

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN DE UN INMUNÓGENO MIXTO DE *Babesia bovis* Y *Babesia bigemina* DERIVADAS DE CULTIVO *in vitro* EN HEMBRAS JÓVENES Y ADULTAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA  
MARÍA ROSA RIVERA VILLANUEVA

ASESORES  
M.V.Z. PhD GERMINAL JORGE CANTÓ ALARCÓN  
M.V.Z. M.Sc. EDMUNDO ENRIQUE ROJAS MARTÍNEZ

QUERÉTARO, QRO. OCTUBRE 1999

No. ADQ H61437

CLAS 574.233

R6812

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón  
M.Sc. Edmundo Enrique Rojas Martínez

Por su apoyo y confianza en la realización de este trabajo.

Al Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria del estado de Querétaro, en especial al director del rancho GB M.V.Z. Juan Manuel Romo Romero.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) y al CENID-PAVET por el apoyo brindado en este trabajo.

A la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Todos los resultados de investigación obtenidos en la presente tesis, son propiedad del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR).

## JURADO

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón  
M.V.Z. Jorge Luis Saracho Luna  
M. C. Guillermo de la Isla Herrera  
M.V.Z. María de Jesús Chávez López  
Q.F.B. Susana Flores Robles

## RESUMEN

Con el objeto de evaluar si existían diferencias en cuanto a susceptibilidad a la vacunación y desafío contra *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* se utilizó la vacuna mixta de *B. bovis* y *B. bigemina*. Se utilizaron animales altamente susceptibles (10 vacas adultas, 10 vacas jóvenes y 10 machos), los cuales fueron divididos en subgrupos. Un subgrupo de cada uno de los grupos fue inoculado con 100 millones de eritrocitos infectados (ei) con *B. bovis* y 100 millones de ei con *B. bigemina*. El otro subgrupo permaneció como testigo. Todos los animales fueron monitoreados para observar cambios clínicos, hematológicos y serológicos durante 42 días después de la inmunización. Para medir la protección de todos los animales, estos fueron confrontados 74 días después de la inmunización, con aislados de campo de *B. bovis* y *B. bigemina* (100 millones de ei cada uno). Todos los animales fueron monitoreados para observar cambios clínicos, hematológicos y serológicos durante 28 días. Durante la etapa de vacunación no se observaron diferencias entre las hembras adultas y hembras jóvenes en las variables de temperatura rectal (TR) y volumen celular aglomerado (VCA), observándose valores máximos de TR de 39.6 y 39.8°C y valores mínimos de VCA de 28.8 y 29 para las hembras adultas y jóvenes respectivamente. Durante la etapa de confrontación en los grupos no vacunados se observaron claras diferencias entre las hembras adultas y jóvenes en cuanto al descenso de hematocrito, observándose disminuciones de 48 y 35% respectivamente, no observándose lo mismo en los grupos vacunados, lo que nos podría indicar que las hembras adultas pierden susceptibilidad al ser vacunadas llegando a comportarse igual que las hembras jóvenes.

## ÍNDICE

I.	Introducción.....	1
II.	Revisión de Literatura.....	3
III.	Objetivos.....	15
IV.	Material y Métodos.....	16
V.	Resultados y discusión.....	19
VI.	Conclusiones.....	35
VII.	Bibliografía.....	36
VIII.	Apéndices.....	45

## I. INTRODUCCIÓN

Los alimentos de origen animal son una de las fuentes más importantes de proteína de alta calidad, esencial en el desarrollo y en la alimentación del ser humano. La mayoría de los países en desarrollo, se encuentran ubicados en áreas tropicales y subtropicales, las cuales ofrecen un alto potencial de producción pecuaria; sin embargo, también ofrecen condiciones ambientales propicias para el desarrollo de parásitos, los que provocan pérdidas económicas considerables.

Una de las enfermedades que destaca por su gran impacto económico sobre la industria ganadera es la babesiosis bovina (O.I.E., 1981). El impacto económico de la enfermedad en América ha sido estimado por las pérdidas que ocasiona en la ganadería bovina de este continente. Aproximadamente 250 millones de bovinos residen en Centro y Sudamérica, y aproximadamente 170 millones (70%) están en regiones infestadas por garrapatas. Esto representa una pérdida total de 875 millones de dólares por año para la industria ganadera bovina en América Latina (Smith, 1984). La babesiosis causada por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* ha tenido también un impacto serio sobre el desarrollo de la industria ganadera de Australia y Sudáfrica provocando un alto porcentaje de mortalidad en bovinos (McCosker, 1981).

En 1980 se estimó en México, que la babesiosis bovina ocasionó pérdidas anuales de 2712 millones de pesos lo que representó 6.5% del total de pérdidas causadas por enfermedades infecciosas en animales domésticos (O.I.E., 1981).

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

Es importante hacer notar que en los llamados países en desarrollo que están dentro de las latitudes mencionadas existe endémicamente la babesiosis, anaplasmosis y la infestación por garrapatas. El esfuerzo de estas comunidades por importar animales de razas especializadas, para aumentar el potencial de producción, desde Norteamérica y Europa, se ve complicado en la mayoría de los casos por la presencia de babesiosis endémica (Kuttler, 1988). Por otro lado, se tiene contemplada la introducción a nuestro país, de más de 1 millón de vaquillas provenientes de los EE.UU. y Canadá, zonas libres de babesiosis, con el inminente riesgo de alta mortalidad por esta enfermedad.

En nuestro país existe la disponibilidad de cepas atenuadas de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* y se han realizado varios estudios en bovinos machos, enfocados a procedimientos específicos de prevención de la babesiosis (Cantó *et al.*, 1996; Figueroa *et al.*, 1998; Olvera 1998; Cantó *et al.*, 1999).



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### HISTORIA

En respuesta a la notoria persistencia de una enfermedad que atacaba a bovinos, en 1887 el gobierno Rumano estableció una comisión dirigida por el Dr. Víctor Babes para investigar y determinar la causa y dar soluciones al problema. En este estudio se concluyó que la causa de la enfermedad denominada Hemoglobinuria enzoótica, fue un microorganismo intraeritrocítico el cual nombró *Haematococcus bovis* (Babes, 1888).

En 1889 Smith indicó la observación del agente etiológico de la Fiebre de Texas, (Smith, 1889); posteriormente Smith y Kilborne propusieron el nombre de *Pyrosoma bigeminum* (después *Babesia bigemina*) para el parásito de Norteamérica, y establecieron por primera vez que este protozooario puede ser transmitido por un huésped intermediario (*Boophilus annulatus*) (Smith and Kilborne, 1893).

En 1934 Rees determinó que *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* estuvieron involucrados en los Estados Unidos de Norteamérica como agentes etiológicos de la Fiebre de Texas.

### DEFINICIÓN

La babesiosis es una enfermedad parasitaria ocasionada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia*, transmitidos por garrapatas, que afecta a mamíferos domésticos y silvestres causando fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria y muerte (McCosker, 1981).

## TAXONOMÍA Y ETIOLOGÍA

De acuerdo a Levine (1971) y Levine *et al.* (1980), *Babesia* se clasifica de la siguiente forma:

Reino: Protista (Animalia)

Subreino: Protozoa

Rama: Apicomplexa

Clase: Sporozoea

Subclase: Piroplasmia

Orden: Piroplasmida

Familia: Babesiidae

Género: *Babesia*

Se han descrito mas de 70 especies de *Babesia* de las cuales se considera que solo 18 causan enfermedad en diferentes mamíferos domésticos (Levine, 1971).

Muchas especies de *Babesia* en bovinos han sido descritas; sin embargo, en 1976 Hoyte propuso una lista que consistió en 4 especies válidas de *Babesia* en el bovino (Cuadro 1).

Cuadro1. Especies de *Babesia* en bovinos.

ESPECIE	SINÓNIMO
<i>Babesia bovis</i>	<i>Babesia argentina</i> <i>Babesia berbera</i> <i>Babesia colchica</i>
<i>Babesia bigemina</i>	<i>Pyrosoma bigeminum</i> <i>Apiosoma bigeminum</i>
<i>Babesia divergens</i>	<i>Babesia caucasica</i> <i>Babesia occidentalis</i> <i>Babesia korelica</i>
<i>Babesia major</i>	

## DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La babesiosis bovina se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (McCosker, 1981).

*Babesia bovis* y *Babesia bigemina* tienen una amplia distribución mundial que corresponde a la distribución de las garrapatas *Boophilus microplus*, *Boophilus decoloratus* y *Boophilus annulatus* (Quiroz, 1988). En 1981 McCosker, señala que estas especies son las más importantes para la ganadería de América latina, Australia y Sudáfrica.

## EPIDEMIOLOGÍA

Los factores involucrados en la transmisión de la babesiosis son la triada vector, parásito y huésped. A esta se le unen ciertos factores que pueden modificar la transmisión y presencia de la enfermedad, como son:

1. Infección del vector: la infección de la garrapata del género *Boophilus spp.* con *Babesia* inicia desde la ingestión de sangre de un huésped infectado con *Babesia* en el patrón de transmisión, incluyendo el hecho de que *B. bovis* se transmite solo por larvas de *B. microplus* infectadas y no por ninfas o adultas. Las larvas pierden la infección después de haber ocurrido la transmisión impidiéndose de esta forma la transmisión vertical.
2. Edad de las garrapatas: larvas de *B. microplus* sometidas a 14°C y 95% de humedad relativa, han sido capaces de mantener viable a *B. bovis* durante 65 días, además de que las larvas pueden sobrevivir en esas condiciones hasta 200 días.

### 3. Factores físicos:

- Temperatura: a temperaturas de 30-37°C la ovoposición induce el desarrollo de estadios infectivos de *B. bovis* y *B. bigemina* en *B. microplus*.
- Humedad relativa: se considera un nivel óptimo el 80%.

### 4. Factores del hospedero:

- Genética: el ganado *Bos indicus* es más resistente que el *Bos taurus*.
- Edad: los becerros son más resistentes a la enfermedad clínica gracias a la ingestión de anticuerpos calostrales, sin embargo esta inmunidad no impide la infección. Los animales que nacen de hembras susceptibles son mas resistentes a la enfermedad hasta los 8 meses de edad (Alvarez y Cantó, 1985).

La presencia de los tres factores en zonas endémicas, pueden llevar a que se presente el fenómeno de estabilidad enzoótica el cual se puede definir como que la mayoría de los animales de un hato se han infectado con *Babesia* durante los primeros nueve meses de vida, debido a la exposición a garrapatas (Alvarez y Cantó, 1985).

## INMUNIDAD

La inmunidad se adquiere por la exposición del hospedero al parásito vivo o inactivado. La respuesta inmune del hospedero controla la parasitemia destruyendo parásitos, eritrocitos y detiene el crecimiento y multiplicación de *Babesia*.

Los animales que sobreviven a la fase aguda de la infección quedan inmunes a la reinfección con la cepa homóloga, así como aquellos que se mantienen en equilibrio entre vector-parásito y huésped (Alvarez y Cantó, 1985).

## CICLO BIOLÓGICO

Las especies de *Babesia* tienen hospederos específicos en condiciones naturales, excepto *B. microti* y *B. divergens* las cuales han infectado roedores y humanos (Benach *et al.*, 1978; Gorenflot *et al.*, 1990).

La mayoría de los ciclos de vida de la *Babesia spp.* no están completamente estudiados (Young y Morzaria, 1986). Sin embargo, los de las especies económicamente importantes (*B. bovis* y *B. bigemina*) han sido estudiados intensamente (Mehlhorn y Schein, 1984).

**Desarrollo en el vector:** el ciclo de vida de *Babesia* es indirecto, la transmisión entre vertebrados siempre se ve interrumpida por una fase en la garrapata (Smith y Kilborne, 1893).

La infección en la garrapata es adquirida cuando ingiere sangre infectada, generalmente ocurre durante las últimas 16-24 horas antes de desprenderse (Callow, 1968). Los eritrocitos ingeridos son destruidos y los parásitos liberados en el lumen intestinal del artrópodo; la mayoría de los parásitos mueren dentro del intestino de la garrapata y solo una pequeña proporción de las formas sanguíneas sobreviven a la digestión intestinal (Smith, 1978). En las primeras 24 horas dentro del intestino de *B. microplus*, se han identificado diferentes formas de *B. bigemina* y no ha sido posible observar una relación directa entre ellas; con base en características morfológicas y similitudes con otros géneros de Apicomplexa, Young y Morzaria en 1986 sugirieron que podían representar formas semejantes a los gametos y el cigoto respaldados en los trabajos de Riek en 1968 y de Friedhoff y Smith en 1981.

Posteriormente se observan formas esferoides intracelulares, que se convierten en un cuerpo de fisión, este libera hasta 200 formas conocidas como quinetos o vermículos en el lumen intestinal (Friedhoff y Smith, 1981), estos

atravesan el intestino y emigran a la hemolinfa, alcanzando a penetrar los óvulos en el ovario antes que sean cubiertos de quitina.

