UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMPORTAMIENTO *in vivo* DE UNA CEPA ATENUADA DE *Babesia bovis* OBTENIDA DE CULTIVO *in vitro*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

ENRIQUE SALAS TELLEZ

MEXICO, D. F. 1986

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

COMPORTAMIENTO *in vivo* DE UNA CEPA ATENUADA DE *Babesia bovis* OBTENIDA DE CULTIVO *in vitro* .

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 titulo de

Médico Veterinario Zootecnista

por

ENRIQUE SALAS TELLEZ

Asesores :

M.V.Z.Ph.D. Carlos Agustín Vega y Murguía

M.V.Z. Juan García García

México,D.F.

1986

D E D I C A T O R I A

A mis padres: Carmelita y Sergio por su amor y apoyo constantes.

A Héctor y Fabi por la suerte de tenerlos como hermanos

A Lulú

A mis amigos

A ADRIANA :

por TODO.

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco en todo lo que vale, la infinita ayuda y apoyo brindado para la elaboración y terminación del presente trabajo de tesis a :

Héctor Sergio Salas Téllez

Adriana Palomino Ríos

Lourdes Santiago de Salas

Juan García García

Carlos A. Vega y M.

Antonio Alvarez Martinez

Jorge Germinal Cantó Alarcón

Juan Alberto Ramos Aragón

Y en general a todos los hemoparásitologos.

C O N T E N I D O Página

RESUMEN..... 1

INTRODUCCION..... 2

MATERIAL Y METODOS..... 14

RESULTADOS Y DISCUSION..... 19

CONCLUSIONES..... 27

BIBLIOGRAFIA..... 28

CUADROS..... 42

GRAFICAS..... 44

R E S U M E N

SALAS TELLEZ , ENRIQUE. Comportamiento in vivo de una cepa atenuada de Babesia bovis obtenida de cultivo in vitro (bajo la dirección del M.V.Z.PhD. Carlos Agustín Vega y Murguía y del M.V.Z. Juan García García).

El objetivo del presente estudio fue observar los cambios en la hematología así como en la respuesta de anticuerpos en bovinos inoculados experimentalmente con una clona irradiada de B. bovis mantenida en cultivo in vitro. Se utilizaron 11 animales bovinos de aproximadamente 18 meses de edad, clínicamente sanos y que resultaron negativos por la prueba de Inmunofluorescencia indirecta(IFI) a anticuerpos en contra de Babesia spp. así como negativos también por la prueba de FC a anticuerpos en contra de Anaplasma marginale. El primoinóculo se dividió al azar en 4 grupos de 2 animales cada uno. Los animales desafiados fueron inoculados por vía endovenosa (EV), intramuscular (IM) y subcutanea (SC) con una dosis de $1x10^8$ eritrocitos infectados, así como $1x10^8$ eritrocitos normales por vía IM a los animales Testigo (T). Fueron medidas las siguientes variables: Temperatura por vía rectal, concentración de eritrocitos, leucocitos, plaquetas y hemoglobina; porcentaje de hematocrito, titulo de anticuerpos por el método de IFI y parasitemia por frotis sanguíneo. El tiempo de aparición de la fiebre así como los cambios en la hematología dependieron de la vía de inoculación utilizada, iniciándose más temprano en aquéllos inoculados por la vía EV siguiéndole los de la vía IM y por último los del inóculo SC. El tratamiento EV obtuvo una temperatura máxima en el día 7 con 40.8 C, siendo este grupo el que presentó el cambio más drástico; en las variables hemáticas medidas los cambios fueron poco significativos aun cuando fueron más marcados en el EV. Se estimó la parasitemia por frotis sanguíneo, habiendo sido negativa a los 42 días, tiempo que duro el experimento, por lo que se determinó realizar un pase tanto a animales experimentales como al cultivo in vitro y en ambos casos se demostró la presencia y viabilidad del protozoario. De los anticuerpos detectados tanto del primoinóculo como de los pases se desconoce la capacidad protectora de los mismos. La clona irradiada de B. bovis mantenida en cultivo in vitro produce alteraciones hemáticas leves que no ponen en riesgo la sobrevivencia del animal. En el inóculo no se demostró parasitemia en frotis sanguíneo lo que no es indicativo de ausencia del parásito, hecho que se demuestra en los pases efectuados en donde se confirmó la presencia y viabilidad del protozoario. En los tratamientos utilizados resultó ser que la vía IM es la mejor debido a su respuesta de anticuerpos aunada a que produjo alteraciones poco significativas en la temperatura rectal y la hematología, lo que podría hacerla una vía óptima de inmunización.

I N T R O D U C C I O N

La Babesiasis es una enfermedad parasitaria que afecta en forma natural a bovinos, ovinos, caninos, suinos y al hombre. En los bovinos permanece como una causa significativa de mortalidad ocasionando pérdidas económicas en la industria ganadera del mundo (50).

La enfermedad es producida por protozoarios del género **Babesia**, el cual es un parásito intraeritrocítico que produce una infección aguda y con frecuencia mortal en el ganado bovino y se presenta donde quiera que estén establecidos los vectores que son garrapatas principalmente del género Boophilus(50).

Babes en 1888 (1) describió por primera vez a la babesiosis bovina causada por **Babesia bovis** y Smith y Kilborne en 1893 (75) mencionaron a la **Babesia bigemina**, siendo ellos quienes demostraron la primera enfermedad transmitida por un vector artrópodo. Ligniere's en 1903 (38) describió a la **Babesia argentina** la que posteriormente se clasificaría como **Babesia bovis** (29). Riek en 1968 (59) cita a cuatro especies de **Babesia** que afectan al ganado bovino: **B. bigemina**, **B. bovis** (sin. **B. argentina**, **B. berbera**, **B. colchica**), **B. divergens** (sin. **B. caucasica**, **B. occidentalis**, **B. karelica**) y **B. major**; sin embargo Purnell en 1981 (57) considera en Rusia a la **B. jakimovi** y Fujinaga y col.(17) a la **B. ovata** como agente causal de la babesiosis bovina en Japón. En México el parásito es descrito por Tussaint en 1905 (55).

Se menciona como únicos agentes causales de la Babesiosis bovina en México a la **Babesia bigemina** y **Babesia bovis** (58).

La transmisión biológica en el caso de **Babesia bigemina** y **Babesia bovis** es, principalmente, efectuada por las garrapatas **Boophilus microplus** y **Boophilus annulatus**. En el caso de **Babesia major** hay discrepancia en cuanto al vector biológico y en el caso de **Babesia divergens** es **Ixodes ricinus** y **Hemaphysalis cinnbori** (55).

B. divergens y **B. major** se hallan distribuidas en zonas templadas incluyendo Europa, Norte de Africa y partes de la U.R.S.S.(23). Así como **B. bovis** está presente en extensas áreas de Africa, Sur y Centro América, Asia, Australia y muchas islas tropicales o semitropicales en donde el ganado está confinado (34).

La Babesiosis ha recibido distintas sinonimias, algunas de ellas son: "Fiebre de Texas", "Fiebre de la garrapata", "Aguas rojas" y la más común, "Piroplasmosis" (50).

En la fisiopatologia de la Babesiosis bovina y en especial la causada por **Babesia bovis**, se produce un síndrome en el que se han identificado dos etapas primordiales. La primera puede tener un curso benigno con una recuperación inmediata o bien, puede progresar a una segunda etapa y producir un detrimento en la salud del animal en donde la muerte es el resultado final (36).

En los casos fatales con infecciones de **Babesia** del tipo hemolítico (**B. bigemina**, **B. divergens**, **B. major**) se señala que la anemia es la causa fundamental de la muerte; sin embargo se ha

encontrado que los animales pueden morir sin detectarse en estos alteraciones significativas en el hematocrito (31,63). La anoxia es el factor más importante en el caso de las infecciones con **B. gibsoni** en perros. La anoxia fue identificada como una disminución en la capacidad de transportar oxígeno de los eritrocitos aunado a una reducción en el número de éstos(25).

En las infecciones con **B. bovis**, los bovinos afectados pueden presentar varios cuadros clínicos severos, en donde algunos animales sobreviven y otros mueren con signos de encefalopatía(36). En 1977 se dio un nuevo enfoque a la comprensión de los aspectos patogénicos de este síndrome con el descubrimiento de enzimas proteolíticas de origen parasitario. El shock hipotensivo es un componente de la Babesiosis aguda y al parecer está generado por complejos proteicos circulantes(83). Se han aislado proteinas parecidas al fibrinógeno en ganado infectado con **Babesia bovis** (21).

Se identificó el fenómeno de Coagulación Intravascular Diseminada (CID) en infecciones por **Babesia** spp.(12); sin embargo en estudios recientes no se encontró evidencia de CID en becerros esplenectomizados e inoculados con cepas virulenta y atenuada de **B. bovis**(36).

Los transtornos hematológicos se cree que son debidos a la acción de una proteasa liberada por los hemoparásitos (20), lográndose el aislamiento y purificación de una esterasa (82).

Las alteraciones renales pueden ser originadas por cambios en la estructura filtrante del riñón, algunas alteraciones son el resultado de reacciones inmunológicas. Han sido observadas la congestión vascular, hemorragias y agregación de eritrocitos parasitados en los capilares glomerulares (36).

Se considera que la uremia no puede ser incriminada como la causante de la muerte (66);sin embargo, en estudios posteriores trabajando con **B. bovis** se encontraron severas alteraciones en el metabolismo renal, aunadas a daños hepáticos y del sistema nervioso central(35). Un reporte en el que se trabajó con cepas virulentas y atenuadas de **B. bovis** demuestra que las últimas no provocan alteraciones del metabolismo renal, demostrándose así la posible importancia de la uremia y las alteraciones tisulares renales en la infección de **B. bovis** (36).

En otro estudio (84) trabajando con **B. bovis** atenuada por irradiación, se observó que los animales inoculados no mostraban cambios fisiológicos marcados.

Diversos factores como la especificidad del huésped, constitución genética, edad y otras condiciones desconocidas han sido designadas como de importancia en la resistencia natural no específica contra la Babesiosis (7).

INMUNOLOGIA :

El ganado que se ha recuperado de la babesiosis es inmune. La explicación esta dada por dos hipótesis: 1) el parásito permanece en cantidades reducidas dentro del huésped y

provee una estimulación antigénica continua. Este estado es referido como preinmunidad, inmunidad co-infección o infección latente y este tipo de tratamiento ha sido utilizado por muchos años. 2) El parásito es eliminado pero existe un estado inmune. Este estado es referido como una inmunidad estéril. En ambos casos los animales son capaces de sobrevivir a infecciones de desafio por parásitos **Babesia** (80).

a) Antígenos:

Se ha reportado (41) que al menos dos antígenos precipitantes de **B. bovis** se encuentran en el plasma de animales con infección aguda. Estudios posteriores (19,39) indican que los antígenos solubles que no presentan reacción cruzada con anticuerpos contra las diferentes especies de Babesia están principalmente asociados con la superficie interna de la membrana de eritrocitos infectados. Estos antígenos son distintos de los antígenos solubles que se obtienen por lisis de eritrocitos infectados (18). Los antígenos específicos de cepa y variante, que se cree están en la superficie externa de los eritrocitos infectados por **B. bovis** intactos pueden diferir de aquéllos de la superficie interna de las membranas del glóbulo rojo (10,11).

