

2019

Importancia del calostro en la presentación de babesiosis y  
anaplasmosis en becerros de zonas endémicas de  
*Rhipicephalus microplus*.

Mv. Luisa Fernanda Patiño Botello



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales

Importancia del calostro en la presentación de babesiosis y  
anaplasmosis en becerros de zonas endémicas de *Rhipicephalus*  
*microplus*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

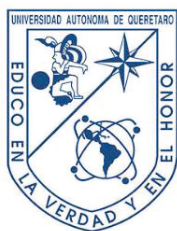
Presenta:

Mv. Luisa Fernanda Patiño Botello

Dirigido por:

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Querétaro, Qro. Septiembre , 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Importancia del calostro en la presentación de babesiosis y anaplasmosis en  
becerros de zonas endémicas de *Rhipicephalus microplus*.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta:

Mv. Luisa Fernanda Patiño Botello

Dirigido por:

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Santiago de Querétaro, Qro.27 Septiembre 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Importancia del calostro en la presentación de babesiosis y anaplasmosis en  
becerros de zonas endémicas de *Rhipicephalus microplus*.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestra en salud y producción animal sustentable

Presenta:

Mv. Luisa Fernanda Patiño Botello

Dirigido por:

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

SINODALES

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Presidente

Dr. Feliciano Milián Suazo

Secretario

M. en C. Diego Josimar Hernández Silva

Vocal

M. en SPAS Roberto Ilwikatzin Guerrero Solorio

Vocal

Dr. Carlos A. Vega y Murguía

Vocal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

27 de septiembre de 2019

México

**DEDICATORIA**

*Este trabajo está dedicado a mi familia y a Mi:*

*Como muestra de que la constancia, la persistencia y el  
trabajo arduo te abren miles de puertas.*

*Y seguir las pasiones siempre dará fruto y satisfacción.*



## AGRADECIMIENTOS

- ❖ *Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca que me otorgo durante mis estudios de maestría.*
- ❖ *A mi familia por su apoyo incondicional y por siempre estar en cada paso que di durante este proceso.*
- ❖ *Al Doctor Germinal, por la oportunidad, apoyo incondicional y por confiar en mí.*
- ❖ *Al Doctor Carlos Vega y a su familia, por la amistad y el apoyo brindado.*
- ❖ *Al comité de tutores, por sus enseñanzas.*
- ❖ *Al doctor Manuel Campos y a IMMUNAXIS por la financiación del proyecto.*
- ❖ *A los Doctores Calderón y Preciado y a la maestra Elizabeth Salinas del INIFAP por su apoyo y enseñanzas.*
- ❖ *Al señor Rafael Márquez, por permitirme trabajar en las instalaciones del rancho y a todo su personal por sus colaboraciones y su apoyo.*
- ❖ *A mis compañeros de la maestría y amigos de Colombia por su apoyo y sus palabras*
- ❖ *A mi tía Diana y a Barbie por acompañarme durante todo este tiempo fuera de mi país.*
- ❖ *A Joss por sus palabras, apoyo y compañía.*
- ❖ *A Macu por sus atenciones*
- ❖ *A Alicita mil y mil gracias por todo en realidad.*
- ❖ *Fer. mil gracias por todo*