Puede ocurrir un ciclo secundario de *B. bigemina* dentro de las células del túbulo excretor y los hemocitos de la hembra (Smith, 1978). Posterior a la ovoposición y durante el desarrollo del embrión dentro del huevo, los quinetos invaden las células del intestino, ahí aparentemente igual que en la hembra madre hay formación de otro cuerpo de fisión y liberación de una segunda generación de quinetos (Riek, 1964). Los quinetos liberados alcanzan por medio de la hemolinfa las células de las glándulas salivales, en donde ocurre otra fase de fisión múltiple con la liberación de miles de cuerpos anulares que se transforman en peras o piroplasmas (Smith, 1978), las cuales son las formas infectantes de *Babesia* que inoculan las larvas en el caso de *B. bovis* (Friedhoff y Smith, 1981) o las ninfas y adultos en el caso de *B. bigemina* al bovino (Callow and Hoyte, 1961; Riek, 1964; Morzaria *et al.*, 1977; Potgieter and Els, 1977).

**Desarrollo de la *Babesia* en el bovino:** las formas infecciosas inoculadas por la garrapata al momento de alimentarse, penetran los glóbulos rojos del bovino. (Hoyte, 1965). El mecanismo de entrada del esporozoito al eritrocito es un poco complejo, pero puede explicarse en 5 pasos los cuales son: 1) contacto entre merozoito y eritrocito, 2) la orientación del polo apical del merozoito a la superficie del eritrocito, 3) fusión de membrana entre merozoito y eritrocito, 4) descarga del contenido de las roptrias y 5) invaginación de la membrana del eritrocito y entrada del merozoito (Young and Morzaria, 1986).

Posteriormente hay la formación de una "vacuola parasitófora", la que se diferencia para formar los trofozoitos o estado de alimentación, el cual se encuentra en contacto directo con el citoplasma de la célula huésped. Los merozoitos producidos en los eritrocitos abandonan la célula e inmediatamente invaden mas eritrocitos. Esta división asexual continua indefinidamente hasta que

muere el huésped, hasta que es eliminado el parásito o es ingerido por otra garrapata en la última fase de repleción (Rudzinska, 1981). Este proceso ocurre en la mayoría de las especies por fisión binaria, teniendo como característica una apariencia de un par de merozoitos dentro del eritrocito (Mehlhorn and Schein, 1984).

## SIGNOS

*B. bovis* y *B. bigemina* presentan casi los mismos signos después de un periodo de incubación de 8-14 días (Kuttler, 1986), y se caracterizan por aumento de temperatura de hasta 41°C, que puede permanecer de 3-5 días, anorexia, depresión, debilidad, atonía ruminal, constipación, aumento en la frecuencia cardiaca y respiratoria, agalactia y en animales gestantes puede causar aborto (Osorno, 1978).

*B. bigemina* ocasiona una hemólisis marcada debido a la destrucción de glóbulos rojos, siendo la anemia un signo primario. La sangre se vuelve fluida y oscura y hay una hemoglobinuria muy marcada (Morel, 1989; Morilla, 1978). Secundariamente se dará la ictericia que puede estar correlacionada con parasitemias de hasta 50% (Callow, 1984; Morilla, 1978).

Por otro lado, *B. bovis* no suele ocasionar parasitemias altas (<.5%) en comparación con *B. bigemina* en sangre periférica (>.5%) casi no hay hemólisis, ictericia ni hemoglobinuria (Morel, 1989).

## PATOGENIA

Por lo general *B. bigemina* provoca anemia hemolítica, en donde hay una destrucción masiva de eritrocitos, ocasionado por factores mecánicos y autoinmunes (Morilla, 1981).

El factor mecánico está determinado por el tamaño de *B. bigemina* que al salir puede provocar más fácilmente la ruptura del eritrocito o dañarlo de tal forma que su fagocitosis o destrucción en el bazo sea más fácil (Morilla, 1981; Soulsby, 1987).

Los factores autoinmunes son ocasionados por la presencia de antígenos de *Babesia* en las membranas de los eritrocitos. Otras posibles causas de la anemia hemolítica son:

1. El antígeno de la *Babesia* se adhiere a la superficie de los eritrocitos provocando que estos sean reconocidos como extraños y sean fagocitados por el sistema retículo endotelial.
2. Es posible que el antígeno de la *Babesia* active el sistema properdina, permitiendo la fijación del complemento hasta C3b y C5b que se pegarían en la superficie de los eritrocitos estimulando su fagocitosis.
3. Se pueden formar anticuerpos contra el antígeno que actuarían como opsoninas sobre los eritrocitos.
4. Los anticuerpos podrían fijar el complemento produciéndose C3b y C5b que ayudarían a la fagocitosis de los eritrocitos.
5. Los anticuerpos podrían fijar el complemento hasta C9 provocando la lisis de los eritrocitos.
6. Formación de inmunoconglutininas contra C3b adherido a los eritrocitos, que estimularía su fagocitosis.
7. Sustancias de la *Babesia* alterarían las características de la membrana, provocando la formación de anticuerpos que actuarían como opsoninas, las cuales fijarían el complemento y a través de C3b y C5b aumentarían la fagocitosis además de continuar la fijación hasta provocar lisis (Morel, 1989; Tizard, 1987).



La fagocitosis de los eritrocitos no infectados puede deberse a que antígenos de *Babesia* se adhieren, y también al incremento en la actividad del sistema retículo endotelial, cambios de la membrana aumentando la fragilidad de los glóbulos rojos no infectados lo que podría provocar una lisis espontánea (Wright, 1973).

En el caso de *B. bovis* lo que ocurre es una liberación de sustancias farmacológicamente activas que provocan vasodilatación, estasis sanguíneo y choque, además de una coagulación intravascular diseminada y trombosis pulmonar subsiguiente (Wright, 1973; Callow, 1984; Blood *et al.* 1992).

La infección por *B. bovis* sugiere que las alteraciones hemáticas de anemia y hemoglobinuria no son directamente responsables de la muerte de los animales, sino que se deba a desbalance de órganos y sistemas importantes, detectándose nefropatía, cardiopatía, hepatopatía y coagulopatía. Los cambios detectados son de tipo sistémico que sugieren un choque de tipo anafiláctico, ya que las mayores alteraciones son detectadas 24-48 horas antes de la muerte. Este evento puede tener 2 orígenes: uno por la activación de los sistemas de complemento y contacto plasmático y otro por la acción de una proteasa liberada por el parásito (Larios *et al.* 1984).

## LESIONES MACROSCÓPICAS

A la necropsia, las lesiones producidas están relacionadas principalmente con la destrucción de eritrocitos. La piel y mucosas visibles están pálidas y en ocasiones ictericas, al igual que los órganos internos (Ristic, 1980). Estas lesiones son las siguientes:

- Tejido subcutáneo edematosos o icterico
- Mucosa abomasal presenta inflamación catarral con pequeñas erosiones y hemorragias en la región pilórica

- Petequias en mucosa vaginal (Quiroz, 1988)
- Hepatomegalia (aumentado 2-4 veces su tamaño normal)
- Hígado congestionado y friable con el parénquima ictérico y vesícula biliar agrandada, la bilis está espesa y con coágulos, dando al hígado una coloración moteada
- Grasa perirrenal edematosa e ictérica
- Mucosa de la vejiga hemorrágica y la orina contenida en esta es de color vino (Ristic, 1980)
- La médula ósea se encuentra rojiza (Quiroz, 1988)

### **LESIONES MICROSCÓPICAS**

- Marcada distensión de capilares por los eritrocitos parasitados en cerebro
- Reducción del radio de la pulpa roja y blanca en bazo (Ristic, 1980)
- En hígado hay necrosis centrotubular, infiltración grasa y neutrófilos en las áreas necrosadas
- Capilares del pulmón congestionados con gran cantidad de linfocitos, neutrófilos y macrófagos
- El corazón presenta subendocarditis, subpericarditis y hemorragias periféricas (Quiroz, 1988)

### **DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de la babesiosis en ciertos casos puede ser sencillo cuando los signos y el vector están presentes (Callow, 1984).

En el laboratorio el diagnóstico se puede realizar mediante la revisión de frotis sanguíneos teñidos con colorante giemsa. El frotis es confiable pero requiere una revisión meticulosa y se ha considerado su utilidad en el

reconocimiento del ganado portador de *Babesia* spp. (Callow, 1963). Para apoyar mas este diagnóstico se recomienda hacer la evaluación del hematocrito en donde se espera haya un descenso marcado que pueda ser considerado de importancia (15-25%), esto nos confirma la presencia de la anemia (Morilla, 1978; Callow, 1984).

Otras pruebas que se pueden realizar en el laboratorio son las pruebas serológicas entre las que se encuentran el ensayo inmunoenzimático (ELISA), fijación de complemento (FC), hemoaglutinación indirecta (HI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) la cual es la prueba de elección para la detección de anticuerpos específicos (Osorno, 1978; Juárez *et al.* 1984; Kuttler, 1986).

En la actualidad existe una prueba mediante la cual es posible detectar el ADN del parásito, la cuál es de mucha utilidad para determinar animales portadores. La prueba se conoce como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Figuroa, *et al.* 1992).

Además de las pruebas antes mencionadas, se ha descrito también una técnica de biopsia e impronta de cerebro que ha probado ser de gran utilidad (Osorno, 1978; Figuroa, *et al.* 1992) ya que existe una marcada concentración de eritrocitos infectados en los capilares de cerebro y cerebelo (Osorno, 1978; Kuttler, 1986).

## **CONTROL Y VACUNACIÓN**

En explotaciones donde se presenta la estabilidad enzoótica por infecciones naturales, el empleo de baños garrapaticidas muy seguido podría no ser muy recomendable ya que se interrumpe el balance infección-transmisión creando inestabilidad enzoótica que puede causar severos brotes de la enfermedad. Así mismo, el control en la introducción de ganado también es muy

importante, ya que se debe evitar la entrada de ganado infectado en zonas libres (Vega y Alvarez, 1984).

La inmunización de los bovinos se hace a través de premuniones, es decir, se provoca la infección y se controlan las manifestaciones clínicas mediante la quimioterapia oportuna, de tal manera que se permita un estímulo antigénico suficiente y a la vez se evite la muerte del animal (Osorno, 1978; Figueroa, *et al.*, 1992). Este método de premunición ha sido utilizado en México durante más de 50 años. Algunas de las desventajas de este método es el de transmisión de agentes infectantes al inocular sangre de un animal portador a uno sano (Vega, 1986).

El avance más notable en cuanto a premunición se hizo en Australia. Este método consiste en la utilización de una "vacuna" en la que se utilizan cepas de *Babesia* atenuadas a través de pases seriados en animales esplenectomizados, lo cual brinda un aceptable margen de seguridad. Esta vacuna debe ser aplicada vía parenteral en dosis de  $1 \times 10^8$  eritrocitos infectados, inmediatamente después de su preparación ya que la vida media de este producto es muy corta, por lo que su producción solo puede realizarse bajo pedido. Por esta razón dicho método es muy costoso (Purnell and Lewis, 1981; Vega, 1986).

En México, el desarrollo de inmunógenos vivos a partir de cepas atenuadas derivadas del cultivo *in vitro*, ha sido propuesto como una alternativa en el control de la enfermedad y ha presentado resultados alentadores, tanto para parásitos clonados e irradiados de *B. bovis* (Buening *et al.*, 1986; Salas *et al.* 1988; Cantó, 1996), como para cepas atenuadas de *B. bigemina* (Hernández, 1990; Figueroa, 1998; Olvera, 1998); sin embargo, ninguno de estos estudios ha sido realizado en hembras, las cuales son introducidas a las zonas tropicales en mucho mayor proporción que los machos.

### III. OBJETIVOS

Evaluar la susceptibilidad de hembras jóvenes y adultas a la vacunación con el inmunógeno mixto atenuado de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*.

Evaluar si la vacunación elimina algún posible efecto que pudiese ocurrir debido a la edad de los bovinos, durante el periodo de confrontación.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

**Microorganismos experimentales:** se utilizaron dos cepas de *Babesia* derivadas de cultivo *in vitro*, previamente atenuadas, y conservadas en criopreservación en nitrógeno líquido. *B. bigemina* (BIS-1) (Vega *et al.*, 1985) mantenida y atenuada por pases continuos en cultivo, y *B. bovis* (BOR-1) (Rodríguez, 1985) clonada e irradiada en una fuente de Cobalto<sup>60</sup>, y mantenida en cultivo *in vitro*. Las cepas se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido hasta su uso.

**Animales experimentales:** se utilizaron 34 bovinos *Bos taurus* obtenidos de una zona libre de garrapatas *Boophilus spp.*

Veinte de los animales fueron hembras, 10 de 12 meses de edad y 10 de 24 meses de edad; además y con objeto de poder comparar los resultados con estudios previos, se utilizaron 10 bovinos machos de 14 meses de edad. Los cuatro animales restantes se utilizaron como bovinos multiplicadores de las cepas de confrontación.

A los animales se les tomaron las muestras necesarias para realizar pruebas de: brucelosis, tuberculosis, leucosis, babesiosis y anaplasmosis, y se probó su negatividad a todas ellas antes de ser adquiridos.

### **Esquema de inmunización y confrontación**

Inmunización: Cada grupo consistió en 10 animales. El día 0, cinco bovinos de cada grupo fueron vacunados por vía intramuscular con una dosis de  $1 \times 10^8$  eritrocitos parasitados de cada especie del protozooario, previamente congelados en nitrógeno líquido, y los otros cinco fungieron como grupo testigo (Cuadro 2). Durante 42 días los animales fueron monitoreados llevándolos a una manga de

manejo en donde fueron tomadas: la temperatura rectal y muestras de sangre para posteriormente realizar un frotis sanguíneo, volumen celular aglomerado (VCA) o hematocrito (Benjamín, 1991) y la detección de anticuerpos anti-*Babesia* mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Apéndice 1) (Goldman, 1972).