Se aislaron los antígenos corpusculares (merozoítos) y soluble de **B. bovis** a partir de cultivos con agitación constante empleando centrifugación diferencial y en gradiente de densidad con Ficoll(29). Sin embargo las preparaciones de merozoítos no

fueron totalmente libres de células. Posteriormente se lograron aislar merozoítos libres de células a partir de cultivos estacionarios microaerofílicos (61).

A partir de una serie de estudios enfocados al aislamiento y caracterización de antígenos solubles de **B. bovis** presentes en el sobrenadante del cultivo estacionario microaereofílico, se encontró que el purificado contiene un 88% de proteína y 6% de carbohidratos. Los resultados de experimentos preliminares con isoelectroenfoque sugieren que esta preparación está parcialmente pura y que por lo menos se encuentran presentes tres antígenos parasitarios cuyo rango de enfoque (pH 4-6) indica su naturaleza glucoproteica (53).

En 1983 se demostró la presencia de por lo menos cuatro antígenos de **Babesia** localizados no sólo en el parásito sino también en la matriz interna del eritrocito infectado por el método de inmunofluorescencia indirecta en frotis de sangre infectada con **Babesia bovis** (22).

b) Respuesta Inmune humoral y celular :

Se ha demostrado que los anticuerpos contra **B. bovis** son cepa-específicos (43,47). Otros autores (26) demostraron la especificidad de cepa de los anticuerpos contra **Babesia** de bovino. En la misma forma se ha observado que el calostro de vacas inmunes protege a la cría sólo contra la cepa de **B. bigemina** que haya sido usada para inmunizar a las madres. Las fracciones IgG1 e IgG2 fueron protectoras en la babesiosis bovina (47).

Los estudios in vitro apoyan la evidencia de un papel efector de los anticuerpos en la respuesta inmune. Así, la adición de suero aumentó la fagocitosis de **B. rodhaini** por los macrófagos peritoneales (67) y de **B. gibsoni** por monocitos (30).

Diversos autores reportan la participación de la fagocitosis en esta enfermedad (44), habiendo evidencia de que el proceso es precedido por la opsonización. Los estudios in vitro apoyan el papel de las opsoninas (67).

Los estudios sobre la transferencia de la inmunidad de **B. rodhaini** realizados con inyecciones de suspensiones de bazo (62) sugieren la participación de las células T. Asimismo se demostró la hipersensibilidad retardada al inyectar antígeno de **Babesia equi** intradérmicamente (70).

c) Inmunología Diagnóstica :

El diagnóstico de la babesiosis se ha hecho empleando dos métodos :

a) identificación directa de los parásitos por examen microscópico;

b) deteccion indirecta de la infección latente por pruebas serológicas.

Resulta importante señalar que la identificación del parásito en frotis es la demostración real de la infección. Sin embargo, un examen microscópico negativo no excluye la posibilidad de la infección, pues en las etapas tempranas o

crónicas de la enfermedad no es común detectarlo. De aquí el creciente interés en el desarrollo de la inmunología diagnóstica de **Babesia**.

Las pruebas serológicas que se han desarrollado son Fijación del complemento (FC), pruebas de anticuerpos fluorescentes, precipitación en gel, aglutinación (en capilar, placa y tarjeta) y ELISA.

La prueba de Fijación del complemento se ha utilizado como diagnóstico de la babesiosis(28). En esta prueba se detectan anticuerpos fijadores del complemento producidos durante el curso de la infección por **Babesia**; sin embargo, los resultados presentan variacion de acuerdo a los antígenos utilizados. El antígeno tiene componentes de origen parasitario y eritrocítico. Al comparar con otras pruebas serológicas se observa que tiene una sensibilidad muy baja, aunque detecta de manera confiable anticuerpos contra **B. bovis** durante 7 meses y contra **B. bigemina** durante 4 meses después de la infección (46). Se ha señalado que la presencia de anticuerpos fijadores de complemento calostrales puede ser causa de error en esta prueba debido a que éstos son detectables hasta 2 o 3 semanas después del nacimiento (40).

Se ha reportado que las pruebas de anticuerpos fluorescentes son más sensibles que la de Fijación del complemento. En estas se utilizan los parásitos intraeritrocíticos completos como antígeno. En particular, la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) ha sido usada en

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
BIBLIOTECA - UNAM

Gran Bretaña para determinar la incidencia de **B. divergens** y la relación antigénica entre **B. bigemina**, **B. bovis**, **B. major** y **B. divergens** (79).

Los estudios enfocados a evaluar esta prueba con FC indican que ambas pruebas diferencian las infecciones por **B. bovis** y **B. bigemina**, detectándose por IFI anticuerpos contra **Babesia bovis** dos semanas más tempranamente que con FC y anticuerpos contra **B. bigemina** 1.5 semanas antes que con FC (78). En un ensayo posterior se encontró que ambas pruebas detectan anticuerpos específicos durante los primeros 84 días de la infección con **B. bigemina**, observando que después de 98 días la regresión de IFI alcanzaba una meseta mientras los títulos de FC disminuían. Las limitaciones de esta prueba se derivan de la naturaleza subjetiva de su interpretación y de la carencia de especificidad debida a la reacción de antigenos extraños cuando se utiliza el parásito completo. Finalmente la transferencia de anticuerpos calostrales que reaccionan en esta prueba durante 4 o 5 meses impide su uso en la estimación de la tasa de infección en bovinos jóvenes (33).

Por otra parte, se ha descrito la reacción de aglutinación como un medio sensible de detección de anticuerpos a **Babesia**. La prueba de hemaglutinación indirecta usando eritrocitos tanizados o formalinizados recubiertos con antígenos solubles de **Babesia** rindió buenos resultados aunque se observaron reacciones no específicas. Se ha sugerido que continúe la investigación sobre modificaciones de la reacción de aglutinación como herramientas en el diagnóstico de **Babesia** (79).

La caracterización de antígenos de **Babesia** ha sido abordado con éxito por medio de la prueba de precipitación en gel aunque no se ha demostrado su aplicación práctica (79).

Por último, los resultados preliminares de la evaluación de la prueba de ELISA han mostrado que es más sensible que la de FC y más especifica que IFI (79).

AGENTES INMUNIZANTES :

La resistencia a la reinfección por **Babesia spp.** fue reconocida en el siglo pasado (1,75). La premunización fue practicada cuando era inoculado el ganado susceptible con sangre de animales portadores infectados (8). La eficacia de la profilaxis por este procedimiento previno de manera sustancial las ulteriores pérdidas económicas causadas por la muerte de los animales (54,77).

Durante los últimos años se han creado métodos alternativos de inmunización. Se produjo un inmunógeno vivo de **B. bovis** por medio de pases rápidos en terneros esplenectomizados (3). Mas tarde se establecería la utilidad de este método para la reducción de la virulencia de la cepa (5,32).

Las desventajas de este tipo de inmunógeno proveniente de organismos vivos en donde se confiere protección por la infección producida son a) la diseminación del organismo, b) la accidental propagación de otras enfermedades en el huésped y c) la producción de anemia hemolítica en el recién nacido (48).

Otra forma de modificar la virulencia de la **Babesia** para su posterior utilización como inmunógeno, ha incluído la irradiación de la sangre infectada (2). Un estudio en el que se irradiaron únicamente formas intraeritrocíticas de **B.bovis** produjo una adecuada respuesta inmune (84).

Otro tipo de inmunógeno inactivado fue derivado a partir de cultivo celular de **B. bovis** *in vitro* (73). Los antígenos corpusculares fueron obtenidos por ultra centrifugación del cultivo. Se ha reportado que animales inmunizados y testigos desarrollaron la infección al ser desafiados; sin embargo la reacción es menos severa en los animales inmunizados (72).

Se ha utilizado también antígenos solubles derivados del suero de animales infectados en forma aguda por **B. bovis** o productos solubles derivados de cultivos ***in vitro*** (45,49,72,74).

CULTIVO ***in vitro*** :

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 bovino infectado (24,74), lo cual limitaba grandemente la población de microorganismos disponibles para estudio (15).

Este problema se ha llegado a resolver por el desarrollo de los métodos de cultivo ***in vitro***, iniciados por Erp y colaboradores en 1978 y mejorados por Levy y Ristic en 1980 (60). En 1983 se establecio un método para la clonación del parásito de donde se obtienen progenies genéticamente idénticas a éste.

Además, se sugirió su utilización para derivar poblaciones puras que pudieran utilizarse como cepas premunizantes (65). La ventaja del crecimiento **in vitro** de estos protozoarios en contraste con el crecimiento en medio natural es que permite la colección de antígeno soluble inalterado al no existir las influencias bioquímicas e inmunológicas del huésped (34).

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Localización

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del proyecto de Hemoprotozoarios y en los corrales adyacentes al Centro de Investigación en Medicina Veterinaria (CIMEVET), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH).

El CIMEVET está localizado en el km 15.5 de la carretera México-Toluca, Delegación Cuajimalpa, D.F., que con respecto al meridiano de Greenwich, tiene localización a los 19^0,29'y 40" de latitud Norte y a los 99^0 , 15' y 69" de latitud Oeste. La altura sobre el nivel del mar es de 2724 m, con una precipitación pluvial media anual de 950 mm., y temperatura promedio anual de 16 C (13).

Animales Experimentales

Se utilizaron un total de 11 animales Bovinos intactos (ocho de los cuales fueron para el primoinóculo, dos para el primer pase y uno para el segundo pase). Estuvieron en confinamiento total con agua y alimento a libre acceso en las instalaciones del CIMEVET-INIFAP,SARH. Todos los animales tenían una edad aproximada de 18 meses, estaban clínicamente sanos y resultaron negativos por la prueba de Inmunofluorescencia

Indirecta a anticuerpos en contra de Babesia spp.así como negativos también a la prueba de Fijación del Complemento en contra de Anaplasma marginale (42,68).

Material Biológico

El material biológico para el primoinóculo se obtuvo a partir del cultivo in vitro (16) de Babesia bovis , en el laboratorio del proyecto de Hemoprotozoarios del CIMEVET-INIFAP,SARH., la cepa fue donada por el Dr. Sergio Rodríguez de la Universidad de Missouri, Columbia. En el caso del primer y segundo pase, el material biológico fue obtenido de los animales inoculados en el primoinóculo y en el primer pase respectivamente.