## RESUMEN

En México, el género *Rhipicephalus microplus* es de gran importancia económica y clínica debido a la transmisión de agentes infecciosos como: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*. El sistema inmunitario del becerro depende del consumo de calostro para la obtención de inmunoglobulinas. El objetivo del presente estudio fue comprobar el papel del calostro en la resistencia contra *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* en becerros recién nacidos y hasta los 6 meses de edad en una zona endémica de *R. microplus*. Se utilizaron 26 becerros, aleatoriamente 10 de ellos recibieron calostro comercial (CC), y 16 recibieron calostro materno (CM). Se tomaron muestras de sangre de las madres antes del parto y a los becerros: 10 (CC) al momento del nacimiento y 16 (CM) después de la toma de calostro; a las 24 horas post-calostro, a los ocho días post-nacimiento y semanalmente hasta los 6 meses de edad. A las muestras obtenidas se les realizaron estudios serológicos (ELISA-IFI) y moleculares (PCR). Cada tercer día, se realizó control de hematocrito y temperatura rectal para evaluar la presencia clínica de las enfermedades. En las madres se obtuvieron, mediante pruebas serológicas, prevalencias de 83% para *A. marginale*, del 95% para *B. bovis* y 93% para *B. bigemina*, confirmando la endemicidad de los microorganismos en la zona. Con relación a anaplasmosis, la rickettsia se observó por medio de frotis sanguíneo en todos los becerros del experimento, sin embargo, no se observó diferencia significativa entre los grupos experimentales. En los grupos CC (7/10 animales) y CM (13/16 animales) se observaron signos clínicos; por lo cual, se puede inferir que el calostro no interfiere en la presentación de anaplasmosis. Para babesiosis, mediante la observación de frotis sanguíneo, se encontraron sólo 4 animales positivos a *B. bigemina* y ninguno contra *B. bovis*. Durante toda la fase experimental, los animales no presentaron signos clínicos congruentes a babesiosis, por lo tanto, se puede corroborar que, sin importar el origen del calostro consumido, los becerros poseen una resistencia a *Babesia* spp.

**Palabras clave:** Babesiosis, Anaplasmosis, Calostro, Inmunidad pasiva.

## SUMMARY

In Mexico, the genus *Rhipicephalus microplus* is of great economic and clinical importance due to the transmission of infectious agents such as: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale*. The immune system of the calf depends on the consumption of colostrum to obtain immunoglobulins. The objective of this study was to verify the role of colostrum in resistance against *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale* in newborn calves and up to 6 months of age in an endemic area of *R. microplus*. 26 calves were used, randomly 10 of them received commercial colostrum (CC), and 16 received maternal colostrum (CM). Blood samples were taken from the mothers before delivery and the calves: 10 (CC) at birth and 16 (CM) after colostrum was taken; at 24 hours post-colostrum, at eight days post-birth and weekly until 6 months of age. The samples obtained were performed serological studies (ELISA-IFI) and molecular studies (PCR). Every third day, hematocrit and rectal temperature control was performed to assess the clinical presence of the diseases in the mothers, 83% prevalence was obtained for *A. marginale*, 95% for *B. bovis* and 93% for serological tests. *B. bigemina*, confirming the endemicity of microorganisms in the area. In relation to anaplasmosis, rickettsia was observed by means of blood smear in all calves of the experiment, however, no significant difference was observed between the experimental groups. In the CC groups (7/10 animals) and CM (13/16 animals) clinical signs were observed; Therefore, it can be inferred that colostrum does not interfere with the presentation of anaplasmosis. For babesiosis, by observing blood smears, only 4 animals positive for *B. bigemina* and none against *B. bovis* were found. During the whole experimental phase, the animals did not present clinical signs congruent to babesiosis, therefore, it can be corroborated that, regardless of the origin of the colostrum consumed, the calves have a resistance to *Babesia* spp

**Key words:** Babesiosis, Anaplasmosis, Colostrum, Passive immunity.

## INDICE

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
RESUMEN .....	III
SUMMARY .....	IV
ÍNDICE DE CUADROS .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VIII
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Respuesta inmune en los bovinos .....	3
2.1.2 Características de la inmunidad del feto .....	3
2.1.3 Inmunidad del becerro .....	4
2.1.4. Inmunidad pasiva .....	4
2.2 CALOSTRO .....	5
2.2.2. Calostro comercial .....	5
2.3. BABESIOSIS .....	5
2.3.1. Generalidades .....	5
2.3.2 Taxonomía .....	6
2.3.3. Ciclo de vida .....	7
2.3.4. Signos clínicos .....	9
2.3.5. Epidemiología .....	9
2.3.6. Respuesta Inmunitaria contra <i>Babesia spp</i> .....	10
2.3.7. Diagnóstico .....	11
2.4. ANAPLASMOSIS .....	12
2.4.1. Generalidades .....	12
2.4.2. Ciclo de vida .....	12
2.4.3. Signos clínicos .....	14
2.4.4. Epidemiología .....	14
2.4.5. Respuesta Inmunitaria contra <i>Anaplasma marginale</i> .....	15
2.4.6. Diagnóstico .....	16
2.5. <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	16
2.5.1. Generalidades .....	16
2.5.2. Clasificación Taxonómica .....	17
2.5.3. Medidas de control .....	17
2.5.4. Importancia económica .....	18
2.5.5. Distribución en México .....	18
<b>III. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>IV. HIPÓTESIS .....</b>	<b>21</b>
<b>V. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
5.1. OBJETIVO GENERAL .....	22