**Cuadro 2. Grupos de animales experimentales**

GRUPO	NO. ANIMALES	SEXO	EDAD (MESES)
A1	5	H	24
A2	5	H	24
B1	5	H	12
B2	5	H	12
C1	5	M	14
C2	5	M	14

Propagación de las cepas de confrontación: una vez terminado el periodo de inmunización, se procedió a realizar la propagación de las cepas virulentas de desafío para lo cual se utilizaron cuatro animales altamente susceptibles de raza europea libres de enfermedades, que fueron inoculados con una dosis de  $1 \times 10^7$  de cada una de las especies de *Babesia*, utilizando dos animales para cada especie del protozooario. Cada uno de los animales fue monitoreado, incluyendo la observación clínica, medición de la temperatura rectal, observación de frotis sanguíneo para corroborar la presencia del parásito y lectura del VCA. Una vez que los animales se enfermaron, por cada una de las especies de *Babesia*, se realizó el inóculo de confrontación de cada especie para lo cual se consideró el % de parasitemia, cuenta de eritrocitos y dosis a inocular.

Confrontación: setenta y cuatro días después de la inoculación todos los animales fueron confrontados con cepas de campo de *B. bovis* y *B. bigemina*. La dosis de confrontación de ambas cepas fue de  $1 \times 10^8$  eritrocitos infectados (ei). Los animales fueron monitoreados, se tomó la temperatura rectal y muestras de sangre para posteriormente realizar frotis sanguíneo, VCA y la prueba de IFI.



## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método más antiguo y todavía utilizado de vacunación contra la babesiosis bovina se basa en la inoculación de parásitos vivos en ganado susceptible (Mahoney, 1972; Callow *et al.*, 1997). El principio de usar sangre infectada para la vacunación de ganado se basó en observaciones de que la recuperación de infecciones primarias de *B. bovis* y/o *B. bigemina* proveían de una larga inmunidad contra organismos homólogos (Callow y Dalgliesh, 1980;1982).

La evaluación de inmunógenos vivos atenuados de *B. bovis* obtenidos de cultivos *in vitro* fue reportada por Buening *et al.*, (1986) los que demostraron que una clona seleccionada con base en su rápido crecimiento *in vitro* era menos patogénica que la población original. Animales inoculados con los parásitos clonados fueron inmunes en contra del desafío de una población virulenta de *B. bovis*. A partir de ahí se han realizado varios estudios en los cuales se ha observado que poblaciones atenuadas de *B. bovis* o *B. bigemina* pueden ser usadas como vacunas en contra de infecciones de campo (Cantó, 1996; Figueroa, 1998; Olvera 1998).

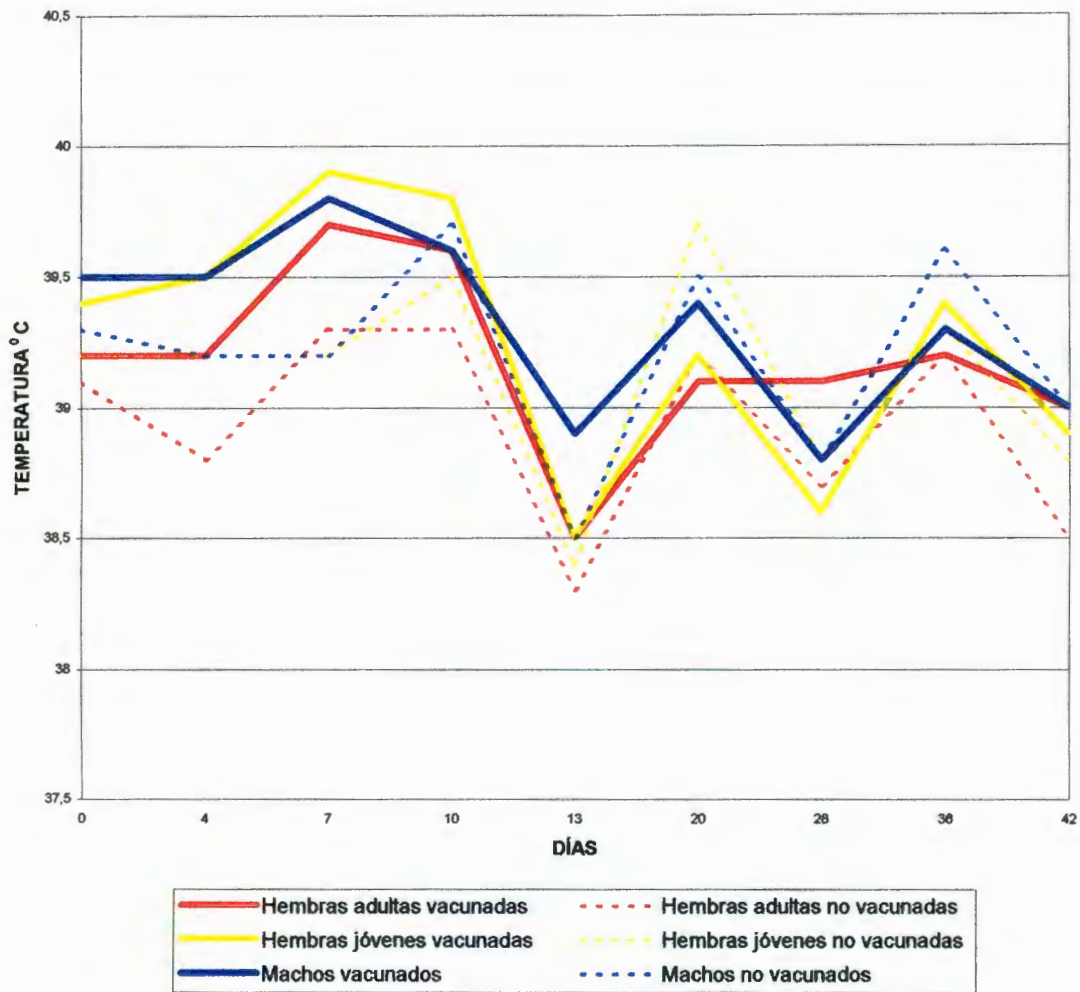
Los resultados del presente estudio muestran la inocuidad de la vacuna tanto en hembras jóvenes como en hembras adultas, ya que en ninguno de los dos grupos se pudieron observar alteraciones de consideración tanto en los valores de temperatura como de VCA (Apéndice 2). Asimismo, en este estudio no se pudieron encontrar diferencias entre la vacunación de animales de 12 y 24 meses de edad. Rogers (1971) indica que la edad puede determinar la severidad de la infección y que se ha reportado una mayor proporción de brotes en animales de 12 a 24 meses de edad viéndose menos afectados los menores de 12 meses. Esto podría indicar que debido a la atenuación sufrida por los parásitos vacunales, la inmunización no produce efectos diferentes entre animales jóvenes y adultos y

que la fuerte inmunización que se produjo tanto en las hembras jóvenes como en las adultas evitó que se presentaran diferencias durante el periodo de confrontación.

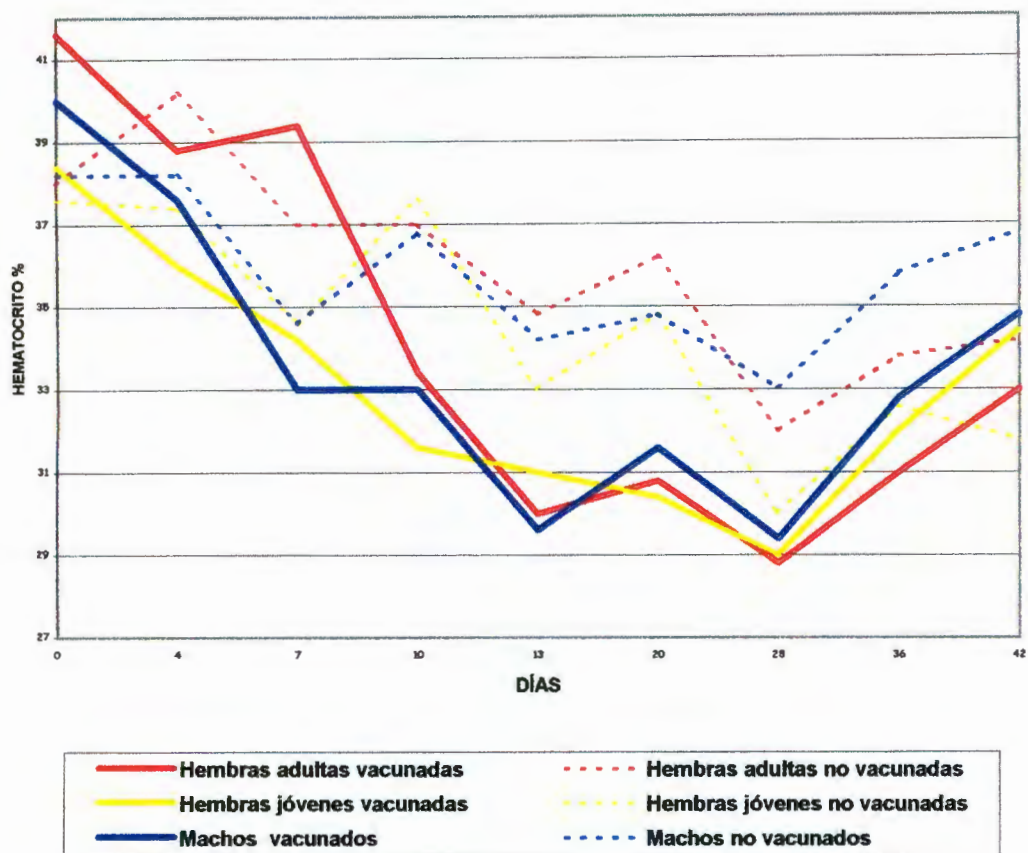
### **1. Fase de vacunación**

**Temperatura rectal:** se observó que todos los grupos de animales inoculados con los hemoparásitos atenuados comienzan a elevar su promedio de temperatura rectal a partir del día 4 posvacunación (PV) llegando al máximo para el día 7 y manteniéndose por arriba de los 39.5°C hasta el día 10 PV para de ahí en adelante sufrir fluctuaciones sin llegar nunca a tener fiebre. El mayor incremento en la temperatura se observó en el grupo B1 siendo de 39.8°C. Además y posterior al incremento de temperatura producido por el protozoario (día 4-10), se observan picos de temperatura rectal, en todos los grupos, superiores a los 39.5°C, así podemos ver temperaturas elevadas los días 10, 20 y 36 PV (Gráfica 1). Estas alzas de temperaturas probablemente fueron debidas a las condiciones climáticas prevalecientes y al estrés al momento de la toma de las muestras.

**Volumen corpuscular aglomerado:** con relación al VCA se observó una baja marcada en los grupos vacunados llegando a la máxima disminución para el día 28 PV. En estos grupos se observaron valores mínimos de 28.8%, 29% y 29.4% para las hembras adultas, hembras jóvenes y machos respectivamente (Gráfica 2), lo que pudo ser producido por una combinación de la destrucción eritrocítica causada tanto por el hemoparásito, así como por un descenso fisiológico normal ya que los animales provenían de zonas áridas en las cuales se presenta hemoconcentración. Esta baja fisiológica se puede observar también en los animales no vacunados en los cuales se observaron valores mínimos de 32%, 31% y



**Gráfica 1.** Comparación del comportamiento de la temperatura rectal promedio de los seis grupos experimentales del día 0 al día 42 posvacunación.



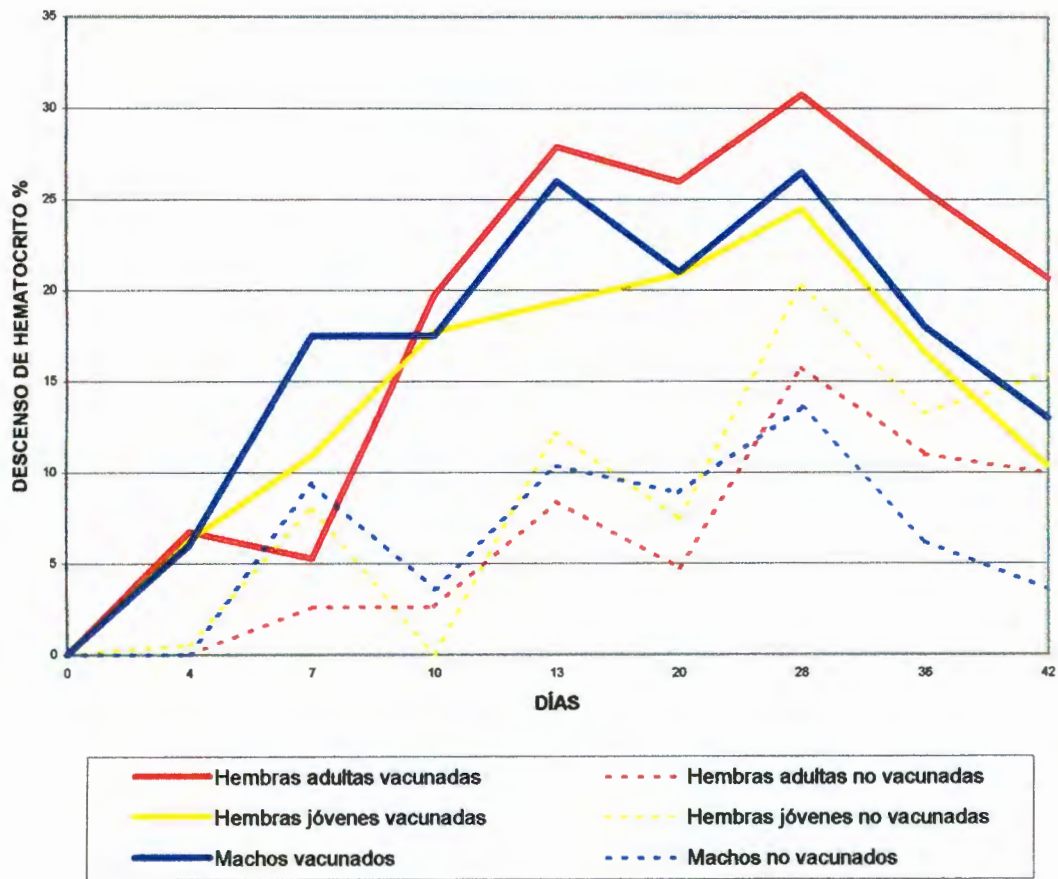
**Gráfica 2.** Comparación del comportamiento de los porcentajes de hematocrito promedio de los seis grupos experimentales del día 0 al día 42 posvacunación.