Procedimiento

A) Primoinóculo:

Los animales se dividieron al azar en cuatro grupos de dos animales cada uno y se inocularon de la manera siguiente:

Grupo Endovenoso (EV): $1x10^8$ parásitos de B. bovis por vía endovenosa.

Grupo Intramuscular (IM): $1x10^8$ parásitos de B. bovis por vía intramuscular.

Grupo Subcutáneo (SC): $1x10^8$ parásitos de B. bovis por vía subcutánea.

Grupo Testigo (T): $1x10^8$ eritrocitos normales de bovino, mantenidos en cultivo e inoculados por vía intramuscular.

En los animales se midieron diariamente los siguientes parámetros:

+ Temperatura por vía rectal.

+ Porcentaje de hematocrito de muestras de sangre obtenidas de oreja y cola por el método de microhematocrito (27,51).

+ Parasitemia: se determinó a partir de frotis de sangre obtenida del pabellón de la oreja y de la punta de la cola, utilizándose la tinción de Giemsa y observando al microscopio con objetivo de 100 X (14).

+ Concentración de proteínas totales del suero obtenido de las muestras de oreja y cola, por el método de refractometría con el refractómetro de Goldberg (51).

Por punción de la vena yugular se tomó sangre en un tubo que contenía ácido etilendiamino tetracético (EDTA) como anticoagulante y una muestra en un tubo sin anticoagulante para obtener suero una vez coagulada la sangre.

Las muestras de sangre con EDTA para la Biometría hemática y de suero para la determinación de títulos de anticuerpos y concentración de proteínas totales, se tomaron los días: -10, -7 -4 antes de la inoculación, el día de la inoculación y los días 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31 (hasta aquí se terminó de hacer la hematología al verse el completo restablecimiento de los animales), 34, 38 y 42 postprimoinóculo se continuó la determinacion de títulos de anticuerpos.

La muestra de sangre con EDTA sirvió para la Biometría hemática, en la que se midió:

+ El conteo de eritrocitos por el método del hemocitómetro (27,51).

+ El conteo de leucocitos por el método del hemocitómetro (27,51).

+ La concentración de hemoglobina por el método de la cianometahemoglobina (14).

+ El conteo de trombocitos por el método con oxalato de amonio (27,51).

En la muestra de suero se determinó:

+ La concentración de proteínas totales por el método de refractometría con el refractómetro de Goldberg (51).

+ El título de anticuerpos por el método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (56).

Se hicieron coeficientes de correlación para determinar si existía alguna diferencia entre cuantificar hematocrito obtenido de muestras de oreja, cola y yugular y se determinaron los Indices de Wintrobe(69) en el caso del primoinóculo.

De los animales inoculados se tomó sangre y se hizo un primer pase a cultivo <u>in vitro</u> en el día 46 postprimoinóculo.

B) Pases :

a) Primer pase : En el día 32, de los animales del primoinóculo, se obtuvo sangre (250 ml.de cada uno) e inocularon 2 animales con 750 ml. por vía Subcutánea.

b) Segundo pase : En el día 29,de los animales del primer pase, se obtuvo sangre e inoculó un animal con 750 ml. por vía subcutánea.

En los pases se midieron diariamente los siguientes parámetros:

+ Temperatura por vía rectal.

+ Porcentaje de hematocrito de muestras de sangre obtenidas del pabellón de la oreja y de la punta de la cola (27,51).

+ Parasitemia (14).

En los pases realizados a los animales experimentales libres de babesiosis sólo se tomaron muestras de sangre para obtener suero para la determinación de títulos de Anticuerpos por el método de IFI (56), los días fueron los siguientes:

Para el Primer pase: 3, 7, 10, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38, 42 y 45 postprimerpase.

Para el Segundo pase: 2, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30, 35, 38 y 41 posteriores al segundo pase.

El pase a cultivo <u>in vitro</u> de la sangre de los animales del primer pase se realizó en el día 58 posterior a éste.

<u>Análisis estadístico</u>

El análisis estadístico del trabajo comprendió: un diseño de bloques aleatorizados, una comparación múltiple de medias y la determinación de coeficientes de correlación según lo descrito por Snedecor y Cochran (76).

Para el manejo de los datos: los eritrocitos, leucocitos y trombocitos se transformaron a logaritmo y el hematocrito a arcoseno para obtener una distribución normal (71).

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

El comportamiento de la temperatura rectal en el caso del primoinóculo se muestra en la gráfica 1, en donde los cambios se fueron sucediendo dependiendo la vía de inoculación utilizada. Así se puede observar que el primer grupo en presentar fiebre es el grupo Endovenoso alcanzando su valor máximo en el día 7 con 40.8 C , después el grupo Intramuscular con un valor máximo en el día 11 con 40.6 C y en este mismo día el grupo Subcutáneo con un valor máximo de 40 C , no existiendo cambios significativos en el grupo Testigo. Rogers (66) inoculó por vía Endovenosa una cepa atenuada por pases en animales, reportando un valor máximo de temperatura en el día 5 postinoculación con 41.4 C ; Rodríguez (64) utilizó dos vías distintas de inoculación, siendo éstas la Endovenosa y Subcutánea inoculando una clona primaria de B. bovis reportó que la vía Endovenosa fue la primera en mostrar alteraciones dando un valor máximo de temperatura de 40.5 C en el día 6 y posteriormente la vía Subcutánea con 41 C en el día 8 postinoculación. Estos resultados concuerdan con el presente estudio con respecto a que dependiendo de la vía de inoculación es el tiempo en que tarda la presentación de la sintomatología, aunado a que en ambos casos la vía Endovenosa resulta ser la primera en presentar alteraciones.

La gráfica 7 muestra los cambios ocurridos en la temperatura para el primer y segundo pase, observándose en el primer caso un valor máximo de 41.2 C en el día 12 posterior al

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
BIBLIOTECA - UNAM

primer pase y para el segundo pase una temperatura máxima de 39.7 C en el día 13 posterior al segundo pase. Rodríguez (64) realizó un pase a animales experimentales obteniendo sangre de animales previamente inoculados con una clona primaria de B. bovis , mezcló las sangres obtenidas y dividió el volumen total para inocular una parte por vía Endovenosa y la restante por vía Subcutánea observando dos tipos de respuesta,una temprana con un valor máximo de 41 C en el día 4 y otra de 40 C en el día 11 postpase. El resultado de los pases no siempre es la atenuación del parásito sino que es posible el aumentar su virulencia, esta variante se muestra tanto en el pase efectuado por Rodríguez (64) como en el del presente estudio, en donde la cepa aumentó aparentemente su patogenicidad al ser transmitida.

El comportamiento de la concentración media de eritrocitos para el primoinóculo (gráfica 2) muestra cambios fluctuantes siendo éstos principalmente en el grupo Endovenoso e Intramuscular y mostrándose mas drásticos en éste último; sin embargo, se observó un rápido restablecimiento. En el grupo Endovenoso existió una mínima concentración el día 7 con 6.2 millones/mm^3 , para el grupo Intramuscular y Subcutáneo los mínimos valores alcanzados fueron de 6.6 y 7.4 millones/mm^3 respectivamente en el día 10 en ambos casos. El análisis estadístico (cuadro 1) muestra que hubo una diferencia significativa entre el grupo Intramuscular con respecto a los demás grupos, diferencia que se esperaba por el comportamiento observado en las gráficas. La disminución de glóbulos rojos probablemente es debida a la destrucción de ellos provocada por

el protozoario, este signo ha sido reportado por distintos autores: Wright en 1973 (81) reportó una disminución de 2 millones/mm^3 en el día 14 postinoculación así como Monroy en 1980 (52) informa de un descenso notable en el día 16 postinfección con 2.8 millones/mm^3 ; ninguno de estos casos concuerda con nuestros resultados debido a que se obtuvo una sintomatología más rápida en su presentación y menos drástica en la disminución de la concentración de eritrocitos lo que se atribuye a un rápido desarrollo de este parásito irradiado .

En la concentración de hemoglobina (gráfica 2) para los cuatro grupos, se puede observar que la caída más drástica existió en el grupo Endovenoso siendo en el día 7 y obteniéndose un valor mínimo de 6.2 g/dl,los grupos Intramuscular y Subcutáneo alcanzaron un valor mínimo de 9.7 y 9.0 g/dl,respectivamente,en el día 12 en ambos casos. El análisis estadístico (cuadro 1) encontró diferencias entre el grupo Endovenoso con respecto a los demás grupos. Los cambios ocurridos en la concentración promedio de hemoglobina resultan ser ligeros si se les compara con los obtenidos por Rogers en 1971 (66) quien reporta una baja en la cantidad de hemoglobina a partir del día 7 alcanzando un valor mínimo de 4.1 g/dl en el día 8 postinoculación o Wright que en 1973 (81) trabajando con B. bovis irradiada en ganado esplenectomizado observó una disminución en la cantidad de hemoglobina a partir del día 10 llegando a valores menores de 5 g/dl en el día 14 postinoculación; o bien Monroy que en 1980 (52) reporta un decremento muy marcado a partir del día 12 obteniendo valores de 5.5 g/dl en el día 16 postinfección.

Concentración media de leucocitos (gráfica 3) : los grupos Endovenoso e Intramuscular presentan a lo largo del estudio valores menores en comparación con los grupos Testigo y Subcutáneo; los grupos Endovenoso, Intramuscular y Subcutáneo muestran sus menores valores en el día 7 postprimoinóculo siendo éstos de 5000/mm^3 , 7200/mm^3 , y 7500/mm^3, respectivamente, existiendo una rápida recuperación para mantener valores constantes al final del tratamiento. El análisis estadístico indica una diferencia significativa de los grupos Endovenoso e Intramuscular con respecto al Subcutáneo y Testigo (cuadro 1) . Dentro de la literatura se encuentran diversos datos con respecto a las alteraciones que provoca la Babesiosis en la cantidad de leucocitos, Wright en 1973 (81) reporta una leucocitosis de 24 000/mm^3 en el día 16 postinoculación; en cambio Monroy (52) y Larios y col. (35) informan de una leucopenia de 5000 y 2900/mm^3, respectivamente; en el presente trabajo aun cuando existió cierta disminución en los valores, siendo ésta más aparente en los grupos Endovenoso e Intramuscular, no sobrepasaron los valores normales.