5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	22
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS-----</b>	<b>23</b>
6.1. PROCESO EXPERIMENTAL EN CAMPO -----	23
6.1.1. Ubicación.....	23
6.1.3. Manejo .....	23
6.1.4 Tratamiento.....	24
6.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN LABORATORIO-----	24
6.2.1. Frotis Sanguíneo.....	25
6.2.2 Técnica de Hematocrito.....	25
6.2.4. Extracción de ADN.....	25
6.2.4. Cuantificación de ADN.....	26
6.2.5. Determinación de la Integridad de ADN.....	26
6.2.6. Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) .....	27
6.2.7. Ensayo inmuno-enzimático en placa (ELISA) .....	28
6.2.8 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) .....	29
6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO -----	30
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----</b>	<b>31</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES-----</b>	<b>37</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA -----</b>	<b>38</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
1	Clasificación taxonómica de <i>Babesia</i> spp.	8
2	Clasificación taxonómica de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i>	17
3	Cebadores empleados en la amplificación por PCR anidada	27
4	Componentes para la reacción PCR anidada Temperatura y tiempos de termociclado	28
5	empleados en la PCR anidada para cada uno de los agentes	28
6	Porcentaje de madres positivas en serología y reacción en cadena de la polimerasa de <i>Babesia</i> <i>bovis</i> , <i>B. bigemina</i> y <i>Anaplasma marginale</i>	31
7	Concentración de inmunoglobulinas del calostro de las madres con calostrómetro para grupo de calostro comercial	32
8	Concentración de inmunoglobulinas del calostro de las madres con calostrómetro para grupo de calostro materno	33
9	Porcentaje de animales positivos en serología y reacción en cadena de la polimerasa para <i>Babesia</i> <i>bovis</i> , <i>B. bigemina</i> y <i>Anaplasma marginale</i>	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Ciclo de vida de <i>Babesia</i> spp.	8
2	Ciclo de vida de <i>Anaplasma marginale</i>	13
3	Distribución de la anaplasmosis bovina en México	15
4	Presencia de la garrapata <i>Boophilus</i> spp. en México	19
5	Promedio de volumen celular aglomerado para el grupo de calostro en polvo comercial y para el grupo de calostro materno por semana de vida	35

## I. INTRODUCCIÓN

La babesiosis y la anaplasmosis se encuentran presentes en zonas tropicales y subtropicales de México, están distribuidas de acuerdo con la presencia del vector, la garrapata del género *Rhipicephalus* spp (Solorio y Rodríguez-Vivas, 1997). Las pérdidas económicas relacionadas a estas enfermedades se estiman en más de 500 millones USD a nivel mundial (Bock *et al.*, 2004). Estas pérdidas son ocasionadas de manera directa por la morbilidad y mortalidad de animales, la disminución en los parámetros de producción (kilogramos de leche y/o carne, calidad de la piel), y de manera indirecta por la compra de medicamentos y productos para el control del vector (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017); además, dificulta la implementación de programas para el mejoramiento genético en las regiones donde estas enfermedades son endémicas (Yusuf, 2017). La babesiosis es causada por un protozooario intraeritrocítico obligado, en México se encuentran dos especies de importancia para la producción bovina, *Babesia bigemina* y *B. bovis* (Bock *et al.*, 2004; Gohil *et al.*, 2013; Gashaw *et al.*, 2018). La anaplasmosis es una enfermedad causada por una bacteria Gram negativo (Gram -), perteneciente al orden de los Rickettsiales. En el país, la especie de interés para la producción bovina es *Anaplasma marginale* (Rodríguez *et al.*, 2009; Kocan *et al.*, 2010). El cuadro clínico de estas enfermedades se caracteriza por anemia hemolítica, fiebre, depresión y ocasionalmente la muerte (Suárez y Noh, 2011).

