medio-199

	<i>Babesia bigemina</i> Pase Alto		<i>Babesia bigemina</i> Pase Bajo		<i>Babesia bovis</i>	
	Días 1-29	Días 30-45	Días 1-29	Días 30-45	Días 1-29	Días 30-45
No. muestras	29	16	29	16	29	16
Promedio	0.399	2.0116	0.3149	1.3862	6.159103	8.648563
Desviación Estándar	0.4719	0.751	0.3662	0.59697	3.520983	0.50892
Error estándar	0.01752	0.1877	0.068	0.1492	0.65383	0.12723
Estadístico t	-8.857		-7.478		-2.7979	

Cuadro 8
Comparación entre los promedios obtenidos al utilizar dos soluciones salinas balanceadas distintas en el Medio-199

	M-199/HBSS	M-199/EBSS	Diferencia Estadística
<i>Babesia bigemina</i> Pase Alto	0.399	2.0116	$P = 0.00000001$ ($P < 0.05$)
<i>Babesia bigemina</i> Pase Bajo	0.3149	1.3862	$P = 0.00000001$ ($P < 0.05$)
<i>Babesia bovis</i>	6.159103	8.648563	$P = 0.00766$ ($P < 0.05$)

Figura 1

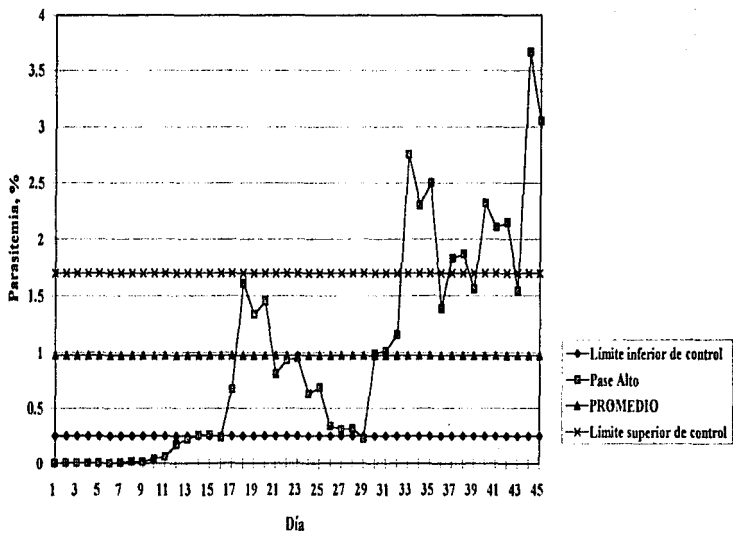


Gráfico de control para observaciones individuales de parasitemia inducida por *Babesia bigemina*, pase alto

Figura 2

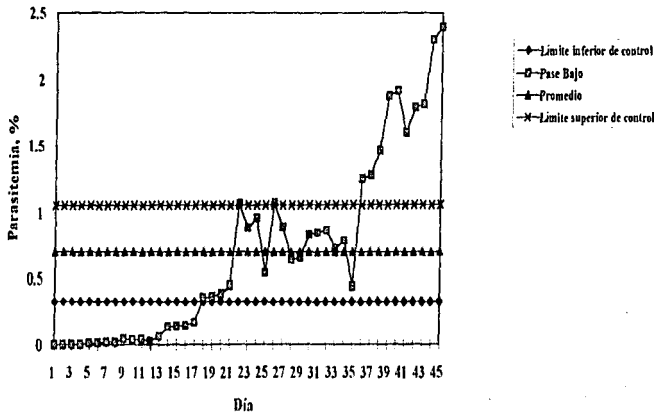


Gráfico de control para observaciones individuales de parasitemia inducida por *Babesia bigemina*, pase bajo.