El comportamiento de los trombocitos se observa en la gráfica 3 en donde los grupos Endovenoso e Intramuscular son los que presentan mayores alteraciones, presentándose primeramente en el grupo Endovenoso y posteriormente en el Intramuscular; los menores valores para el grupo Endovenoso fueron de 90,000/mm^3 en el día 7 y para el Intramuscular de 140,000/mm^3 en el día 10 ; el grupo Subcutáneo presentó en el día 17 su menor valor con 340,000/mm^3 . El análisis estadístico (cuadro 1) no encontró

diferencia estadísticamente significativa entre los grupos; sin embargo es importante resaltar que el grupo Endovenoso presentó una caída en sus valores fuera del rango normal aun cuando su recuperación fue rápida y en forma ascendente. Dalgliesh y col. (12), Monroy (52) y Larios y col. (37) describen una trombocitopenia en bovinos infectados con Babesia bovis , fenómeno que al parecer ocurrió únicamente en el grupo Endovenoso del presente estudio.

Los porcentajes de hematocrito obtenidos de las muestras de oreja, cola y yugular para el primoinóculo se presentan en las gráficas 4, 5 y 6, respectivamente. Los valores mínimos correspondieron al grupo Endovenoso con un valor menor de 25% en el hematocrito de oreja y cola, ya que para el hematocrito de yugular el menor valor lo tuvo el grupo Subcutáneo con 25%. En la comparación de medias para los hematocritos (cuadro 1) los resultados fueron : en el hematocrito de oreja existió diferencia entre el grupo Endovenoso e Intramuscular, para el hematocrito de cola el grupo Endovenoso fue diferente de los demás grupos y por último en el hematocrito de yugular el grupo Endovenoso difirió del Subcutáneo, Intramuscular y Testigo así como éste último del Subcutáneo. Los datos obtenidos no coinciden con los de Rogers quien reporta valores mínimos obtenidos del 13% de hematocrito en el día 10 postinoculación (66), ni con Monroy (52) que en el día 10 postinóculo obtiene un hematocrito de 19% y Rodríguez (64) el mismo porcentaje de hematocrito pero éste en el día 13 postinóculo. De tal forma los cambios ocurridos resultan no ser significativos al ser comparados con otros estudios.

El comportamiento del porcentaje de hematocrito para el primer y segundo pases se muestran en la gráfica 7 , en el primer pase existe un descenso rápido a partir del día 6 alcanzando su mínimo valor en el día 14 con un 15% de hematocrito para después restablecerse en forma rápida. En el caso del segundo pase no hay alteraciones significativas dentro del comportamiento del porcentaje de hematocrito durante todo el seguimiento. Nuestros resultados del primer pase no llegan a concordar con los obtenidos por Rodríguez (64) que al efectuar la inoculación de B. bovis y un pase consecutivo, obtuvo en el caso del pase un hematocrito mínimo de 19% en el día 19 postpase, aun cuando un poco más tardía esta respuesta en comparación a la nuestra, es importante señalar que en ambos casos se vio aparentemente aumentada la patogenicidad de la Babesia al ser transmitida experimentalmente.

Los coeficientes de correlación en el primoinóculo se obtuvieron para determinar si existía diferencia entre cuantificar el hematocrito obtenido de muestras de oreja, cola y yugular; los resultados se muestran en el cuadro 2 donde se observa que éstos fueron significativos lo cual señala una estrecha correlación entre los mismos.

Las gráficas 4, 5 y 6 muestran el comportamiento de las proteínas totales del suero obtenido de las muestras de oreja, cola y yugular respectivamente; para las proteínas totales de oreja el grupo Endovenoso presentó su menor valor en el día 9 con 6.2 g/dl , para los grupos Intramuscular y Subcutáneo fue de 6.9 g/dl en el día 6 y 24, respectivamente; en las proteínas totales

de cola el grupo Endovenoso comenzó el estudio con valores bajos pero se recuperó rápidamente aun cuando al final tuvo un descenso notable, los grupos Intramuscular y Subcutáneo no presentaron cambios significativos al igual que el grupo Testigo; por último en las proteínas totales de yugular el grupo Endovenoso es el único que presenta un descenso ligero en el día 7 con 6.4 g/dl recuperándose rápidamente, los demás grupos no presentan alteraciones significativas entre ellos.

En los índices de Wintrobe: el Volumen corpuscular medio y la Concentración de hemoglobina corpuscular media no mostraron diferencias significativas entre los grupos; sin embargo,en la Hemoglobina corpuscular media existe diferencia entre el grupo Endovenoso y el Testigo, lo que resulta indicativo de una posible anemia normocítica hipocrómica para el grupo Endovenoso (cuadro 1).

La concentración de anticuerpos fue determinada por el método de IFI, en la presentación de los datos para el primoinóculo se dividieron los resultados en dos gráficas (gráfica 8) mostrando en la gráfica superior a los animales que tuvieron los más altos títulos de anticuerpos y en la inferior a los de menores títulos, así se observa que el grupo Intramuscular en ambos casos presentó altos y duraderos títulos de anticuerpos, iniciándose la respuesta en el día 17 postprimoinóculo. En el caso del primer pase (gráfica 9) la respuesta de anticuerpos se presentó rápidamente, comenzando en el día 3 posterior al primer pase y alcanzando un valor máximo en el día 17 para mantenerse estable durante los días restantes. En el segundo pase (gráfica

9) la respuesta resultó tardía en comparación con el primer pase, ocurriendo ésta en el día 20 y obteniendo su máximo nivel en el día 27 para ir descendiendo en forma constante. Se señala que la presencia de anticuerpos no es necesariamente indicativo de protección(4, 6, 9, 43, 72), este concepto resulta importante debido a que en nuestro estudio no se realizaron desafios con cepas patógenas por lo que se desconoce la capacidad protectora de los anticuerpos detectados.

Se estimó la parasitemia por frotis sanguíneo en el primoinóculo, siendo negativa los primeros días del estudio por lo que se determinó hacer un primer y segundo pases tanto a animales experimentales intactos y susceptibles así como intentar el aislamiento del protozoario en el cultivo in vitro y de esta manera demostrar la presencia y viabilidad del parásito.

Los animales utilizados en el primer pase comenzaron a presentar parasitemia en el 11avo. día alcanzando un 0.21% ; en el segundo pase, en el animal utilizado no se encontró parasitemia en frotis sanguíneo durante los 39 días del seguimiento.

En el primer pase hecho al cultivo in vitro los parásitos aparecieron 10 días posteriores al primer pase y se mantuvieron en cultivo durante 15 días obteniendo una parasitemia menor al 1%. Para el segundo pase al cultivo in vitro, los parásitos aparecieron a los 15 días postsegundo pase, se mantuvieron en cultivo durante 15 días y alcanzaron una parasitemia del 2.8%.

C O N C L U S I O N E S

La clona irradiada de Babesia bovis mantenida en cultivo in vitro, produce alteraciones hemáticas leves que no ponen en riesgo la vida del animal.

En el primoinóculo no se demostró parasitemia en frotis sanguíneo lo que no es indicativo de ausencia del parásito, hecho que se demuestra en los pases efectuados a animales experimentales y a cultivo in vitro en donde se confirmó la presencia y viabilidad del protozoario en todos los casos.

De los tratamientos utilizados en el primoinóculo, resultó ser que la vía Intramuscular es la mejor debido a su respuesta de anticuerpos además de que produjo alteraciones poco significativas en la temperatura y la hematología, lo que podría hacerla una vía óptima de inmunización.

Para los anticuerpos detectados tanto del primoinóculo como de los pases no se conoce la duración de la inmunidad y tampoco si efectivamente ésta resultará protectora.

B I B L I O G R A F I A

1.- Babes, V.: Sur l'hemoglobinurie bacterienne du boeuf. C.R. Hebd Seances Acad. Sci. Paris, 107 : 692-694 (1888).

2.- Bishop, J.P. and Adams, L.G.: Babesia bigemina: immune response of cattle inoculated with irradiated parasites. Exp. Parasitol., 35: 35-43 (1974).

3.- Callow, L.L. and Mellors, L.T.: A new vaccine for Babesia argentina infection prepared in splenectomized calves. Aust. Vet. J., 42: 464-465 (1966).

4.- Callow, L.L., McGregor, W., Parker, R.J. and Dagliesh, R.J.: Immunity of cattle to Babesia bigemina following its elimination from the host, with observations on antibody levels detected by the indirect fluorescent antibody test. Aust. Vet. J., 50: 12-15 (1974).

5.- Callow, L.L., Mellors, L.T. and McGregor, W.: Reduction in virulence of Babesia bovis due to rapid passage in Splenectomized cattle. Int. J. Parasitol., 9: 333-338 (1979).

6.- Cantó, G.J., Vega, C.A. y Smith, R.D.: Vacunación contra Babesia bovis utilizando antigenos procedentes de cultivo in vitro. Téc. Pec. Méx., 43:43-54 (1982).

7.- Carson, C.A. and Phillips, R.S.: Immunologic response of the vertebrate host to Babesia. En Ristic,M. and Kreier, J.P.(eds).Babesiosis, Academic Press, N.Y., p.411-443 (1981).

8.- Connaway, J.W. and Frances, M.: Texas fever. Missouri Agri. Exp. Sta. Bull., 48: 1-61 (1899).

9.- Corrier, D.E. and Guzman, S.: The effect of natural exposure to Anaplasma and Babesia infections on native calves in an endemics area of Colombia. Trop. Animal Hlth Prod., 9: 47-51 (1984).

10.- Curnow, J.A.: In vitro agglutination of bovine erythrocytes infected with Babesia argentina. Nature 217: 267-268 (1968).

11.- Curnow, J.A.: Studies on antigenic changes and strain differences in Babesia argentina infections. Aust. Vet. J., 49:279-283 (1973).

12.- Dagliesh, R.J., Dimmock, C.K., Hill, M.W.M. and Mellors, L.T.: Babesia argentina: Disseminated intravascular coagulation in acute infections in splenectomized calves. Exp. Parasitol., 40: 124-131 (1976).

13.- D.E.T.E.N.A.L.: Cartografía del Territorio Nacional. Dirección de estudios del Territorio Nacional (DETENAL), México, 1982. Secretaría de Programación y Presupuesto, D.F. 1982.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
BIBLIOTECA - UNAM

14.- E. Merck.: Medico-Chemical Investigation Methods. Darmstadt, Federal Republic of Germany, 1984.

15.- Figueroa, J.V., Cantó, G.J., Juarez, J. y Ruiz, F.: Cultivo in vitro de Babesia bovis: Establecimiento y condiciones óptimas de multiplicación. Téc. Pec. Méx., 46:46-52 (1984).

16.- Figueroa Millán, J.V.: Cultivo in vitro de Babesia bovis: Establecimiento del sistema fase estacionaria microaerofílica y condiciones óptimas de multiplicación. Tesis de Licenciatura Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico, D.F., 1984.

17.- Fujinaga, T., Minami, T. and Ishihara, T.: Serological relationship between a large Babesia found in Japanese cattle and Babesia major, B. bigemina and B. bovis. Res. Vet. Sci., 29:230-234 (1980).