Los bovinos, por su tipo de placentación, son dependientes del consumo de calostro ya que este los provee de inmunoglobulinas y de componentes de la respuesta inmune innata (Tizard, 2009; Stelwagen *et al.*, 2009). Se ha descrito que, parte de la respuesta inmune en animales jóvenes contra la babesiosis y la anaplasmosis proviene de la ingesta de calostro (Mahoney, 1964; Mahoney *et al.*, 1973; Meléndez *et al.*, 2003). Diversos estudios mencionan que la respuesta se debe principalmente a elementos de la inmunidad innata como componentes celulares, activación de sustancias opsonizantes y del óxido nítrico presente en monocitos. (Lohr, 1973; Brown y Logan, 1992; Brown *et al.*, 1993; Wyatt *et al.*, 1994; Bock *et al.*, 1999; Shoda *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001; Goff *et al.*, 2001; Goff *et al.*, 2002; Brown, 2012).

El presente trabajo tuvo como objetivo comprobar si el calostro interviene en la resistencia contra *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale* en becerros recién

nacidos y hasta los 6 meses de edad, en una zona endémica de *Rhipicephalus microplus*. Conocer esta información permitirá identificar los procesos de las enfermedades en condiciones naturales en zonas endémicas, ya que la mayoría de los trabajos publicados se han realizado bajo condiciones experimentales.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## II. ANTECEDENTES

### 2.1.1 Respuesta inmune en los bovinos

Los individuos se caracterizan por establecer mecanismos mediante los cuales le permite mantenerse estructural y funcionalmente ante el ingreso de agentes invasores. El sistema inmune se caracteriza por tener dos clases de respuesta, una de tipo innata y otra adaptativa; la respuesta innata se caracteriza por ser la primera línea de defensa, esta posee mecanismos celulares y moleculares que se establecen contra alguna infección, en tanto, la respuesta inmune adaptativa se desarrolla y actúa contra patógenos que son capaces de evadir o superar a la respuesta de la innata (Kindt *et al.*, 2007; Tizard *et al.*, 2009).

La respuesta inmunológica del bovino es particular ya que dependen de la inmunidad pasiva transferida por la madre por medio de la ingesta de calostro para adquirir inmunoglobulinas, debido al tipo de placentación (Godden, 2008). Otra de las características relevantes de la respuesta inmune del bovino son sus múltiples variaciones en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de la clase I y II; que en bovinos es denominado BoLA. El cual los puede hacer susceptibles o resistentes a diversas enfermedades (Pastoret, 1998).

### 2.1.2 Características de la inmunidad del feto

El proceso de formación del feto en la gestación involucra una cantidad de mecanismos por los cuales los diferentes sistemas se desarrollan. El sistema inmunológico del feto desarrolla mecanismos específicos e inespecíficos de defensa, los cuales funcionan sinérgicamente (Good y Papermaster, 1964). Dentro del feto bovino los órganos que intervienen en la respuesta inmune se identifican según Schultz *et al.*, (1973) en este orden: el timo y el bazo inician su formación entre el día 42 y 55 de gestación, pero se desarrolla en su totalidad sobre los días 205 y 220 de gestación; los ganglios linfáticos mesentéricos y gastrointestinales se hacen presentes entre los 60 y 175 días de la gestación. Dentro de estos mecanismos de defensa se incluyen: el sistema del complemento, el cual se evidencia hacia los 90 días de gestación y los linfocitos en sangre fetal a los días 75 y 80 de gestación (Wilson *et al.*, 1992).