33% para las hembras adultas, hembras jóvenes y machos respectivamente (Gráfica 2). Resultados similares en cuanto a los descensos fisiológicos en temperatura y VCA fueron observados en animales provenientes de Chihuahua, por Cantó *et al.*, (1996), Figueroa *et al.*, (1998) y Olvera (1998). En estos estudios los animales utilizados en todos los casos fueron machos.

La gráfica 3 nos muestra el porcentaje de descenso del hematocrito de los seis grupos experimentales. Se puede observar que el grupo que sufrió el mayor descenso fue el de las hembras adultas vacunadas con un 30.76% contra el 15.78% de su grupo testigo, seguido por los machos los cuales sufrieron decrementos del 26.5% para los bovinos vacunados contra 13.6% de los animales testigo y por último las hembras jóvenes en las cuales se observaron descenso del 24.47% para las hembras vacunadas contra el 20.21% de las hembras jóvenes testigo.

Estos resultados son parecidos a los observados por Cantó *et al.*, (1996) trabajando con la cepa BOR-1 de *B. bovis* en donde se indica un descenso superior al 26%. De la misma forma Yunker *et al.*, (1987), indican una caída del hematocrito del 49% en animales esplenectomizados vacunados con una cepa atenuada de *B. bovis* cultivada *in vitro*. Bock *et al.*, (1991) utilizando una cepa irradiada de *B. bovis* indicaron una caída del hematocrito de 43.2% en animales que tuvieron una pobre protección contra el desafío.

Por otro lado Hernández (1990) utilizando la cepa BIS-1 de *B. bigemina* determinó una disminución del 25% del VCA en animales inoculados con  $1 \times 10^7$  ei, mientras que Figueroa *et al.*, (1998) utilizando la misma cepa observaron un descenso de solo el 4.8%. Olvera (1998) en un estudio utilizando tanto la cepa BOR de *B. bovis* como la cepa BIS de *B. bigemina* informa de un descenso del



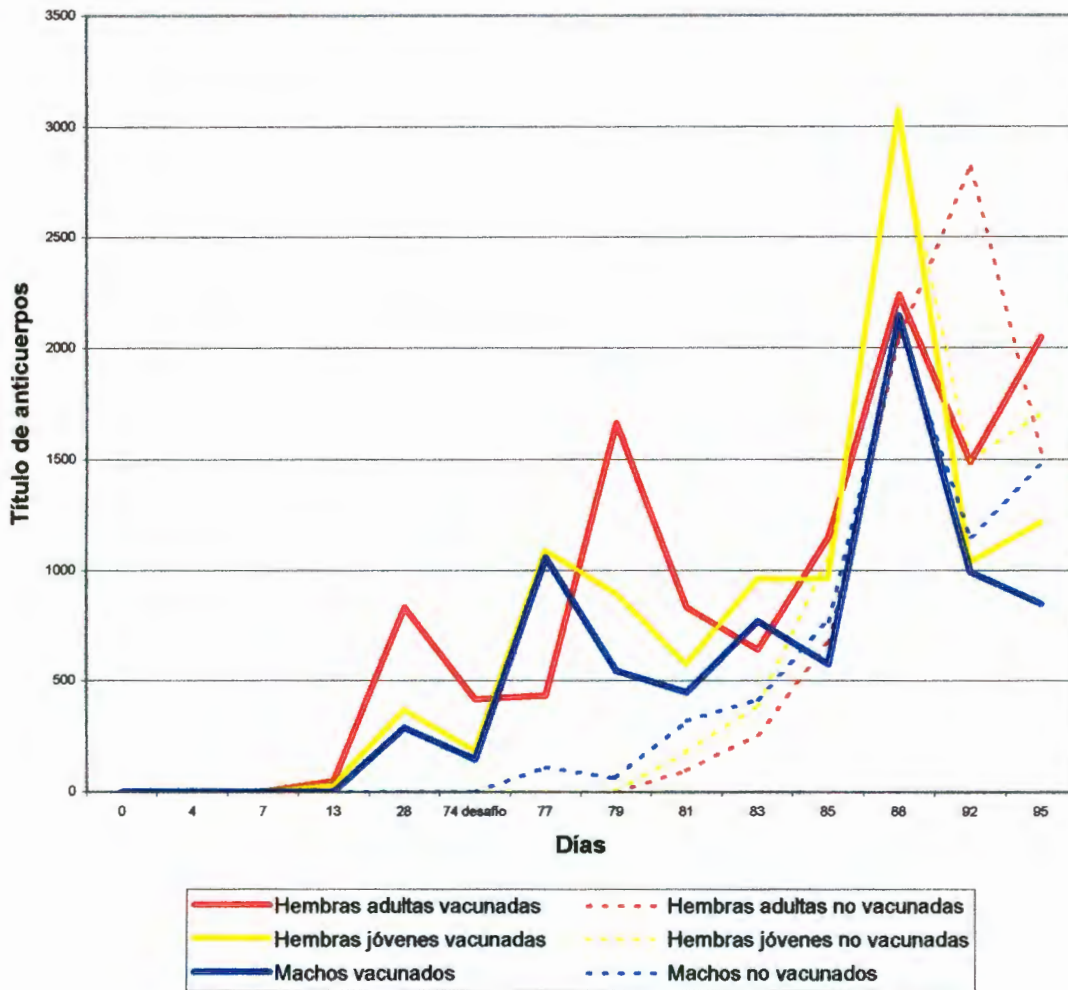
**Gráfica 3.** Comparación en el comportamiento del descenso en el volumen celular aglomerado de los seis grupos experimentales del día 0 al día 42 posvacunación.

32.5% en bovinos inoculados a una dosis de  $1 \times 10^8$  ei previamente congelados en nitrógeno líquido.

Como se podrá observar los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a lo señalado en la literatura , lo que podría indicar que las hembras presentan una susceptibilidad similar a los machos. Es importante mencionar que este es el único estudio en el que se han utilizado hembras como animales experimentales y que las variaciones observadas entre jóvenes y adultas durante el periodo de inmunización fueron mínimas.

**Títulos de anticuerpos:** la infección y subsecuente multiplicación de un organismo de reducida virulencia o atenuado, es un factor deseado en un inmunógeno vivo ya que este al estar circulando por periodos relativamente prolongados puede estimular a el sistema inmune de una manera constante y efectiva (Figuroa *et al.*, 1992). Se ha demostrado que un elevado título de anticuerpos anti-*Babesia* no se correlaciona con protección en animales que son posteriormente confrontados (Mahoney *et al.*, 1976); sin embargo, los títulos de anticuerpos determinados por medio de la prueba de IFI han sido considerados como una evidencia de la infectividad de las cepas vacunales de *Babesia* (Tjornehoj *et al.*, 1996).

En el presente estudio se observó a partir del día 13 PV la presencia de anticuerpos específicos contra *Babesia*, llegando a títulos de 1:832, 1:368 y 1:288 para los grupos A1, B1 y C1 para el día 28 PV. Los grupos no vacunados no presentan títulos de anticuerpos (Gráfica 4).



**Gráfica 4.** Títulos promedio por grupo de anticuerpos específicos contra *Babesia* en los seis grupos experimentales del día 0 al día 77 posvacunación, y del día 79 al día 95 posdesafío.



## 2. Fase de confrontación

Mahoney *et al.*, (1979) realizaron estudios para determinar si la sangre transmitida a partir de infecciones con organismos atenuados o virulentos conferían inmunidad a bovinos comparable tanto en duración como en intensidad a la conferida por la infestación por garrapatas infectadas con *B. bovis*; observando que una sola vacunación con parásitos vivos de *B. bovis* de cepas virulentas o atenuadas inducían la misma protección que la producida por la infección a través de garrapatas.

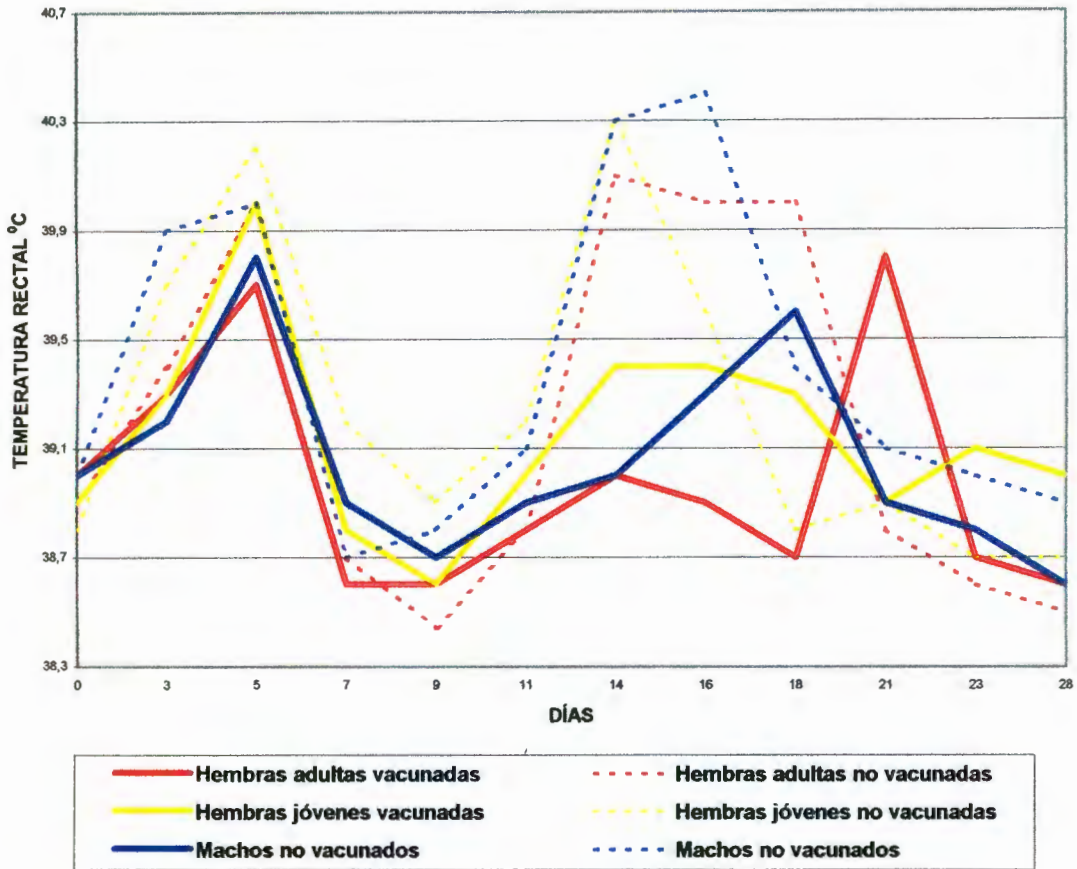
En el presente estudio se utilizaron una cepa atenuada de *B. bigemina* y una clona irradiada de *B. bovis* a 189 grays en una fuente de  $Co^{60}$ . Castro y Canabéz (1968) indicaron que las radiaciones ionizantes de los estadios sanguíneos de *B. bigemina* eliminaron la infectividad del parásito. Bishop y Adams (1974) informaron que la irradiación de *B. bigemina* a dosis de 48-60 krad alteraron los organismos de tal manera que no fue posible detectar parasitemia en los animales inoculados. Wrigth (1984) encontró que fue necesaria la exposición de los parásitos a dosis de 20-50 krad para causar la atenuación de *B. bovis* y que estos parásitos fueron capaces de producir inmunidad contra una confrontación heteróloga, observando también que esta población avirulenta de *B. bovis* no podía ser transmitida a través de garrapatas. Mosqueda *et al.*, (1994) y Hernández (1990) en estudios realizados con las cepas BOR y BIS respectivamente demostraron que ambas no pueden ser transmitidas a través de *B. microplus*.