18.- Goodger, B.V.: Preparation and preliminary assessment of purified antigens in the passive haemagglutination test for bovine babesiosis. Aust. Vet. J., 47: 251-256 (1971).

19.- Goodger, B.V.: Babesia argentina: intraerythrocytic location of babesial antigen extracted from parasite suspensions. Int. J. Parasitol., 3: 387-391 (1973).

20.- Goodger, B.V.: Babesia bovis (= argentina): Changes in erythrophylic and associated proteins during acute infection of splenectomized and intact calves. Z. Parasitenkd.,55:1-8 (1978).

21.- Goodger, B.V., Wright, I.G. and Mahoney, D.F.: Babesia bovis (argentina): Analysis of paracoagulation proteins in acutely infected cattle. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 58: 179-188 (1980).

22.- Goodger, B.V. and Wright, I.G.: Babesial antigens in a saline eluate of sucrose washed erythrocytes infected with Babesia bovis. Experientia,39: 1392-1393 (1983).

23.- Goff, W.L., Wagner, G.G., Craig, T.M. and Long, R.F.: The bovine immune response to tick derived Babesia bovis infection: serological studies of isolated immunoglobulins. Vet. Parasitol., 11: 109-120 (1982).

24.- Gravely, S.M., Smith, R.D., Erp, E.E., Cantó, G.J., Aikawa, M., Osorno, B.M. and Ristic, M.: Bovine babesiosis: partial purification and characterizacion of blood culture-derived Babesia bovis. Int. J. Parasitol., 9 : 591-598 (1979).

25.- Groves, M. and Dennis, G.: Babesia gibsoni: Field and laboratory studies of canine infections. Exp. Parasitol., 31:153-159 (1972).

26.- Hall, W.T.K., Tammemagi, L. and Johnston, L.A.Y.: Bovine babesiosis: the immunity of calves to Babesia bigemina infections. Aust. Vet. J., 44: 259 (1968).

27.- Henry, J.B.: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 16a. edition, W.B. Saunders Company. 1979.

28.- Hirato, K., Nonomiya, N., Uwano, Y. and Kutil, T.: Studies on the complement fixation reaction for equine piroplasmosis. Jpn. J. Vet. Sci., 7: 204-205 (1945).

29.- Hoyte, H.M.D.: The tick fever parasites of cattle. Proc. R. Soc. Queensl., 87 : V-XIII (1976).

30.- Ishime, T., Nagasawa, H. and Suzuki, N.: An in vitro study of monocyte phagocytosis in the peripheral blood of healthy and Babesia infected Beagles Japanese. J. Vet. Sci., 41: 487 (1979).

31.- Itard, J.: Piroplasmose du porc. Revue d'Elevage et de Med. Vet. du Pays Trop., 17 : 221-231 (1974).

32.- Kahl, L.P., Mitchell, G.T., Dalgliesh, R.J., Stewart, N.P., Rodwell, B.J., Mellors, L.T., Timms, P. and Callow, L.L.: Babesia bovis: proteins of virulent and avirulent parasites passaged through ticks and Splenectomized or intact calves. Exp. Parasitol., 56: 222-235 (1983).

33.- Kuttler, K.L., Adams, L.G. and Todorovic, R.A.: Comparison of the complement fixation and indirect antibody reactions in the detection of bovine babesiasis. Am. J. Vet. Res., 38: 153-156 (1977).

34.- Kuttler, K.L., Levy, M.G., James, M.A. and Ristic, M.: Efficacy of a nonviable culture-derived Babesia bovis vaccine. Am. J. Vet. Res., 43 (2):281-284 (1982).

35.- Larios, F., Smith, R. and Monroy, J.: Pathophysiology of calves infected with Babesia bovis and Babesia bigemina. Proceedings: Progress in Bovine Anaplasmosis and Babesiosis. Febrero 26-28, p.47-55, Mexico City (1980).

36.- Larios F.: A pathophysiological study of Babesia bovis (virulent and Attenuated strain) in Splenectomized calves. M.Sc.Thesis University of Illinois, Urbana-Champaign. Illinois, U.S.A. (1981).

37.- Larios, F., Monroy, J., Márquez, R., Fajardo, R. y Smith, R.: Patogenia y fisiopatología de la babesiosis bovina. Reunión de Investigación Pecuaria en México (Memorias) p.230-232 (1984).

38.- Lignières, A.: La piroplasmose bovine. Nouvelles recherches et preservations sur la multiplicité des parasites, leur evolution, la transmission naturelle de la maladie et vaccination. Arch. Parasita., 7 : 327-335 (1964).

39.- Ludford, C. G.: Fluorescent antibody staining of four Babesia species. Exp. Parasitol., 24 : 327-335 (1969).

40.- Mahoney, D.F.: Bovine babesiosis: An assessment of the significance of complement fixing antibodies based upon experimental infection. Aust. Vet. J., 40: 369-375 (1964).

41.- Mahoney, D.F.: Circulating antigens in cattle infected with Babesia bigemina or B. argentina. Nature 211: 422 (1966).

42.- Mahoney, D.F.: Bovine babesiosis: preparation and assessment of complement fixing antigens. Exp. Parasitol., 20: 232-241 (1967).

43.- Mahoney, D.F.: Bovine babesiosis: The passive immunization of calves against Babesia argentina with special reference to the role of complement fixing antibodies. Exp. Parasitol., 20: 19-24 1967).

44.- Mahoney, D.F.: Immune response to hemoprotozoa. In Babesia spp. In Soulsby, E.J.L. (editor). Immunity to animal parasites. Academic Press, N. Y. pp 308-319 (1972).

45.- Mahoney, D.F. and Goodger, B.V.: Babesia argentina: immunogenicity of plasma from infected animals. Exp. Parasitol., 32; 71-85 (1972).

46.- Mahoney, D.F. and Ross, D.R.: Epizootiological factors in the control de bovine babesiosis. Aust. Vet. J., 48: 292-298 (1972).

47.- Mahoney, D.F., Kerr, J.D., Goodger, B.V. and Wright, I.G.: The immune response of cattle to Babesia bovis (syn. argentina). Studies on the nature and specificity of protection. Int. J. Parasitol., 9: 297 (1979).

48.- Mahoney, D.F., Wright, I.GG. and Goodger, B.V.: Bovine babesiosis: The immunization of cattle with fractions of erythrocytes infected with Babesia bovis (syn B. argentina). Veterinary Immunology and Immunopathology 2: 145-156 (1981).

49.- Mahoney, D.F.: Studies on the protection of cattle against Babesia bovis infection. In Dunsmore J.D. (editor) "Tropical parasitosis and parasitic zoonosis" Perth, Australia. p. 93-104 (1983).

50.- Mc. Cosker, P.J.: The global importance of Babesiosis. In Ristic, M., Kreier, J.P. (eds). Babesiosis. Academic Press, N.Y. p. 1-24 1981.

51.- Medway, W., Prier, S.,James, E. and Wilkinson, J.: Veterinary Clinical Pathology. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 1969.

52.- Monroy, B.J.: Alteraciones hemáticas y de química sanguínea en Bovinos expuestos experimentalmente a larvas de garrapata infectadas con Babesia bovis. Tesis de Licenciatura, ENEP-Cuautitlán 1980.

53.- Montenegro, S.: Purification of Babesia bovis antigens. Ph.D. Thesis University of Illinois, Urbana, Illinois, U.S.A. (1981).

54.- Nuttall, G.H.F. and Hawden, S. The successful drug treatment of canine piroplasmosis, together with observation upon the effect of drugs on Piroplasma canis. Parasitology 2 : 156-191 (1909).

55.- Osorno, E.M.: Babesiosis en México. Veterinaria México IX, Núm. 4, Oct-Dic: 203-218 (1978).

56.- Ponce, l.I.: Determinación de la probabilidad diaria de infección de Babesia spp. de un hato de bovinos en el Centro Experimental Pecuario de Tizimín, Yucatán. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., 1979.

57.- Purnell, R.E.: Babesiosis in various hosts. In Ristic, M. and Kreier J.P. (eds) Babesiosis. Academic Press, N.Y. p. 25-63. 1981.

58.- Quiroz, H.R.: Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Limusa, México. 1984.

59.- Riek, R.F.: Babesiosis. In Infectious Blood Diseases of Man and Animals. Winman, D., and Ristic, M. (eds) Vol. 2 Academic Press, N.Y. p. 219-268. 1968.

60.- Ristic, M. and Levy, M.G.: A new Era of Research Toward Solution of Bovine Babesiosis. In Ristic, M. and Kreier, J.P. (eds). Babesiosis. Academic Press. N.Y. p. 509-539, 1981.

61.- Ristic, M., Smith, R.D. and Kakoma, I.: Characterization of Babesia antigens derived from cell cullture and ticks. In Ristic, M. and Kreier, J.P. (eds) Babesiosis. Academic Press, N.Y., p. 349-- (1981).

62.- Roberts, J.A.: Adoptive transfer of immunity to B. rodhaini by the spleen cells from immune rats. Aust. J. Exp. Biol. Sci., 46: 807 (1968).

63.- Roby,, R., Anthony, D., Thornton, C. and Holbrock, A.: The hereditary transmission of Babesia caballi in the tropical horse tick Dermacentor nitens-Neuman. Am. J. Vet. Res., 25: 494-499 (1964).

64.- Rodríguez, S.D.: Development of a modified *in vitro* cultivation technique for *Babesia bovis* and its adaptation for cloning. M.Sc. Thesis. *University of Missouri-Columbia*, (1983).

65.- Rodríguez, S.D., Buening, G.M., Green, T.J. and Carson, C.A." Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Inf. Imm.* *42*: 15-18 (1983).

66.- Rogers, R.J.: Observations on the pathology of *Babesia argentina* infections in cattle. *Aust. Vet. J.*, *47*: 242-247 (1971).

67.- Rogers, R.J.: Serum opsonins and passive transfer of protection in *Babesia rodhaini* infection of rats. *Int. J. Parasitol.*, *4*: 197 (1974).

68.- Ross, J.P.J. and Lohr, K.F.: Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. *Res. Vet. Sci.*, *9* : 557-562 (1968).

69.- Schalm, O.W., Jain, N.C. and Carroll, E.J.: *Veterinary Hematology*. 3rd. edition. Lea and Febiger, Philadelphia, 1975.

70.- Singh, B., Banerjee, D.P. and Gautain, O.P.: Intradermal test for equine babesiosis - a preliminary report. *Indian J. Animal Health* *18*: 53 (1979).

71.- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J.: Biometría : Principios y Métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume Ediciones, Madrid, España. 1979.