### 2.1.3 Inmunidad del becerro

La capacidad de respuesta inmunológica del animal posterior al nacimiento se ve disminuida por el cortisol circulante en sangre, los niveles de linfocitos T del becerro se encuentra en concentraciones similares a los del adulto; en tanto los linfocitos B aumentan en los primeros seis meses de vida. (Baccili *et al.*,2018)

Posterior al nacimiento los órganos linfoides primarios y secundarios están poblados por células que se han desarrollado independientemente de la estimulación antigénica. La actividad de la inmunidad humoral, local y celular es deficiente en los terneros al nacer, estos mecanismos se activan y fortalecen a medida que el animal va creciendo y exponiéndose a diferentes antígenos presentes en el medio ambiente (Barrington y Parish, 2001)

### 2.1.4. Inmunidad pasiva

Inmunidad pasiva se describe como el proceso de obtener inmunidad pasivamente de una fuente externa; como es el caso del recién nacido, quien debido a la barrera placentaria requiere de la transferencia de inmunoglobulinas, a partir del calostro, para lograr sobrevivir, este proceso se ve afectado por diversas causas, como: la concentración de inmunoglobulinas, calidad y tiempo en la ingesta del calostro, tiempo de descanso de la glándula mamaria, enfermedades presentes en la ubre de la madre, entre otras. (Edwards *et al.*, 1982; Stelwagen *et al.*,2009, Mcgee y Early, 2018)

La absorción del calostro depende de dos procesos: el primero es la concentración de la secreción de inmunoglobulinas (Ig) maternas en el calostro, éste se da mediante el transporte activo de Ig de la sangre a la glándula mamaria; el segundo, se lleva a cabo en el becerro, es un transporte transitorio no selectivo (Beser y Gay, 1994) que se da por medio de la presencia del receptor específico de Ig, receptor específico de Fc neonatal (rFc), el cual juega un papel importante en el transporte activo de Ig materna del calostro. Este proceso se denomina pinocitosis activa; ocurre cuando las inmunoglobulinas son absorbidas en el intestino delgado por las células cilíndricas del epitelio donde las vacuolas llevan a las Ig a linfa, de ahí pasan al conducto torácico y posteriormente a la sangre (Bush *et al.*, 1980; Staley y Bush,1985; Tizard, 2009).

## **2.2 Calostro**

El calostro, se define como la primera secreción láctea que las hembras de los mamíferos producen inmediatamente después del parto, contiene una alta concentración de inmunoglobulinas de tres isotipos diferentes (IgG, IgA e IgM). El isotipo IgG es el más abundante y representa el 75% del total de todas las inmunoglobulinas (Dunn *et al.*, 2017)

También posee diversos componentes inmunes ligados a la respuesta innata como: macrófagos, neutrófilos, factores del complemento, proteínas de la fase aguda, citocinas pro y antiinflamatorias y un rango de péptidos y proteínas con actividad antimicrobiana directa. Además, se encuentran linfocitos que representan el 20-25% de las células secretadas por la glándula mamaria (Gonzales y Dus Santos, 2017), y hormonas que favorecen el crecimiento y la maduración de los efectos fisiológicos para el desarrollo del ternero (Stelwagen *et al.*, 2009; Novo *et al.*, 2017).

### **2.2.2. Calostro comercial**

El uso del calostro comercial ha tenido grandes implicaciones en el manejo de los becerros y en programas de suplementación de neonatos donde se controla cantidad de inmunoglobulinas transferidas. Además: en programas donde se pretenden erradicar o controlar enfermedades y en programas sanitarios donde la problemática es el consumo de calostro con baja calidad sanitaria (Lago *et al.*, 2018).

El calostro comercial se conserva en seco por medio de: liofilización, deshidratación por microondas, y el secado por pulverización, este último es un método eficiente que no altera la transferencia de inmunoglobulinas, siempre y cuando posea una concentración adecuada de Ig (Chelack *et al.*, 1993).