Los resultados obtenidos durante el periodo de confrontación indican que el inmunógeno mixto de *B. bovis* y *B. bigemina* confirió una sólida inmunidad tanto a hembras jóvenes como a adultas indicando que la edad de los animales antes de ser transportados a las zonas endémicas, si estos son vacunados, no debe de ser un factor que deba tomarse como de principal importancia. Solo un animal de

cada uno de los grupos testigo murió, de las hembras jóvenes y adultas fue para el día 18 posdesafío (PD) y de los machos para el día 21 PD.

**Temperatura rectal:** durante el periodo de desafío se observaron dos picos de incremento de temperatura rectal. El primero debido a la aparición de *B. bigemina* para el día 3 PD y el segundo iniciando para el día 11 PD probablemente causado por *B. bovis* (Gráfica 5). En ambas alzas de temperatura es posible observar, sobre todo en la causada por *B. bovis* que los grupos no vacunados tienen un incremento por arriba de los 40°C lo que no se presenta en los grupos vacunados. En cuanto a las hembras jóvenes y adultas vacunadas, se observa una respuesta similar entre los animales jóvenes y adultos; no obstante que se llega a observar en los adultos un incremento hasta los 39.8°C para el día 21 PD, lo cual pudo ser causado por un estrés en los animales. En cuanto al grupo de vacas jóvenes, estas tienen un comportamiento más estable pero con temperaturas más altas que las hembras adultas, presentando temperatura rectal máxima de 39.4°C.

En el cuadro número 3 se pueden apreciar los días promedio en que los animales en forma individual o por grupo presentan temperatura rectal superior a los 39.5°C. Se pueden apreciar claramente que no existieron diferencias notorias entre los grupos vacunados, vacas adultas, vacas jóvenes y machos en los cuales los días promedio de fiebre por grupo fueron 2, 1 y 2 respectivamente indicando nuevamente que la protección dada por el inmunógeno permite a los animales adultos tener una respuesta similar a la de los bovinos jóvenes. Asimismo se puede apreciar que los animales no vacunados sin importar el grupo tuvieron 6 días de fiebre.



**Gráfica 5.** Comparación del comportamiento de la temperatura rectal promedio de los seis grupos experimentales del día 0 al día 28 posdesafío.

**Cuadro 3. RESULTADOS DE ALGUNAS DE LAS VARIABLES MEDIDAS DURANTE LA ETAPA DE CONFRONTACIÓN**

Grupo n=5	TR > 39,5°C		Desc. 50% HT	Máx. Desc. HT		Valor HT Mín.		Parasitemia (días)			Infección		RIP
	No. anim.	Días prom. Gpo. Anim.		DPD	%	Gpo.	Anim.	Total	bov.	big.	bovis	bigemina	
<b>A1</b>	5	2 1,6	0	23	30,3	23	20	3	1	1,6	5	5	0
<b>A2</b>	5	6 5,6	4	18	48,5	17,6	10	3,2	1	1,8	5	5	1
<b>B1</b>	5	1 2,8	0	21	27,3	25	23	2,6	1	1,6	5	5	0
<b>B2</b>	5	6 5,4	1	18	36,2	20,3	16	3	,8	2,2	5	5	1
<b>C1</b>	5	2 2,2	1	21	29,3	24,6	14	2,2	1	1	5	5	0
<b>C2</b>	5	6 6,0	1	18	40	22,2	14	3	1	2	5	5	1

TR = Temperatura Rectal

HT = Hematocrito

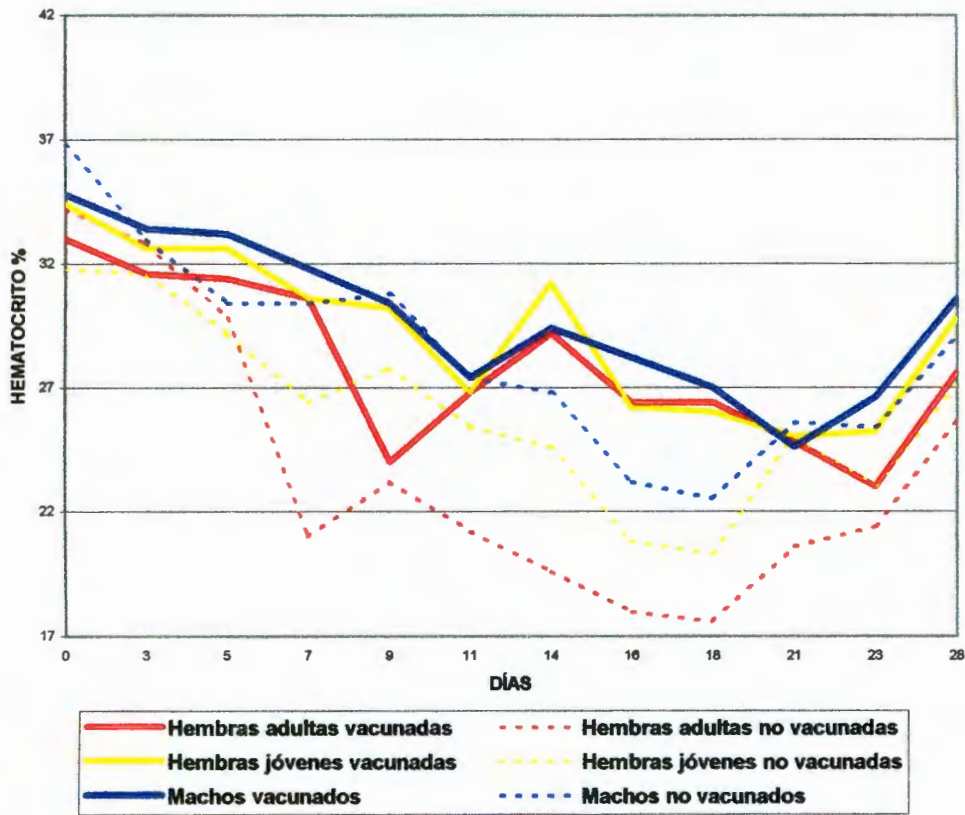
DPD= Días posdesaño

RIP = Muerte

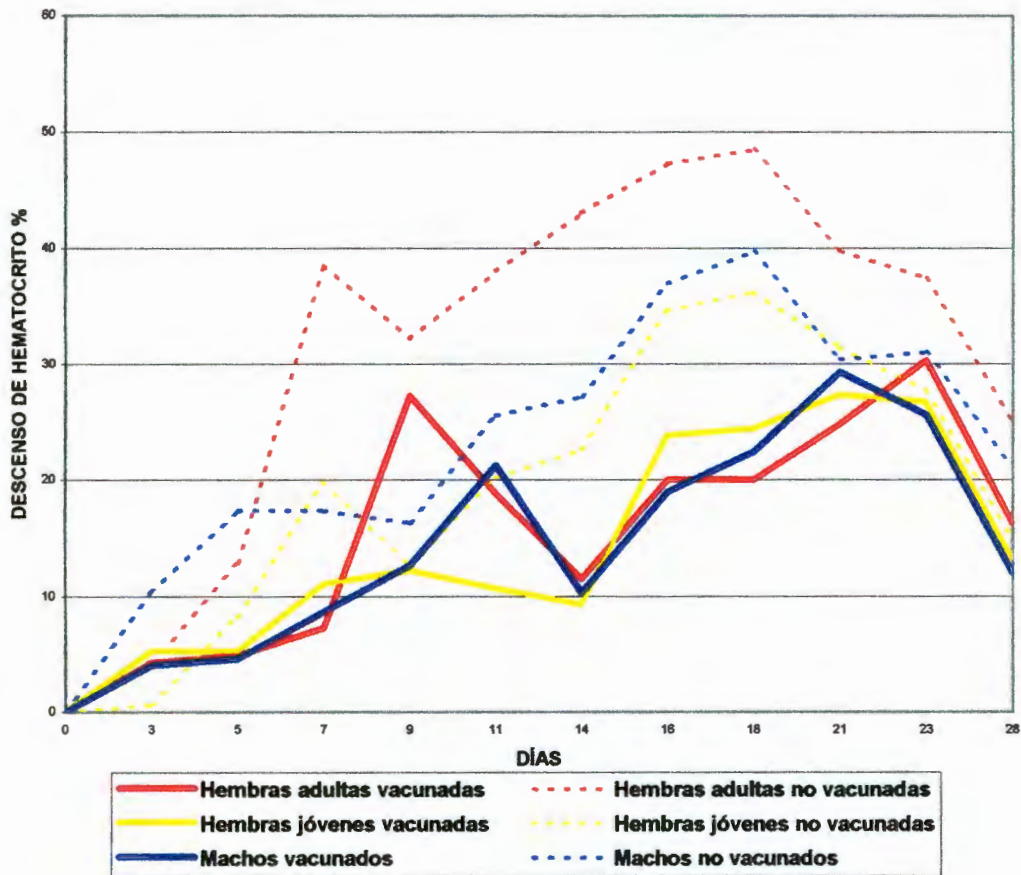
**Volumen corpuscular aglomerado:** en la gráfica 6 podemos observar el promedio del porcentaje de VCA de los grupos de animales experimentales posdesafío, en el cual se observa que los grupos de animales no vacunados sufrieron descensos mayores de hematocrito que los grupos vacunados. En relación a hembras adultas y hembras jóvenes se observa que estas tuvieron un comportamiento muy similar durante el periodo de desafío. Al observar los grupos testigos, en el cuadro 3, podemos observar la susceptibilidad de los animales adultos en comparación con los jóvenes. Se aprecia que 4 de los 5 animales testigos adultos no vacunados sufrieron decrementos superiores al 50% de VCA contra 1 de las hembras jóvenes.

La gráfica 7 nos muestra el porcentaje de descenso de hematocrito PD en donde se aprecia que no existieron diferencias entre hembras adultas y jóvenes vacunadas con descensos máximos de 30.3% y 27.3% respectivamente encontrando el 29.3% de descenso para los machos. En los animales no vacunados los descensos fueron de 48.5%, 36.2% y 40.0% para hembras adultas, hembras jóvenes y machos respectivamente lo que indica nuevamente que las vacas adultas son más susceptibles a la enfermedad que las hembras jóvenes, hecho que no se observa cuando los animales son vacunados previo al desafío. Esto se detectó nuevamente al determinar el hematocrito mínimo por grupo o por animal dentro de los seis grupos experimentales siendo las hembras adultas las que mostraron el promedio mínimo mas bajo de 17.6% y 10% respectivamente (Cuadro 3).

Los resultados de 30.3% y 27.3%, en el descenso de VCA obtenidos en el presente estudio para las hembras adultas y jóvenes vacunadas son similares a los observados por Olvera (1998) de 31% y Rojas *et al.*, (1995) de 32.4%, ambos con desafío de campo, y superiores a los observados por Cantó *et al.*, (1999) donde se indica un descenso del 8.82%.



**Gráfica 6.** Comparación del comportamiento de los porcentajes de hematocrito promedio de los seis grupos experimentales del día 0 al día 28 posdesafío.



**Gráfica 7.** Comparación en el comportamiento del descenso en el volumen celular aglomerado promedio de los seis grupos experimentales del día 0 al día 28 posdesafío.

- Lavar con SSF pH 7.2 durante 10 min.
- Lavar con agua destilada durante 5 min.
- Dejar secar a temperatura ambiente.
- Colocar en cada círculo suero de conejo, antigamaglobulina de bovino conjugada. Debe haberse titulado previamente.
- Colocar las laminillas en una cámara húmeda e incubar a 37° C durante 30 min.
- Lavar con SSF pH 7.2 durante 5 min.
- Lavar con agua destilado durante 5 min.
- Dejar secar a temperatura ambiente.
- Poner una gota de glicerina fosfatada en cada círculo y colocar un cubreobjetos.
- Observar con el microscopio de luz ultravioleta (Goldman *et al.*, 1972).

### FROTIS SANGUÍNEO

- Usar portaobjetos nuevos y limpios previamente sumergidos en alcohol del 95%.
- De preferencia hacer el frotis con sangre recién extraída.
- Colocar una gota de sangre en uno de los extremos del portaobjetos, se toma otro portaobjetos colocándolo en el mismo extremo de la gota en un ángulo de 30° y se desliza suavemente para expandir la gota.
- Posteriormente debe secarse rápidamente ondeándolo en el aire para evitar la crenación de los eritrocitos.
- Debe ser delgado
- Fijar con alcohol metílico el cual es el de uso mas común y dejar secar por dos minutos para solidificar las células y evitar su degeneración autolítica.



- Se utiliza tinción Giemsa, la cual es un colorante excelente para muchos parásitos de la sangre.
- Se diluyen 2 ml de la solución de Giemsa con 8 ml de agua destilada o agua amortiguada de un pH de 6.8.
- Se vierte el colorante diluido en el frotis y se deja teñir durante cinco minutos.
- Se lava, se seca a temperatura ambiente y se observa al microscopio (Benjamín, 1991).