72.- Smith, R.D., Carpenter, J., Cabrera, A., Gravely, S.M., Erp, E.E., Osorno, M.B. and Ristic, M.: Bovine babesiosis: Vaccination against tick borne challenge exposure with culture-derived Babesia bovis immunogen. Am. J. Vet. Res., 40: 1678-1682 (1979).

73.- Smith, R.D. and Ristic, M.: Immunization against bovine babesiosis with culture-derived antigen. In Ristic, M. and Kreier, J.P. (eds) Babesiosis. Academic Press, N.Y. p. 485-507 (1981).

74.- Smith, R.D., James, M.A., Ristic, M., Aikawa, M. and Vega, C.A.: Bovine babesiosis: protection of cattle with culture-derived soluble Babesia bovis antigen. Science 212: 335-338 (1981).

75.- Smith, T. and Kilbourne, F.L.: Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. U.S. Dept. Agri. Bur. Anim. Ind. Bull., 1: 1-301 (1893).

76.- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G.: Statistical Methods. Seventh Edition . The Iowa State University Press. Ames, Iowa, U.S.A. 1980.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
BIBLIOTECA - UNAM

77.- Theiler, A.: The treatment of redwater in cattle with trypanblue. Vet. J., 19: 64-73 (1912).

78.- Todorovic, R.A. and Long, R.F.: Comparison of indirect fluorescent antiboody (IFA) test with complement fixation (CF) test for diagnosis of Babesia spp infections in Colombian cattle. Tropenmed. Parasitol., 27: 169-181 (1976).

79.- Todorovic, R.A. and Carson, C.A.: Methods of measuring the immunological response to Babesia. In Ristic, M. and Kreier, J.P. (eds) Babesiosis. Academic Press, N.Y. 381-410 (1981).

80.- Vega y M., C.A.: Babesia bigemina: in vitro cultivation and characterization. Ph. D. Thesis. University of Missouri-Columbia. p. 29, 1985.

81.- Wright, I.G.: Observations on the Haematology of Experimentally Induced Babesia argentina and B. bigemina. Res. Vet. Sci., 14: 29-34 (1973).

82.- Wright, I.G.: The probable role of Babesia argentina esterase in the in vitro activation of plasma prekallikrein. Vet. Parasitol., 1: 91-96 (1975).

83.- Wright, I.G. and Kerr, J.D.: Hypotension in acute Babesia bovis (= B. argentina) infection of splenectomized calves. J. Comp. Path., 87: 531-537 (1977).

84.- Wright, I.G., Mahoney, D.F., Mirre, G.B., Goodger, B.V. and Kerr, J.D.: The irradiation of Babesia bovis II. The immunogenicity of irradiated blood parasites for intact cattle and splenectomizsed calves. Veterinary Immunology and Immunopathology 3: 591-601 (1982).

Cuadro 1. Comparación múltiple de medias entre los distintos grupos y para las variables hemáticas medidas.

	T	EV	IM	SC
Eritrocitos *	6.927 a	6.915 a	6.968 b	6.917 a
Leucocitos *	4.10 a	3.93 b	3.91 b	4.04 a
Plaquetas *	5.746 a	5.674 a	5.653 a	5.729 a
Hemoglobina*	11.84 a	10.28 b	11.98 a	11.67 a
Hematocrito**:				
Oreja	37.32 a	34.9 c	38.42 a	37.46 a
Cola	36.48 a	33.38b	36.68 a	35.67 a
Yugular	37.15 ab	35.86a	37.84 b	36.94ab
VCM (u)	46.33 a	40.95a	44.39 a	45.47 a
HCM (uug)	14.84 a	12.15b	13.0 ab	14.22ab
CHCM (%)	32.62 a	30.47a	30.96 a	32.31 a

Diferente literal en la misma línea indica diferencia significativa ($P < 0.05$)

* Valores que presentan la transformación a logaritmo.

**Valores que presentan la transformación a arcoseno.

VCM= Volumen Corpuscular Medio; HCM= Hemoglobina Corpuscular Media y CHCM= Concentracion de Hemoglobina Corpuscular Media.

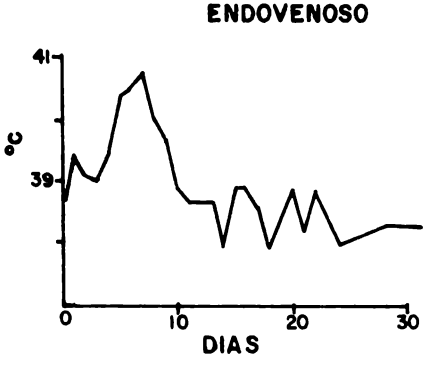
Cuadro 2. Coeficientes de correlación tomando como base el Hematocrito de oreja con respecto al Ht de cola y yugular para los distintos grupos.

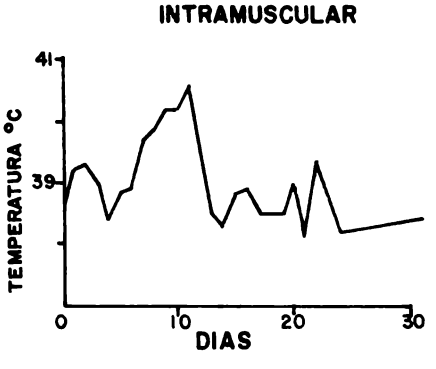
GRUPOS	Ht oreja/Ht cola	Ht oreja/Ht yugular
TESTIGO	0.5361	0.6505
SUBCUTANEO	0.7438	0.8678
ENDOVENOSO	0.6261	0.8180
INTRAMUSCULAR	0.5833	0.6012

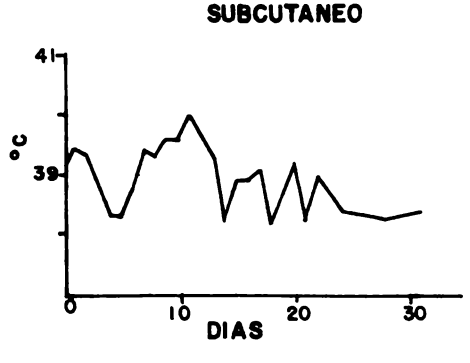
($P < 0.01$)

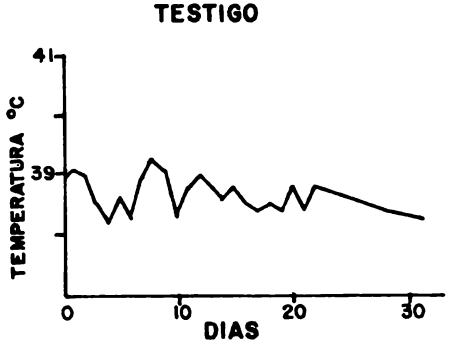
Ht = Hematocrito.