Figura 3

Crecimiento de *Babesia bigemina*

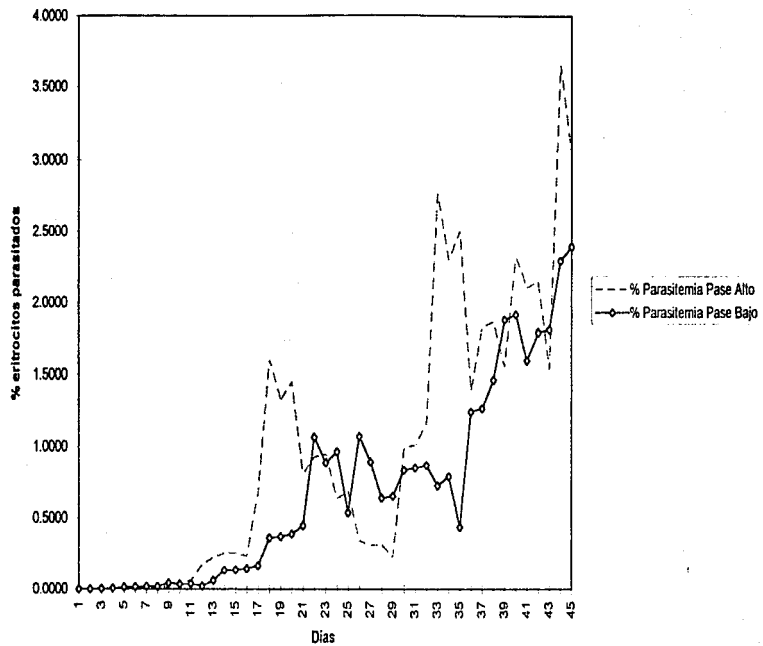


Figura 4

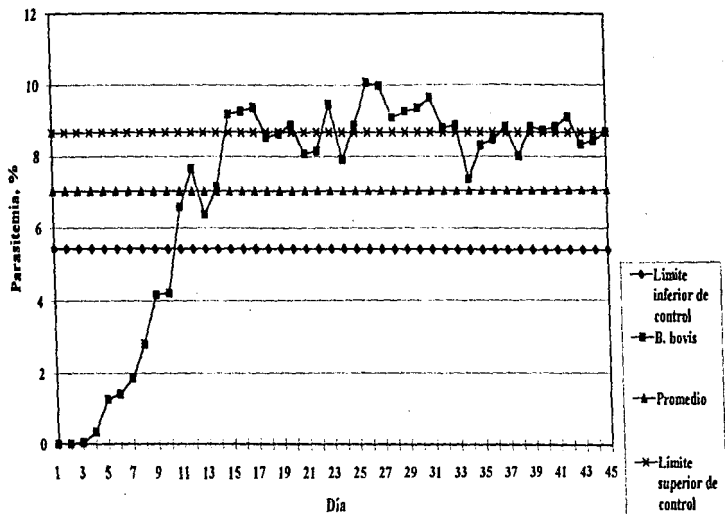


Gráfico de control para observaciones individuales de parasitemia inducida por *Babesia bovis*.

Figura 5

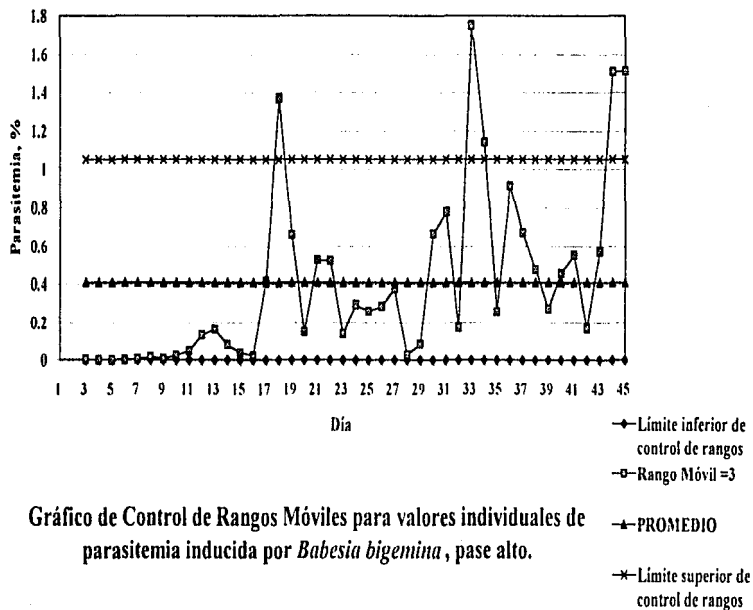


Gráfico de Control de Rangos Móviles para valores individuales de parasitemia inducida por *Babesia bigemina*, pase alto.

Figura 6

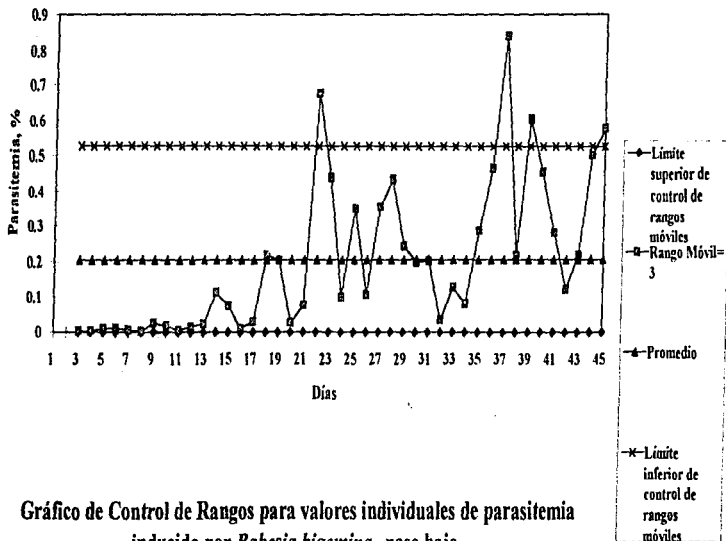


Gráfico de Control de Rangos para valores individuales de parasitemia inducida por *Babesia bigemina*, fase bajo.

Figura 7