**APÉNDICE 2**

DATOS DE LA TEMPERATURA RECTAL Y VOLUMEN CORPUSCULAR AGLOMERADO DE LA FASE DE VACUNACIÓN

Días Posinoculación

**Grupo A1 Hembras Adultas (1x10<sup>8</sup>)**

	0		4		7		10		13	
Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
430	39,1	37	39,1	32	39,3	39	39,5	28	38,8	27
431	38,9	43	39,3	43	40	37	39,9	32	38,5	28
432	39	50	39,7	41	40,5	46	39,5	43	38	38
433	39	41	39	40	39	37	39,5	34	38,2	26
434	38,8	37	38,8	38	39,6	38	39,4	30	38,8	31
<b>Media</b>	<b>38,96</b>	<b>41,6</b>	<b>39,18</b>	<b>38,8</b>	<b>39,68</b>	<b>39,4</b>	<b>39,56</b>	<b>33,4</b>	<b>38,46</b>	<b>30</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,11402</b>	<b>5,36656</b>	<b>0,34205</b>	<b>4,20714</b>	<b>0,58907</b>	<b>3,78153</b>	<b>0,19494</b>	<b>5,81378</b>	<b>0,35777</b>	<b>4,84768</b>

**Grupo A2 Hembras Adultas (Testigo)**

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
435	39,1	32	39,4	41	40,1	39	39,4	40	38,6	39
436	38,8	39	38,7	37	39,5	35	38,9	33	38,2	33
437	38,1	35	38,9	37	38,7	36	39,3	34	38,5	33
438	39,9	43	38,7	43	39	36	40,3	41	38	34
439	39,1	41	39,3	43	39	39	38,7	37	38	36
<b>Media</b>	<b>39</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40,2</b>	<b>39,26</b>	<b>37</b>	<b>39,32</b>	<b>37</b>	<b>38,26</b>	<b>35</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,64807</b>	<b>4,47214</b>	<b>0,33166</b>	<b>3,03315</b>	<b>0,55045</b>	<b>1,87083</b>	<b>0,61806</b>	<b>3,53553</b>	<b>0,27928</b>	<b>2,54951</b>

**Grupo B1 Hembras jóvenes (1x10<sup>8</sup>)**

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
440	39,1	40	40	38	39,3	34	39,5	35	38,5	40
441	39	40	39,3	40	40,1	34	40,4	34	38,3	30
442	39,2	40	39,2	35	39,5	39	39,6	28	39	27
443	40	36	40	30	40,5	34	40,5	29	38,5	27
444	39	36	39	37	39,6	30	39,1	32	38	31
<b>Media</b>	<b>39,26</b>	<b>38,4</b>	<b>39,5</b>	<b>36</b>	<b>39,8</b>	<b>34,2</b>	<b>39,82</b>	<b>31,6</b>	<b>38,46</b>	<b>31</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,4219</b>	<b>2,19089</b>	<b>0,46904</b>	<b>3,80789</b>	<b>0,4899</b>	<b>3,19374</b>	<b>0,60581</b>	<b>3,04959</b>	<b>0,36469</b>	<b>5,33854</b>

**Grupo B2 Hembras jóvenes (Testigo)**

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
445	38,3	41	38,3	41	38,7	41	39,2	40	38,2	32
446	39,5	31	39,5	34	38,8	29	39,9	31	38,8	35
447	39,5	40	39,5	39	39,6	35	39,6	28	38,3	32
448	39,2	38	39,2	38	39,6	34	39,7	36	38,3	32
449	39,5	38	39,5	35	39,5	34	39,2	33	38,5	34
<b>Media</b>	<b>39,2</b>	<b>37,6</b>	<b>39,2</b>	<b>37,4</b>	<b>39,24</b>	<b>34,6</b>	<b>39,52</b>	<b>33,6</b>	<b>38,42</b>	<b>33</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,51962</b>	<b>3,91152</b>	<b>0,51962</b>	<b>2,88097</b>	<b>0,45056</b>	<b>4,27785</b>	<b>0,31145</b>	<b>4,61519</b>	<b>0,23875</b>	<b>1,41421</b>

DATOS DE LA TEMPERATURA RECTAL Y VOLUMEN CORPUSCULAR AGLOMERADO DE LA FASE DE VACUNACIÓN

Días Posinoculación

Grupo A1 Hembras Adultas (1x10<sup>8</sup>)

	20		28		36		42	
Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
430	39,4	31	39,2	27	39,2	29	38,9	30
431	39,1	32	39,2	30	39,2	33	39	38
432	39,2	34	38,9	29	39,3	32	39	31
433	38,4	29	39,1	30	38,9	30	39,1	36
434	39,5	28	39	28	39,2	31	39	30
Media	39,12	30,8	39,08	28,8	39,16	31	39	33
Desv. Est.	0,43243	2,38747	0,13038	1,30384	0,15166	1,58114	0,07071	3,74166

Grupo A2 Hembras Adultas (Testigo)

	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
435	39,8	40	38,6	38	39,1	41	39,2	35
436	38,7	38	38,4	30	39,1	35	38,3	36
437	38,9	33	38,8	34	39,3	36	39,1	36
438	39,8	39	39,2	30	39,7	31	39	34
439	38,8	31	38,5	28	38,9	26	38,7	30
Media	39,2	36,2	38,7	32	39,22	33,8	38,86	34,2
Desv. Est.	0,55227	3,96232	0,31623	4	0,30332	5,63028	0,36469	2,48998

Grupo B1 Hembras jóvenes (1 x10<sup>8</sup>)

	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
440	39	30	38,5	24	39,4	34	38,8	33
441	39,6	35	37,5	31	39	31	38,6	34
442	38,7	31	38,5	28	39,3	33	38,7	34
443	40,3	28	39	31	39,5	30	39,4	35
444	38,5	28	39,4	31	39,7	32	39	36
Media	39,22	30,4	38,58	29	39,38	32	38,9	34,4
Desv. Est.	0,7328	2,88097	0,71204	3,08221	0,25884	1,58114	0,31623	1,14018

Grupo B2 Hembras jóvenes (Testigo)

	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
445	40	32	39	28	39,7	29	38,6	30
446	39,9	31	39,4	24	39,2	28	38,9	28
447	39,9	37	38,8	35	39,3	32	39,2	35
448	39,5	34	38,3	29	38,8	39	38,5	32
449	39,2	40	38,3	39	39,3	35	38,9	34
Media	39,7	34,8	38,76	31	39,26	32,6	38,82	31,8
Desv. Est.	0,33912	3,70135	0,47223	5,95819	0,32094	4,50555	0,27749	2,86356

DATOS DE LA TEMPERATURA RECTAL Y VOLUMEN CORPUSCULAR AGLOMERADO DE LA FASE DE VACUNACIÓN  
Días Posinoculación

**Grupo C1 Machos (1x10<sup>8</sup>)**

	0		4		7		10		13	
Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
450	39,5	42	39,5	39	40	34	39,4	32	38,8	38
451	39,7	45	39,7	33	39,9	31	40,4	34	39,6	27
452	39,4	37	39,4	36	38,9	35	38,9	36	38,4	31
453	39,4	37	39,4	37	39,7	35	40	32	38,5	30
454	39,7	39	39,7	43	40,3	30	39,5	31	39	32
<b>Media</b>	<b>39,54</b>	<b>40</b>	<b>39,54</b>	<b>37,6</b>	<b>39,76</b>	<b>33</b>	<b>39,64</b>	<b>33</b>	<b>38,86</b>	<b>31,6</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,15166</b>	<b>3,4641</b>	<b>0,15166</b>	<b>3,71484</b>	<b>0,52726</b>	<b>2,34521</b>	<b>0,57706</b>	<b>2</b>	<b>0,47749</b>	<b>4,03733</b>

**Grupo C2 Machos (Testigo)**

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
455	39,3	40	39,3	34	39,3	33	39,8	36	38,3	39
456	39,1	40	39,2	35	39,5	41	39,9	38	39	36
457	39,3	35	39,3	40	39,3	34	39,9	36	38,7	29
458	39,3	42	39,3	40	39,3	32	39,9	37	38	34
459	38,9	34	38,9	42	38,5	33	39,5	37	38,3	33
<b>Media</b>	<b>39,18</b>	<b>38,2</b>	<b>39,2</b>	<b>38,2</b>	<b>39,18</b>	<b>34,6</b>	<b>39,8</b>	<b>36,8</b>	<b>38,46</b>	<b>34,2</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,17889</b>	<b>3,49285</b>	<b>0,17321</b>	<b>3,49285</b>	<b>0,38987</b>	<b>3,64692</b>	<b>0,17321</b>	<b>0,83666</b>	<b>0,39115</b>	<b>3,70135</b>

DATOS DE LA TEMPERATURA RECTAL Y VOLUMEN CORPUSCULAR AGLOMERADO DE LA FASE DE VACUNACIÓN  
Días Posinoculación

Grupo C1 Machos (1 x 10<sup>8</sup>)

Animal No.	20		28		36		42	
	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
450	39,9	35	38,8	35	39,1	38	38,6	34
451	39,5	27	38,9	25	39,4	30	39	29
452	38,5	33	38,3	29	39	35	38,7	31
453	39	31	38,9	28	39,5	30	39,3	32
454	40	32	38,9	30	39,5	31	39,3	38
<b>Media</b>	<b>39,38</b>	<b>31,6</b>	<b>38,76</b>	<b>29,4</b>	<b>39,3</b>	<b>32,8</b>	<b>38,98</b>	<b>32,8</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,63008</b>	<b>2,96648</b>	<b>0,26077</b>	<b>3,64692</b>	<b>0,23452</b>	<b>3,56371</b>	<b>0,32711</b>	<b>3,42053</b>

Grupo C2 Machos (Testigo)

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
455	39,3	37	39,2	32	39,3	40	39,2	40
456	39,8	28	38,4	30	39,8	36	38,7	34
457	40	39	39,4	30	39,2	32	39,1	33
458	39,1	38	39	33	40,3	31	39	41
459	39,5	32	38	40	39,4	40	38,9	36
<b>Media</b>	<b>39,54</b>	<b>34,8</b>	<b>38,8</b>	<b>33</b>	<b>39,6</b>	<b>35,8</b>	<b>38,98</b>	<b>36,8</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,36469</b>	<b>4,65833</b>	<b>0,5831</b>	<b>4,12311</b>	<b>0,45277</b>	<b>4,26615</b>	<b>0,19235</b>	<b>3,56371</b>

DATOS DE LA TEMPERATURA RECTAL Y VOLUMEN CORPUSCULAR AGLOMERADO DE LA FASE DE DESAFÍO

Días Posdesafío

Grupo A1 Adultas (1x10<sup>8</sup>)

	0		3		5		7	
Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
430	38,8	28	39,8	27	40,3	28	38,4	26
431	39,4	37	39,8	37	39,2	34	38,5	38
432	39,1	31	39,2	32	40	34	38,4	32
433	39,1	32	39,1	28	40	25	39,1	25
434	38,9	32	38,8	34	39,2	36	38,6	32
Media	39,06	32	39,34	31,6	39,74	31,4	38,6	30,6
Desv. Est.	0,230217	3,24037	0,444972	4,159327	0,507937	4,669047	0,291548	5,272571

Grupo A2 Adultas (Testigo)

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
435	39,3	36	39,5	38	40,1	35	39,6	22
436	38,6	35	39	35	39,1	34	39,3	22
437	39	32	39,3	29	39,9	28	38,4	23
438	39,1	33	39,2	32	40,9	25	38,3	20
439	39,2	30	39,8	30	39,8	27	38	18
Media	39,04	33,2	39,36	32,8	39,96	29,8	38,72	21
Desv. Est.	0,270185	2,387467	0,304959	3,701351	0,646529	4,4384682	0,690652	2

Grupo B1 Hembras jóvenes (1x10<sup>8</sup>)

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
440	38,6	35	38,4	34	40	32	38,8	34
441	38,9	32	39,3	31	40	33	38,3	34
442	39,3	34	40	31	40,3	32	39	25
443	39,4	34	39,5	33	39,8	32	38,9	32
444	39,1	35	39,3	34	39,8	34	39	28
Media	39,06	34	39,3	32,6	39,98	32,6	38,8	30,6
Desv. Est.	0,320936	1,224745	0,578792	1,516575	0,204939	0,8944272	0,291548	3,974921

Grupo B2 Hembras jóvenes (Testigo)

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
445	38,6	33	40,3	28	41,6	21	39	22
446	39,4	29	40	30	40,4	27	39,2	22
447	39,3	33	39,5	32	39,9	34	39,2	28
448	38,7	33	39	35	39,3	32	39,3	28
449	39,3	33	39,8	33	39,8	32	39,7	30
Media	39,06	32,2	39,72	31,6	40,2	29,2	39,28	26
Desv. Est.	0,378153	1,788854	0,496991	2,701851	0,874643	5,2630789	0,258844	3,741657

DATOS DE LA TEMPERATURA RECTAL Y VOLUMEN CORPUSCULAR AGLOMERADO DE LA FASE DE DESAFÍO

Días posdesafío

Grupo A1 Hembras Adultas ( $1 \times 10^8$ )

9 11 14 16

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
430	38,1	33	39	27	39	30	39	26
431	39	28	38,9	27	38,7	30	39	25
432	38,8	22	38,5	30	39,3	34	38,9	30
433	38,5	24	39,2	20	39	22	38,8	22
434	38,8	33	38,7	30	39	30	38,8	29
Media	38,64	28	38,86	26,8	39	29,2	38,9	26,4
Desv. Est.	0,350714	5,049752	0,270185	4,086563	0,212132	4,38178	0,1	3,209361

Grupo A2 Hembras Adultas (Testigo)