VALORES PROMEDIO DE LA TEMPERATURA EN EL PRIMOINOCULO DE **B. bovis**



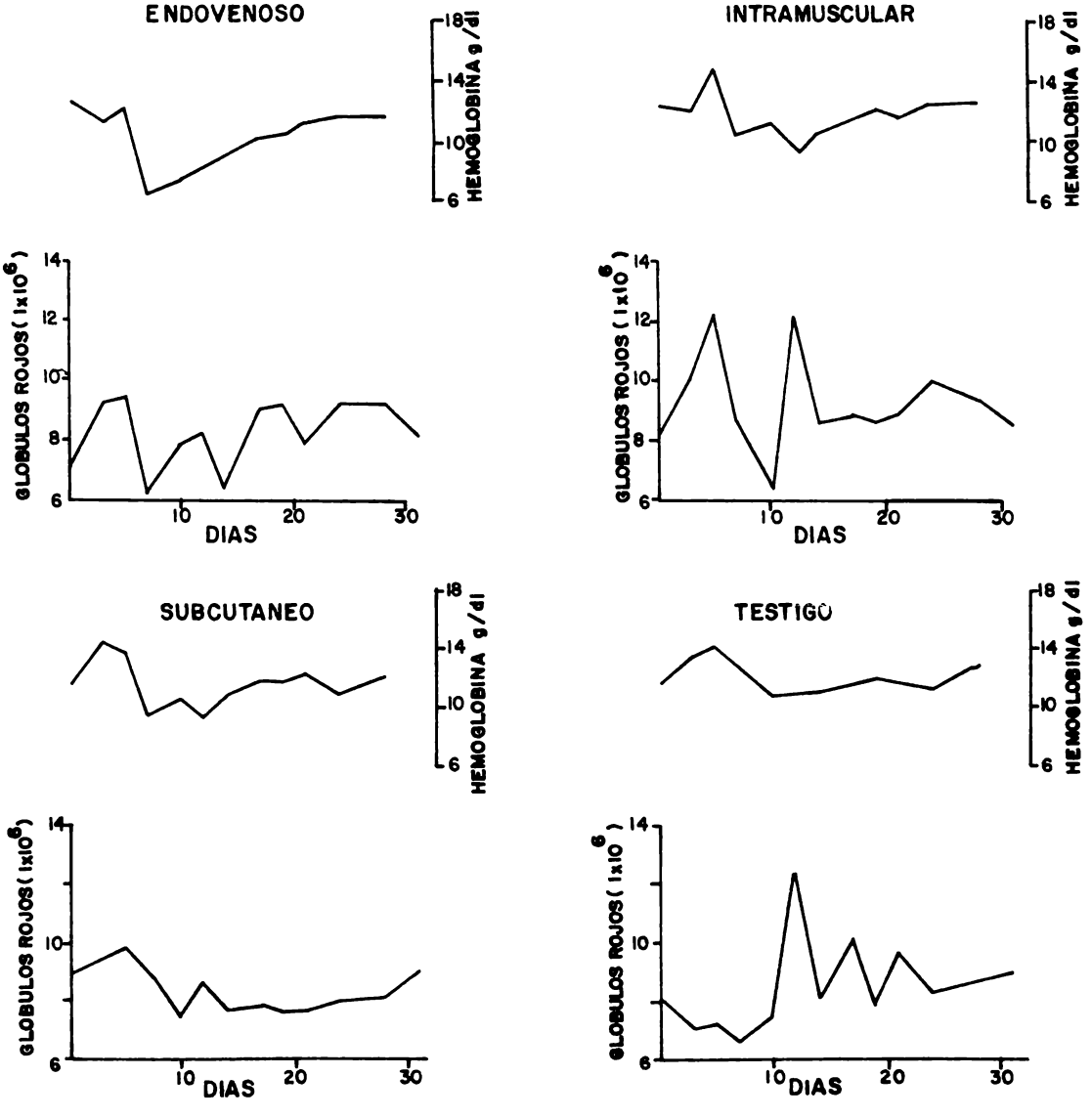






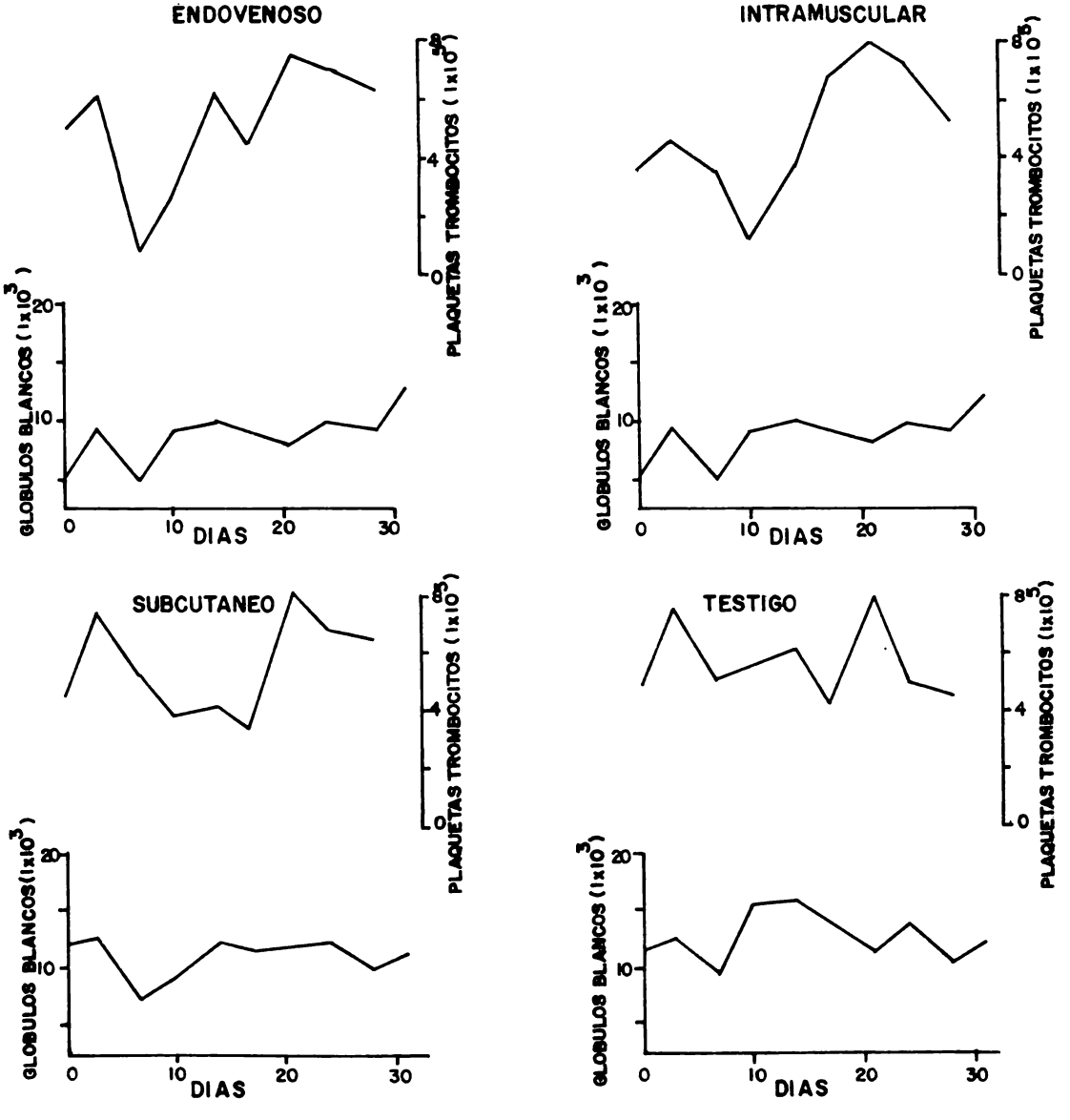
gráfica 1

CONCENTRACION PROMEDIO DE GLOBULOS ROJOS Y HEMOGLOBINA EN EL PRIMOINOCULO DE B. **bovis**



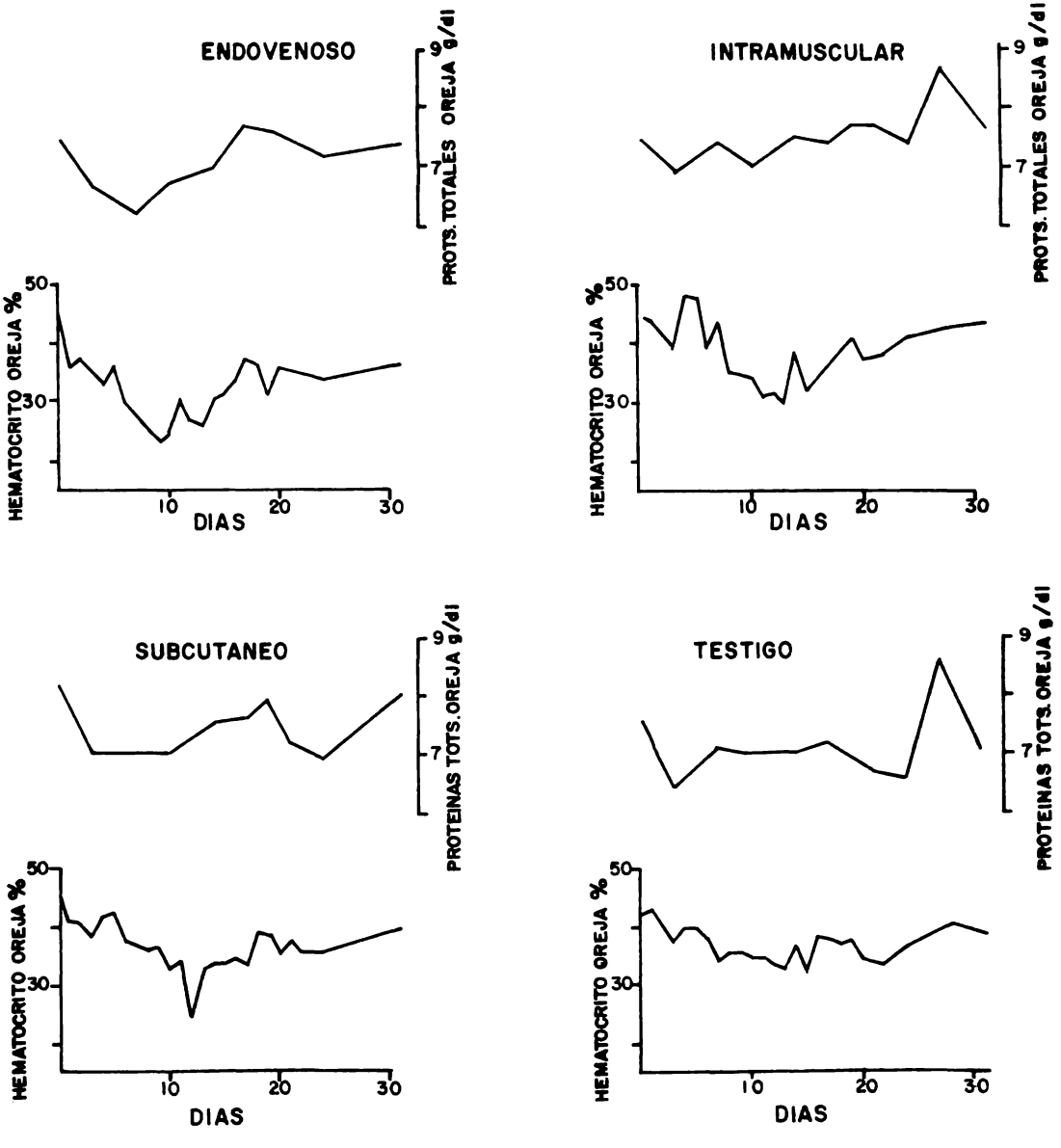
gráfica 2

CONCENTRACION PROMEDIO DE GLOBULOS BLANCOS Y TROMBOCITOS EN EL PRIMOINOCULO DE **B. bovis**



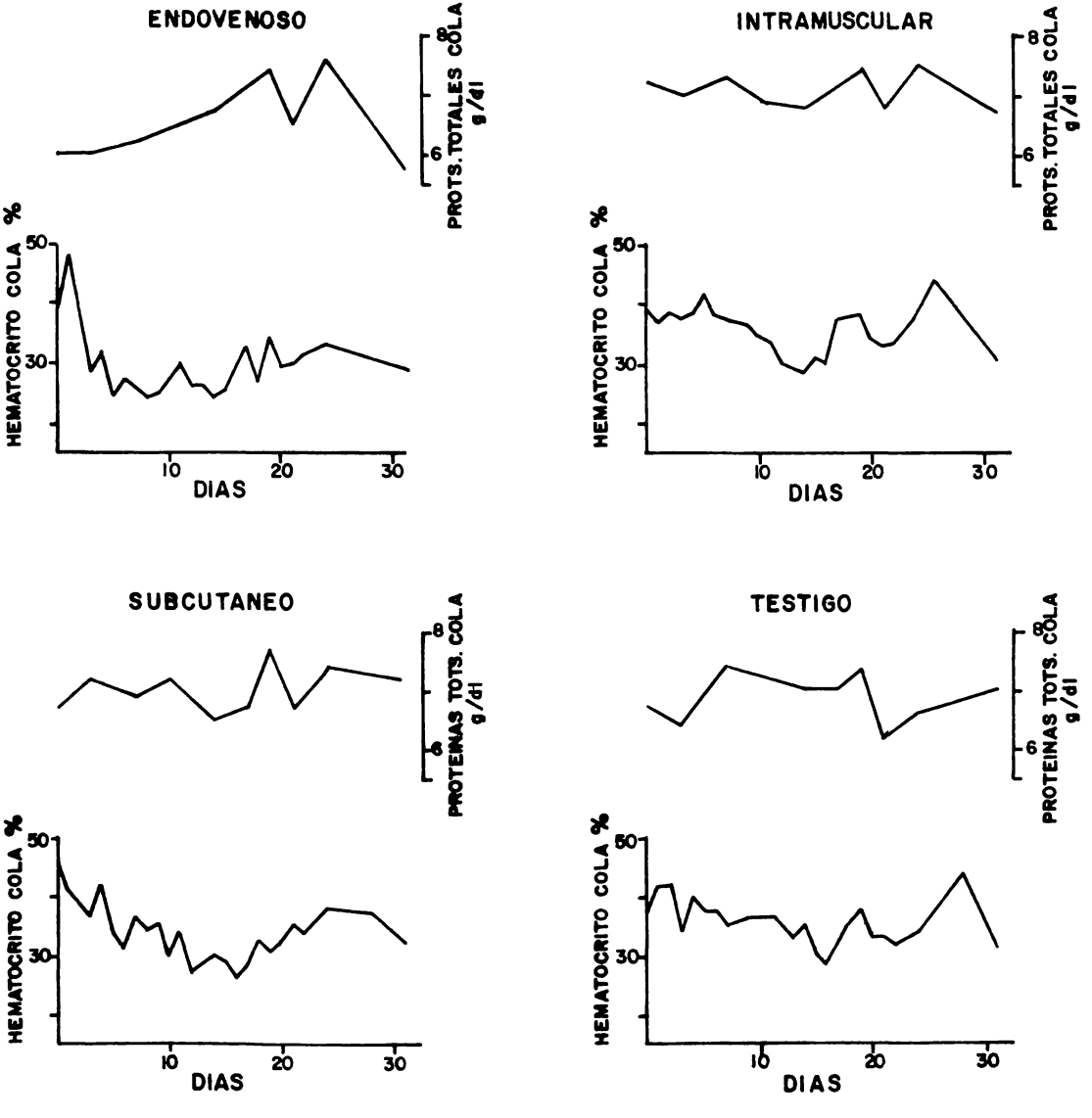
grdfica 3

PORCENTAJE PROMEDIO DE HEMATOCRITO
Y CONCENTRACION DE PROTEINAS TOTALES
DE SUERO DE OREJA EN EL PRIMOINOCULO DE
B. bovis



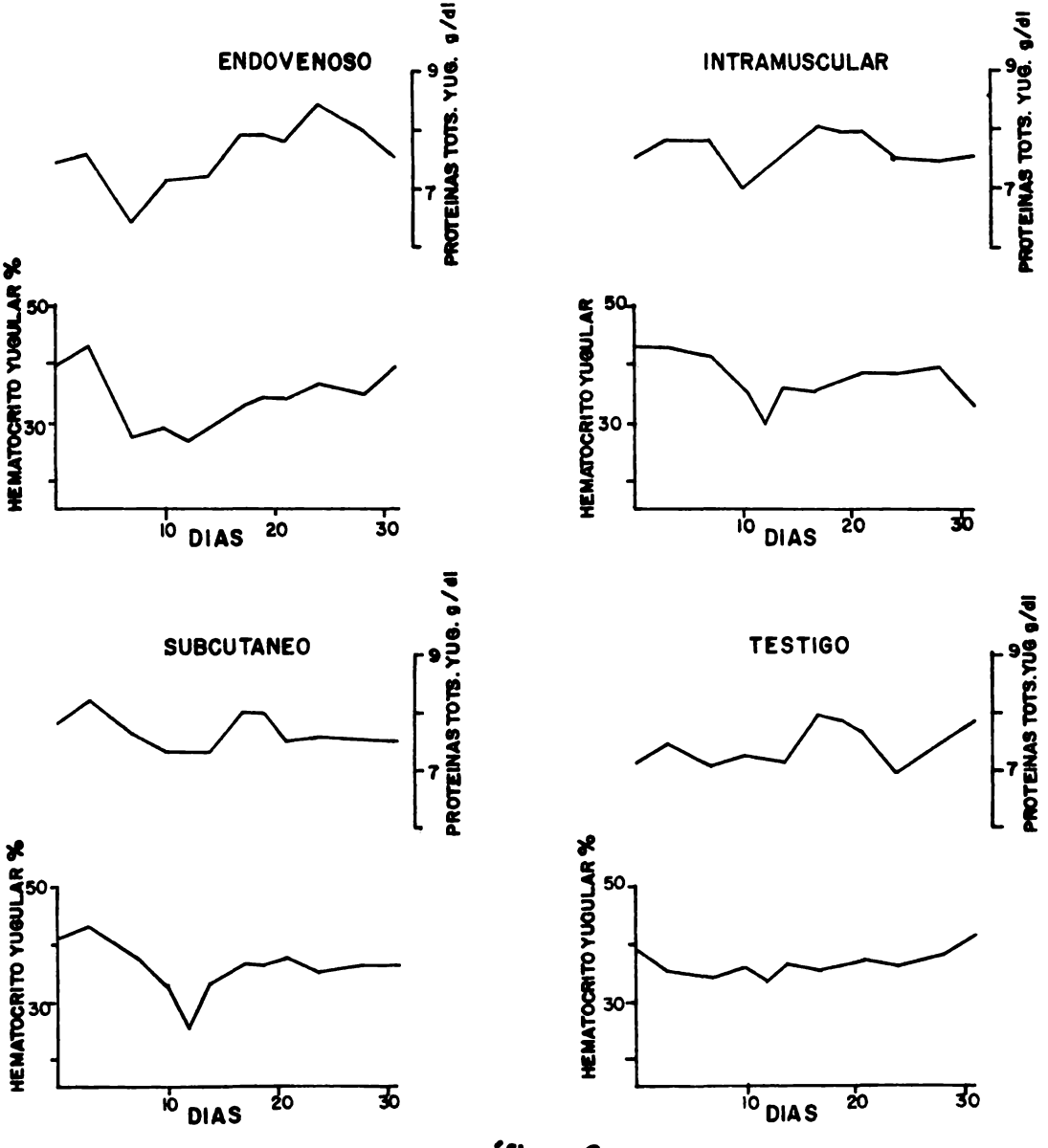
gráfica 4