## **2.3. Babesiosis**

### **2.3.1. Generalidades**

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por un protozooario intraeritrocitario del género *Babesia* (Bock *et al.*, 2004). En bovinos, hay dos especies de interés en México: *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Se encuentran ampliamente distribuidas en zonas



tropicales y subtropicales asociadas a la presencia de las garrapatas de los géneros *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus annulatus* (Gohil *et al.*, 2013).

Víctor Babes en el año de 1888, concluyó que la causa conocida como hemoglobinuria enzoótica de los bovinos era un pequeño microorganismo intraeritrocítico al cual denominó *Haematococcus bovis*. Posteriormente, en 1893 en Estados Unidos de América, Smith informó que el agente responsable de la fiebre de Texas era un protozoario, reconoció que era otra especie del protozoario y junto con Kilborne propusieron el nombre de *Pyrosoma bigeminun* (posteriormente *Babesia bigemina*).()

Este protozoario tiene mayor relevancia porque se encontró que era transmitido por garrapatas, quienes desarrollaban descendencia portadora. La presencia de un artrópodo en la transmisión de la enfermedad introdujo un concepto en epidemiología de importancia para el manejo y control del vector (Bock *et al.*, 2004; Uilenberg, 2006; Yusuf, 2017).

En las regiones tropicales y subtropicales de México se encuentran cerca del 80% de los sistemas de producción ganadero, estas zonas cumplen con las condiciones medio ambientales para la presencia del vector que transmite la babesiosis. En estas áreas, la prevalencia de la enfermedad es superior al 50% en el ganado bovino (Foil *et al.*, 2004), ocasionando grandes pérdidas económicas por causas directas como: alta mortalidad y morbilidad, disminución de parámetros productivos entre otros aspectos que afectan directamente la rentabilidad de los sistemas de producción (Rodríguez *et al.*, 2017).

### 2.3.2 Taxonomía

**Cuadro 1: Clasificación taxonómica de *Babesia spp.***

Categoría	Taxón
Pylum	Apicomplexa
Clase	Sporozoasida
Orden	Eucoccidaria
Suborden	Piroplasmorina