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
435	38,4	24	39,1	22	40,2	23	40,4	22
436	38,6	24	39	23	40,1	18	39,4	16
437	38,2	25	38,5	25	39,4	24	39,4	21
438	38,6	25	38,9	20	40	18	39,8	18
439	38,4	18	38,7	16	40,9	15	41,3	13
Media	38,44	23,2	38,84	21,2	40,12	19,6	40,06	18
Desv. Est.	0,167332	2,949576	0,240832	3,420526	0,535724	3,781534	0,804984	3,674235

Grupo B1 Hembras jóvenes ( $1 \times 10^8$ )

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
440	38,3	30	38,5	28	39	32	39,5	25
441	39	31	39,5	28	40,5	31	40,3	30
442	38,5	27	39	30	39,2	26	38,8	27
443	38,2	31	39,2	27	39,3	35	39,5	23
444	38,9	32	39,2	29	39	32	39,2	26
Media	38,58	30,2	39,08	28,4	39,4	31,2	39,46	26,2
Desv. Est.	0,356371	1,923538	0,370135	1,140175	0,62849	3,271085	0,550454	2,588436

Grupo B2 Hembras jóvenes (Testigo)

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
445	39	19	40	18	41,7	16	40,3	16
446	38,9	25	38,9	25	39	24	39,8	20
447	39	33	39,4	28	41,5	23	38,5	16
448	38,8	28	39	27	39,4	32	39,4	30
449	39	34	38,7	27	39,9	28	40,3	22
Media	38,94	27,8	39,2	25	40,3	24,6	39,66	20,8
Desv. Est.	0,089443	6,140033	0,514782	4,062019	1,230853	5,98331	0,750333	5,761944

DATOS DE LA TEMPERATURA RECTAL Y VOLUMEN CORPUSCULAR AGLOMERADO DE LA FASE DE DESAFÍO

Días posdesafío

Grupo A1 Hembras Adultas (1 x10<sup>8</sup>)

18

21

23

28

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
430	39	25	40,1	22	39	22	39,1	30
431	39	32	41	25	38,3	22	38,9	30
432	38,6	25	38,5	26	38,8	28	38,8	34
433	38,8	22	39,3	23	39,5	20	39	20
434	38,5	28	40,2	28	38,2	23	38,3	24
<b>Media</b>	<b>38,78</b>	<b>26,4</b>	<b>39,82</b>	<b>24,8</b>	<b>38,76</b>	<b>23</b>	<b>38,82</b>	<b>27,6</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,228035</b>	<b>3,781534</b>	<b>0,952365</b>	<b>2,387467</b>	<b>0,531977</b>	<b>3</b>	<b>0,311448</b>	<b>5,549775</b>

Grupo A2 Hembras Adultas (Testigo)

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
435	39,3	23	38,5	25	38,8	27	38,8	32
436	39,5	19	38,3	23	38,2	21	38,1	30
437	40,9	19	40	18	38,7	16	38,6	20
438	40,2	17	38,3	22	38,3	24	38,2	26
439	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP
<b>Media</b>	<b>39,975</b>	<b>19,5</b>	<b>38,775</b>	<b>22</b>	<b>38,5</b>	<b>22</b>	<b>38,425</b>	<b>27</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,727438</b>	<b>2,516611</b>	<b>0,822091</b>	<b>2,94392</b>	<b>0,294392</b>	<b>4,690416</b>	<b>0,330404</b>	<b>5,291503</b>

Grupo B1 Hembras jóvenes (1x10<sup>8</sup>)

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
440	39,2	25	38,3	25	38,5	24	38,3	28
441	40,1	27	38,4	21	39,5	25	39,4	29
442	38,8	25	38,5	25	38,3	23	38,3	30
443	39,2	25	40,3	26	40,1	24	40	28
444	39,5	28	39,1	28	39,1	30	39,2	34
<b>Media</b>	<b>39,36</b>	<b>26</b>	<b>38,92</b>	<b>25</b>	<b>39,1</b>	<b>25,2</b>	<b>39,04</b>	<b>29,8</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,482701</b>	<b>1,414214</b>	<b>0,831865</b>	<b>2,54951</b>	<b>0,734847</b>	<b>2,774887</b>	<b>0,736885</b>	<b>2,48998</b>

Grupo B2 Hembras jóvenes (Testigo)

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
445	38,5	20	40,3	24	39,1	23	39,1	23
446	39,2	16	38	23	38,2	21	38,3	25
447	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP
448	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP
449	38,9	25	38,3	28	38,9	27	38,8	33
<b>Media</b>	<b>38,9</b>	<b>25</b>	<b>38,3</b>	<b>28</b>	<b>38,9</b>	<b>27</b>	<b>38,8</b>	<b>33</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,351188</b>	<b>4,50925</b>	<b>1,250333</b>	<b>2,645751</b>	<b>0,472582</b>	<b>3,05505</b>	<b>0,404145</b>	<b>5,291503</b>



DATOS DE LA TEMPERATURA RECTAL Y VOLUMEN CORPUSCULAR AGLOMERADO DE LA FASE DE DESAFÍO

Días posdesafío

Grupo C1 Machos ( $1 \times 10^8$ )

0 3 5 7

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
450	38,8	35	39,1	37	39,6	40	39,8	36
451	39,3	29	39,7	30	40,4	32	38,3	32
452	38,6	32	38,5	33	39,3	28	38,6	27
453	39,3	31	39	31	39,5	34	38,3	34
454	39,4	37	39,5	36	40,2	35	39,3	30
Media	39,08	32,8	39,16	33,4	39,8	33,8	38,86	31,8
Desv. Est.	0,356371	3,193744	0,466905	3,04959	0,474342	4,3817805	0,665582	3,49285

Grupo C2 Machos (Testigo)

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
455	39,3	37	39,4	34	39,9	32	39,2	26
456	39,4	32	40,1	31	39,7	32	38,5	36
457	39,5	33	40	33	40,8	30	38,3	27
458	39,2	39	39,5	37	40,2	31	39	36
459	39,7	33	40,6	30	39,5	27	38,3	27
Media	39,42	34,8	39,92	33	40,02	30,4	38,66	30,4
Desv. Est.	0,192354	3,03315	0,486826	2,738613	0,506952	2,0736441	0,415933	5,128353

DATOS DE LA TEMPERATURA RECTAL Y VOLUMEN CORPUSCULAR AGLOMERADO DE LA FASE DE DESAFÍO  
Días posdesafío

Grupo C1 Machos (1 x 10<sup>8</sup>)

	9		11		14		16	
Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
450	38,5	33	39,1	30	39	35	38,5	32
451	38,8	30	39,3	28	39,3	25	39	28
452	38	28	38,3	24	38,9	28	39,5	26
453	38,8	32	39,2	26	38,5	28	39,2	27
454	39,3	29	39	29	39,5	31	40,5	28
<b>Media</b>	<b>38,68</b>	<b>30,4</b>	<b>38,98</b>	<b>27,4</b>	<b>39,04</b>	<b>29,4</b>	<b>39,34</b>	<b>28,2</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,476445</b>	<b>2,073644</b>	<b>0,396232</b>	<b>2,408319</b>	<b>0,384708</b>	<b>3,781534</b>	<b>0,74364</b>	<b>2,280351</b>

Grupo C2 Machos (Testigo)

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
455	38,5	29	39,1	28	40,5	28	40	24
456	39,1	37	39,1	30	40,2	31	39,6	25
457	39	27	39,2	28	40,7	25	41	23
458	38,9	34	39,1	25	40,5	27	40,3	24
459	38,5	27	39,3	26	39,9	23	41,3	20
<b>Media</b>	<b>38,8</b>	<b>30,8</b>	<b>39,16</b>	<b>27,4</b>	<b>40,36</b>	<b>26,8</b>	<b>40,44</b>	<b>23,2</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,282843</b>	<b>4,494441</b>	<b>0,089443</b>	<b>1,949359</b>	<b>0,31305</b>	<b>3,03315</b>	<b>0,70214</b>	<b>1,923538</b>

DATOS DE LA TEMPERATURA RECTAL Y VOLUMEN CORPUSCULAR AGLOMERADO DE LA FASE DE DESAFÍO

Días posdesafío

Grupo C1 Machos ( $1 \times 10^8$ )

	18		21		23		28	
Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
450	39,5	29	38,8	23	38,8	25	38,7	33
451	38,5	30	39	29	39,1	26	39,1	32
452	40	28	38,5	26	38,2	26	38,2	30
453	38,9	30	39,5	31	38,8	35	38,8	35
454	41,5	18	38,8	14	39,2	21	39,3	23
Media	39,68	27	38,92	24,6	38,82	26,6	38,82	30,6
Desv. Est.	1,167048	5,09902	0,370135	6,655825	0,389872	5,128353	0,420714	4,615192

Grupo C2 Machos (Testigo)

Animal No.	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA	Temp	VCA
4555	39,1	27	38,9	31	38,9	30	38,9	32
456	39	28	38,8	28	39,1	27	39,2	32
457	39,2	19	39,2	25	39,2	22	39,2	27
458	38,3	23	38,5	30	39	30	39,1	32
459	41,3	14	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP	RIP
Media	39,38	22,2	38,85	28,5	39,05	27,25	39,1	30,75
Desv. Est.	1,130044	5,80517	0,288675	2,645751	0,129099	3,774917	0,141421	2,5

En cuanto a la detección de parásitos en frotis sanguíneos se determinó que en todos los animales de los seis grupos experimentales se pudieron observar ambas especies de *Babesia* (Cuadro 3).

Todos los resultados observados en las variables estudiadas indican claramente que el desafío no fue tan virulento como se pretendía, quizá debido a que las cepas de campo utilizadas en el presente estudio han sufrido cierta

atenuación y probablemente sería necesario realizar un nuevo estudio bajo un desafío de campo, considerando que las diferencias en la susceptibilidad de las hembras adultas y jóvenes desaparecen posterior a la vacunación por lo que sería conveniente conocer si la inmunosupresión que se da durante la gestación y el parto, influye de alguna forma en la respuesta contra la babesiosis.

**Títulos de anticuerpos:** después del desafío se observó una respuesta secundaria inmediata en los grupos vacunados, la cual llegó a títulos de 1:2240, 1:3072 y 1:2144 para los grupos A1, B1 y C1 en el día 14 PD. En cuanto a los grupos no vacunados se detectaron anticuerpos específicos a partir del día 5 PD en el grupo de machos. Los resultados para las hembras adultas y jóvenes vacunadas, fueron similares con relación a los títulos de anticuerpos durante este periodo (Gráfica 4), lo que podría indicar en forma indirecta que ambos grupos presentaron la misma duración de inmunidad contra *Babesia* spp., una vez que los animales resistieron el desafío (Tjornehoj *et al.*, 1996).

## VI. CONCLUSIONES

La aplicación de la vacuna contra babesiosis, indicó que sin importar la edad, las hembras jóvenes y adultas tuvieron el mismo comportamiento, observándose una disminución parecida en el volumen celular aglomerado.

Al desafío de los grupos de hembras jóvenes y adultas no vacunadas, se observó un descenso marcado en ambos grupos en el volumen celular aglomerado siendo este mucho mayor en los animales adultos.

La vacunación eliminó la susceptibilidad de las hembras adultas observándose que tanto estas como las hembras jóvenes, se comportaron de una forma parecida en las variables estudiadas.

En cuanto a la edad mas adecuada para vacunar contra *Babesia* spp. a hembras que van a ser llevadas al trópico, los resultados indicaron que es posible introducir tanto hembras jóvenes como adultas.

Falta realizar estudios en los que se determine cual es el efecto de la vacunación y la confrontación de campo sobre la gestación de los animales; y así, determinar cual es la mejor etapa de preñez en la que los animales vacunados contra babesiosis deben de ser trasladados al trópico.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, J.A. y Cantó, G.J.: Epidemiología de la babesiosis. En: "Parasitología" Vol. Conmemorativo. 25 Aniv. de la Soc. Mex. de Parasitología Vol. 1. 1: 54-72. 1985.
- Babes, V. : Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Paris. 107: 692-694. 1888. Citado por: Kuttler, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: Babesiosis of domestic animals and man. C.R.C Press, Boca Raton, Fl. 1-22. 1988.
- Benach, J.L., White, D.J. and McGovern, J.P.: Babesiosis in Long Island: Host-parasite relationships of rodent- and human- derived *Babesia microti* isolates in hamsters. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27: 1073-1078. 1978.
- Benjamin M.M.: Manual de Patología Clínica en Veterinaria. Editorial Noriega Limusa. 33-39; 87-89. 1991.
- Bishop, J.P. and Adams, L.G.: *Babesia bigemina*: Immune response of cattle inoculated with irradiated parasites. Exp. Parasitol. 35:35-43. 1974.
- Blood, D.C., Radostits, O.M., Arundel, J.H. y Gay, C.L.: Medicina Veterinaria. 7ª. edición en español. Vol. II. Editorial Interamericana McGraw-Hill, México. 1059-1067. 1992.
- Bock, R.E., de Vos, A.J., Kingston, T.G., Shields, I.A. and Dalgliesh, R.J.: Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. Vet. parasitol. 43: 45-56. 1991.
- Buening, G.M., Kuttler, K.L., Rodriguez, S. D.: Evaluation of a cloned *Babesia bovis* organism as a live immunogen. Vet. Parasitol. 22: 235. 1986.