PORCENTAJE PROMEDIO DE HEMATOCRITO Y CONCENTRACION DE PROTEINAS TOTALES DE SUERO DE COLA EN EL PRIMOINOCULO DE **B. bovis**



grafica 5

PORCENTAJE PROMEDIO DE HEMATOCRITO
Y CONCENTRACION DE PROTEINAS TOTALES
DE SUERO DE YUGULAR EN EL PRIMOINOCULO DE
B. bovis



gráfica 6

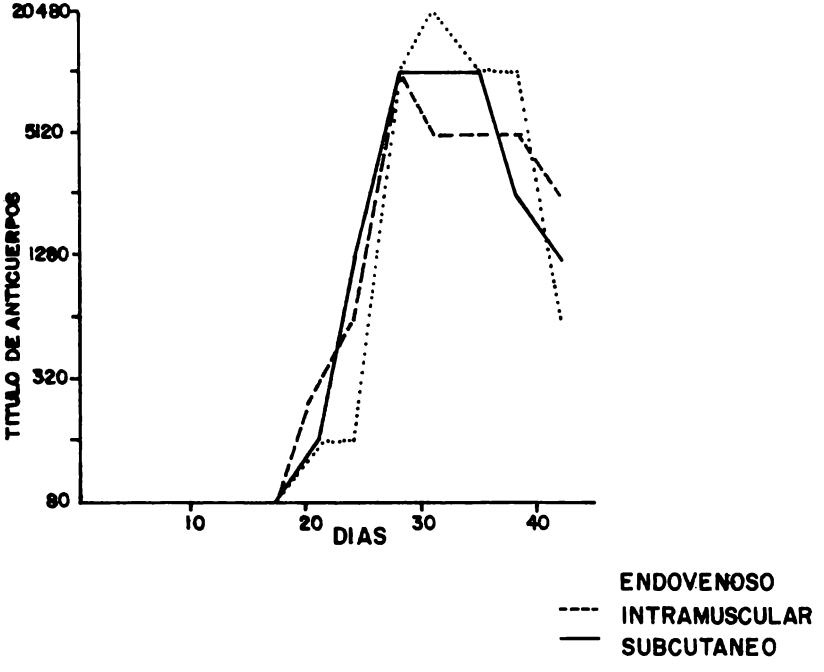
VALORES DE TEMPERATURA Y PORCENTAJE DE HEMATOCRITO DE OREJA PARA LOS PASES DE **B. bovis**

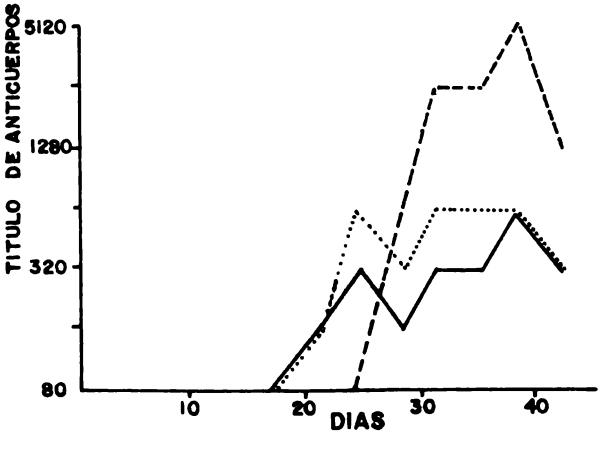
gráfica 7

PRIMER PASE

SEGUNDO PASE

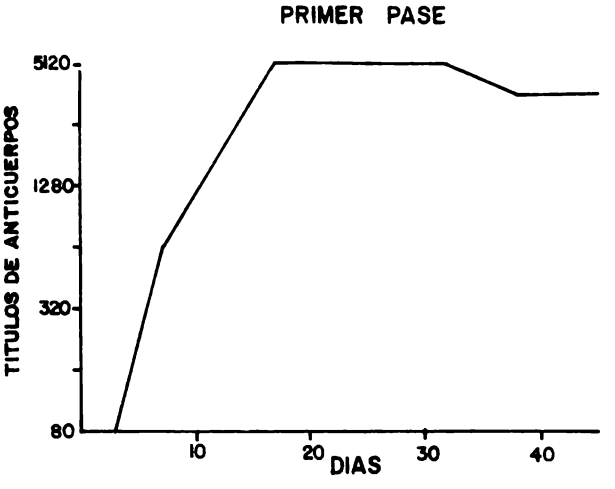
TITULOS DE ANTICUERPOS EN EL PRIMOINOCULO
DE B. **bovis**

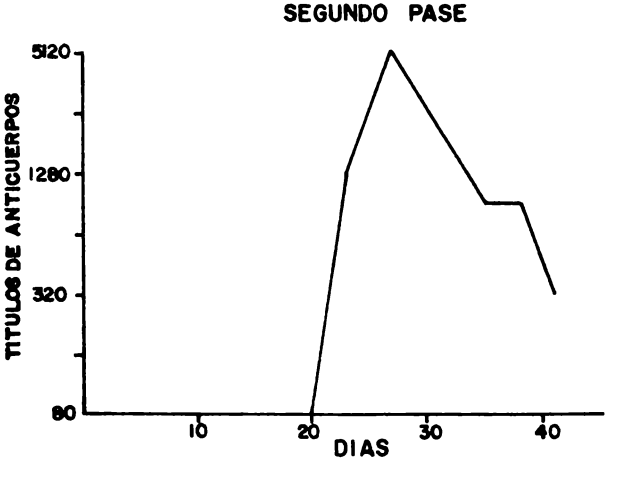




gráfica 8

TITULOS DE ANTICUERPOS EN LOS PASES DE **B. bovis**





gráfica 9