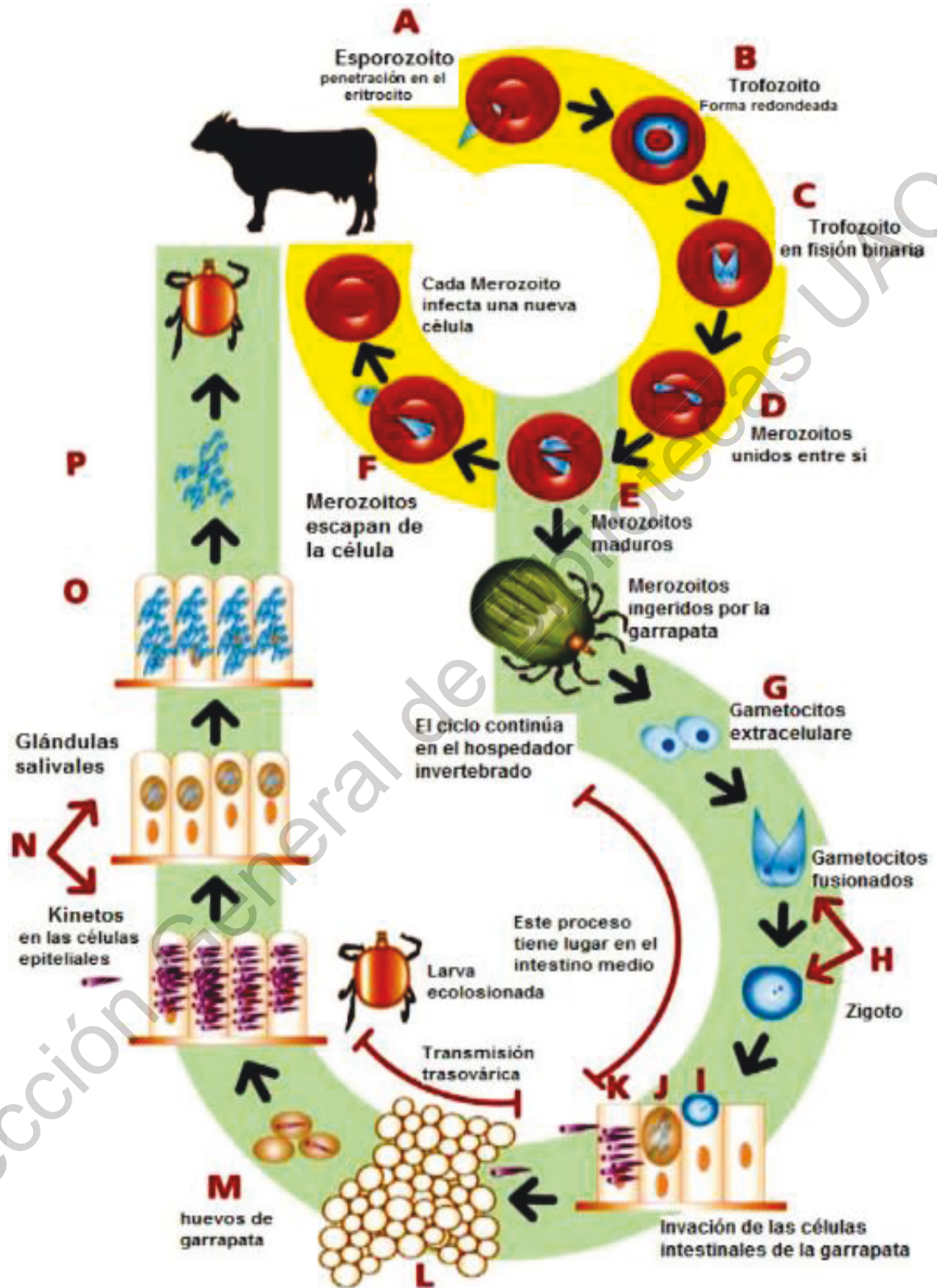
Familia	Babesiidae
Género	<i>Babesia</i>
Especies	<i>B. bigemina</i> <i>B. bovis</i>

Tomado de: Homer *et al.*, 2000; Bock *et al.*, 2004; Yusuf, 2017

### 2.3.3. Ciclo de vida

EL ciclo de vida de la *Babesia spp.* se lleva a cabo en dos fases, una asexual y otra sexual. La primera comienza a partir de la mordedura de la garrapata inoculando a los bovinos los esporozoitos por medio de la saliva. Los esporozoitos penetran directamente en los glóbulos rojos, donde se desarrollan a trofozoitos quienes se multiplican por fisión binaria produciendo dos merozoitos, los cuales al salir del eritrocito generan una lisis de éste y cada merozoito invade un nuevo eritrocito. Se pueden presentar diferentes etapas de la replicación del parásito al mismo tiempo en el torrente sanguíneo (Bock *et al.*, 2004).

La fase sexual inicia cuando la garrapata ingiere merozoitos con la sangre del bovino infectado con *Babesia*. Los merozoitos o pregametocitos sobreviven para desarrollarse en gametocitos. (Uilenberg, 2006). los cuales se fusionan en el lumen del tracto digestivo de la garrapata para formar el cigoto, éste se transforma en una fase móvil, denominada oocineto, el cual es capaz de escapar del epitelio intestinal medio e invadir los tejidos del cuerpo de la garrapata, incluyendo los ovarios donde muchos huevos son infectados con *Babesia*. Continuando como esporogonia y el desarrollo de numerosos kinetos (esporoquinetos); algunos de los cuales invaden las glándulas salivales de las garrapatas donde se desarrollan los esporozoitos, estos representan la fase infecciosa en el huésped mamífero. Como se muestra en la figura 1 (Smith, 1978; Mosqueda *et al.*, 2012).



(Mosqueda *et al.*, 2012)

Figura 1: Ciclo de Vida de *Babesia* spp.