- Callow, L.L. and Hoyte, H.M.D.: Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia spp.* and the cattle tick, *Boophilus microplus*. Aust. Vet. J. 37: 381-390. 1961.
- Callow, L.L.: *Babesia spp.* in the brains of clinically normal cattle and their detection by a brain smear technique. Aust. Vet. J. 39: 25-31. 1963.
- Callow, L.L.: The infection of *Boophilus microplus* with *Babesia bigemina*. Parasitology. 58: 663-670. 1968.
- Callow, L.L. and Dlagliesh, R.J.: The development of effective, safe vaccination against babesiosis and anaplasmosis in Australia. In Johnston, L.A.Y. and Cooper, M.G. (eds.) Ticks and Tick-Borne Diseases. proc. 56<sup>th</sup> Ann. Conf. Aust. Vet. Assoc. Townsville, Australia. pp. 4-8. 1980.
- Callow, L.L. and Dalsgliesh, R.J.: Immunity and immunopathology in babesiosis. In Cohens, S. and Warren, K.S. (eds.) Immunology of parasitic infections. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England. pp. 475-526. 1982.
- Callow, L.L. Protozoal and Rickettsial Diseases. In: Animal Health in Australia. Vol. 5. Australian Government Publishing Service. 123-160. 1984.
- Callow, L.L., Dalgliesh, R.J. and de Vos, A.J.: Development of effective living vaccines against bovine babesiosis - The longest field trial?. Int. Parasitol. 27 (7) : 747-767. 1997.
- Cantó, G.J., Figueroa, J.V., Alvarez, J.A., Ramos, J.A., Vega, C.A.: Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivado de cultivo *in vitro*. Tec. Pecu. Mex.34:127. 1996.

- Cantó, G.J., Figueroa, J.V, Ramos J.A., Alvarez, J.A. y Mosqueda J.J.: Evaluación de la patogenicidad y capacidad protectora de un inmunógeno fresco combinado de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. Vet. Mex. 30:215-220. 1999.
- Castro, E.T., y Canabéz, F.: Propiedades biológicas y características de *Babesia bigemina*: Efectos de radiaciones iónicas sobre la infecciosidad de sangre total infectada. Bol. Chileno. Parasitol., 23:30-33. 1968.
- Figueroa, J.V., Chieves, L.P., Jhonson, G.S. and Buening, G.M.: Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by Polymerase Chain reaction amplification. J. Clin. Microbiol. 30 (10): 2576-2582.1992.
- Figueroa, J.V., Cantó, G.J., Alvarez, J.A., Lona, R., Ramos, J.A., Vega, C.A.: Capacidad protectora en bovinos de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro*. Tec. Pecu. 36:95. 1998.
- Friedhoff, K.T. and Smith, R.D.: Transmission of *Babesia* by ticks. En Babesiosis. Ed. M. RisOtic and J. P. Kreier, 267-321. Academic Press, Inc. New York, U.S.A. 1981.
- Goldman, M., Pipano, E., Rosenberg, A.S.: Fluorescent antibody tests for *Babesia bigemina* and *Babesia berbera*. Res. Vet. Sci. 13:77. 1972.
- Gorenflot, A., Brasseur, P., Bonmarchand, G., Lanelle, D. and Simonin, D. Deux cases graves de babésiosis humaines traités avec succès. Presse Médicale. 19:3335. 1990.
- Hernández, R. Estudio sobre el efecto de cuatro asilamientos de *Babesia bigemina* en bovinos y garrapatas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 1990.
- Hoyte, H.M.D.: Further observations on the initial development of infections with *Babesia bigemina* J. Protozool. 12: 83-85. 1965.



- Hoyte, H.M.D.: The tick fever parasites of cattle. Proc. R. Soc. Queensl. 87: v-xiii. 1976. Citado por: Figueroa, J.V.: "Studies of antigen identification and characterization of the protozoan parasite of cattle *Babesia bigemina*". Tesis de doctorado (PhD). College of Veterinary Medicine, University of Missouri Columbia, Columbia, MO. 5-86. 1989.
- Juárez, J., Figueroa, J.V., Campos, R., Cantó, G.J. Inmunización en contra de *Babesia bovis*. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. 223. 1984.
- Kuttler, K.L. Enfermedades exóticas de los animales, su prevención, su diagnóstico y control. Comisión México-Americana para la prevención de Fiebre aftosa. México, D.F. 39.98. 1986.
- Kuttler, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: Babesiosis of domestic animals and man. C.R.C. Press, Boca Raton, Fl., 1-22. 1988
- Larios, G.F., Monroy, J.B., Márquez, R., Fajardo, R., Smith, R. Patogenia y Fisiopatología de la babesiosis bovina. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. 230-232.1984.
- Levine, N.D. Taxonomy of the piroplasm. Trans. Am. Microsc. Soc. 90:2-33.1971.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich III, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. and Wallace, F.G. A newly revised classification of the protozoa. J. Protozool. 27:37-58.1980.
- 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. 20:119. 1967.

- Mahoney, D.F. Immune response to hemoprotozoa. II. *Babesia* spp. In Soulsby, E.J.L. (ed.), Immunity to animal parasites. Academic Press, New York, pp. 301-341. 1972.
- Mahoney, D.F., Wright, I.G. and Goodger, B.V.: Immunity in cattle to *Babesia bovis* after single infections with parasites of various origin. Aust. Vet. J. 55:10-12. 1979.
- McCosker, P.J. The global importance of babesiosis. In: "Babesiosis". Edited by M. Ristic & I. Kreier. Academic Press, New York, N.Y., 1: 24-27. 1981.
- Mehlhorn, H. and Schein, E. The piroplasms: Life cycle and sexual stages. In Baker, J.R. and Muller, R. (eds.), Advances in Parasitology, Vol. 23. Academic Press, New York, pp 37-103. 1984.
- Morel, P.C. Tick-borne diseases of livestock in Africa. En: Manual of tropical Veterinary Parasitology. Edited by Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux y Technical centre for Agricultural and Rural Co-operation. Published by: CAB International. English edition. 353-390.1989.
- Morilla, A.G. Inmunología de la babesiosis bovina. En: Memorias del curso de actualización de las enfermedades parasitarias del ganado bovino. UNAM. 41-56.1978.
- Morilla, A.G.: Inmunología de la babesiosis. Ciencia Veterinaria. Méx. 3:240-275.1981.
- Morzaria, S.P., Young, A.S. and Hudson, E.B.: *Babesia bigemina* in Kenya: Experimental transmission by *Boophilus decoloratus* and the production of tick-derived stabilates. Parasitology. 74: 291-298. 1977.

- Mosqueda, J.J., Rojas, E.E., Álvarez, J.A., Figueroa, J.V., Hernández, R., Ramos, J.A., y Vega, C.A.: Evaluación de la transmisibilidad de una cepa irradiada de *Babesia bovis* por garrapatas *Boophilus microplus*. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Acapulco, México. 185. 1994.
- OIE: Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. Bull. Off. Int. Epiz. 93: 903-915. 1981.
- Olvera, A.M.: Capacidad Protectora de diferentes dosis de inmunógeno congelado mixto de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Querétro. 1998.
- Osorno, E.M.: Babesiosis en México. Estudio recapitulativo. Vet.Mex. 9: 203-216. 1978.
- Potgieter, F.T. and Els, H.J.: Light and electron microscopic observation on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymphs, and nonreplete females of *Boophilus decoloratus*. Onderstepoort J. Vet. Res. 44: 213-232. 1977
- Purnell, R.E. and Lewis, D. *Babesia divergens*: Combination of dead and live parasites in an irradiated vaccine. Res. Vet. Sci. 30: 18-21. 1981.
- Quiroz, H.: Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. 2ª. edición. Editorial LIMUSA. México, D.F. 187-201. 1988.
- Rees, C.W.: Characteristics of the piroplasm *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* in the United States. J. Agric. Res. 48: 427. 1934. Citado por: Kuttler, K.L.: World-wide impact of babesiosis. In: Babesiosis of domestic animals and man. CRC Press, Boca Raton, Fl. 1-22. 1988.

- Riek, R.F.: The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust. J. Agric. Res. 15: 802-821. 1964.
- Riek, R.F.: Babesiosis. In: Infectious blood diseases of man and animals. Edited by D. Weinman and M. Ristic. 2: 219-268. Academic Press. Inc. New York, U.S.A. 1968.
- Ristic, M.: Protozoal Diseases. Bovine Medicine and Surgery; American Veterinary Publications Inc. California. 335-369.1980.
- Rodríguez, S.D.: Immunochemical characterization of *Babesia bovis* clones. Ph D Dissertation. University of Missouri, Columbia. 1985.
- Rogers, R.J.: An evaluation of tick fever outbreaks in northern Queensland in recent years, Aust. Vet. J. 47: 415-417. 1971.
- Rojas, E.E., Figueroa, J.V., Vega, C.A., Ramos, J.A., Álvarez, J.A., Mosqueda, G.J.J., Cantó, G.J. y Valencia, C.S.: Evaluación de un inmunógeno combinado de *Babesia bovis* y *Babesia biogemina*. I. Desafío de campo de bovinos inmunizados antes de su introducción a una zona endémica. Vet. Méx. 26 (D2):27. 1995.
- Rudzinska, M.A.: Morphologic aspects of Host-Cell-Parasite Relationships in Babesiosis. In Babesiosis. Ed. M. Ristic and Julius P. Kreier, 87-141. Academic Press Inc. New York, U.S.A. 1981.
- Salas, T.E., García, G.J., Ramos, A.J., Rodríguez, R.E., Aboytes, T.R., Buening, G.M. y Vega, C.A.: Patogenia de una clona irradiada de *B. bovis* obtenida en cultivo *in vitro*. Tec. Pecu. Mex. 26:36-45. 1988.
- Smith, R.D.: Ciclo biológico de *Babesia* en la garrapata. En: Ciencia Veterinaria. Editor Moreno Chan R. 2: 233-264. U.N.A.M., D.F., México, 1978.

- Smith, R.D. Epidemiology of babesiosis In: *Malaria and Babesiosis research findings and control measures*. Edited by: Ristic, M., Ambrose-Thomas, P. and Kreier, J.P. *Martinus Nijhoff Publishers* Boston. 213-232. 1984.
- Smith, T.: Preliminary observations on the microorganism of Texas fever. *Med. News Philadelphia*, Dec. 21, 1889, pp. 689-693. 1889.
- Smith, T. and Kilborne, F.L.: Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. U.S. Department of Agriculture, Bureau of animal Ind. Bull. Bur. Anim. Ind. U.S. Dep. Agri. 1:1-301. 1893.
- Soulsby, E.J.L.: *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7ª. edición Editorial Interamericana. 718-741. 1987.
- Tizard, I.: *Veterinary Immunology*. 3<sup>rd</sup>. edition. W.B. Saunders Company. 233-247. 1987.
- Tjornehoj, K., Lawrence, J.A., Whiteland A.P., Kafuwa, P.T.: Field observations on the duration of immunity in cattle after vaccination against *Anaplasma* and *Babesia* species. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 63:1. 1996.
- Vega, C.A., Alvarez, J.A.: Control de la babesiosis Bovina. *Memorias de la reunión de investigación Pecuaria en México*. 84-89. 1984.
- Vega, C.A., Buening, G.M., Green, T.J. and Carson, C.A.: *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am. J. Vet. Res.* 46:416-420. 1985.
- Vega, C.A.: Cultivo *in vitro* de *Babesia* spp. y su potencial en el diagnóstico y profilaxis; Seminario internacional de parasitología animal. México. 78-83.1986.

- Wright, I.G.: Osmotic fragility of erythrocytes in acute *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in splenectomized *Bos taurus* calves. Res. Vet. Sci. 15: 299-305. 1973.
- Wright, I.G.: Nuclear Techniques in babesiosis and anaplasmosis. In nuclear techniques in tropical animal diseases and nutritional disorders. *International Energy Agency*. Vienna. 169-187. 1984.
- Young, A.S. and Morzania, S.P.: Biology of *Babesia* Parasitol. Today 2 (8): 211-219. 1986.
- Yunker, C.E., Kuttler, K.L. and Johnston, L.W.: Attenuation of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. Vet. Parasitol. 24: 7-13. 1987.

## VIII. APÉNDICE 1

### Técnicas de laboratorio utilizadas

#### MICROHEMATOCRITO

- Se usan tubos capilares lisos (75mm x 1mm) y se llenan aproximadamente a 1 cm del borde.
- Se sostiene el tubo en posición casi horizontal para facilitar el llenado.
- El extremo libre se sella acercándolo a la flama de un mechero o con plastilina.
- Se colocan los tubos en la microcentrífuga de tal manera que los extremos sellados queden hacia la periferia.
- Se centrifuga por 5 min. de 10,000-13,000 rpm o por 2 min. a 16,000 rpm.
- Se retiran los tubos y se lee el porcentaje del VCA (volumen celular aglomerado) utilizando cualquiera de los diferentes lectores para tubo de hematocrito (Benjamín, 1991).

#### INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

- Fijar el frotis de glóbulos rojos infectados con *Babesia* en metanol durante tres minutos y dejar secar a temperatura ambiente.
- Hacer tres círculos sobre el frotis con el lápiz marcador.
- Colocar el suero problema, el suero control positivo y el control negativo (uno en cada círculo). Se recomienda diluir los sueros por lo menos 1:20 en SSF, pH 7.2 para evitar la fluorescencia inespecífica.
- Colocar los frotis en una cámara húmeda e incubar a 37° C durante 30 minutos.