#### 2.3.4. Signos clínicos

La babesiosis se manifiesta como hemólisis y disturbios circulatorios ocasionados por la presencia del parásito en la sangre y su rápida multiplicación en los eritrocitos y destrucción de estos, causando hemoglobinemia, hemoglobinuria y fiebre (Yusuf, 2017), letargia, diarrea, anemia hemolítica, taquicardia, disminución de los movimientos ruminales e ictericia en la mucosa ocular y vaginal principalmente (Salem *et al.*, 2016, Enbiyale *et al.*, 2018).

Las infecciones de *B. bovis* se presentan entre los días 6 y 15 posteriores a la infestación de larvas de *R. microplus* o *R. annulatus* causando en los animales un síndrome agudo caracterizado por un cuadro febril de 41°C o más, ictericia no muy evidente y anemia leve. Se pueden observar cuadros de agresividad marcada, ataxia, trastornos del equilibrio e incoordinación, esto se debe a que los eritrocitos infectados con *B. bovis* se localizan en su mayoría en los capilares de varios órganos como cerebro, cerebelo, riñón y músculos, en donde se aglomeran produciendo bloqueos (Everitt *et al.*, 1986; Wright y Goodger 1988; García *et al.*, 2003; Gohil *et al.* 2013).

Generalmente la *B. bigemina* posee un periodo de incubación de 15 días posteriores a la infestación con ninfas y adultos de *R. microplus* y *R. annulatus*. La hemoglobinuria constituye uno de los rasgos más característicos, observándose también una intensa anemia, fiebre y no hay presencia de signos neurológicos (Smith, 1978).

#### 2.3.5. Epidemiología

La babesiosis se encuentra distribuida a nivel mundial en zonas tropicales y subtropicales, esta se encuentra ligada a las infestaciones de la garrapata *R. microplus* o *R. annulatus* y su capacidad de inocular al protozoario dentro del huésped (Solorio-Rivera y Rodríguez-Vivas, 1997); el protozoario debe generar tasas de infección dentro de las garrapatas lo suficientemente altas para exceder los niveles de mortalidad de estas, y a su vez poder infectar al bovino. En éste, la *Babesia* spp. debe de superar al sistema inmunológico y garantizar niveles de parasitemia suficientes para infectar a nuevas garrapatas y así asegurar su permanencia en el medio (Meléndez, 1998)

La posibilidad de infección transplacentaria no está bien documentada, aunque hay reportes de casos aislados (Neitz, 1956; Bracarense *et al.*, 2001; Santarosa *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2018).

El concepto de estabilidad enzoótica se relaciona con la interacción parásito-huésped-medio ambiente, permitiendo que los animales adquieran resistencia inmunológica y rara vez se presente la enfermedad de manera clínica, por consiguiente, en un estado de inestabilidad enzoótica, algunos animales dejarán de infectarse por un periodo prolongado posterior al nacimiento, donde no desarrollan anticuerpos específicos para la enfermedad y presentaran casos fatales de esta (Mahoney y Ross, 1972; Solorio-Rivera y Rodríguez-Vivas, 1997; Saad y Zhisheng, 2015).

De acuerdo con la seroepidemiología descrita por Montenegro (1992) en México se presentan condiciones de estabilidad e inestabilidad enzoótica, reportando prevalencias para *B. bovis* de 50% y de *B. bigemina* de 56% en Nuevo León, Tamaulipas y Coahuila; mientras que reporta una seroprevalencia de 77% en Guerrero y de 24.5 % en Veracruz para *Babesia* spp.

### **2.3.6. Respuesta Inmunitaria contra *Babesia* spp**

En los bovinos se describe un tipo de resistencia natural a la babesiosis, (Mahoney *et al.*, 1964) reportan que esta resistencia se debe a los anticuerpos transferidos por la madre mediante el calostro; más adelante identifican que los becerros menores a los 9 meses de edad son refractarios a la infección clínica, (Mahoney *et al.*, 1973). Posteriormente (Bock *et al.*, 1999) señalan que la resistencia en el caso de la subespecie *Bos indicus* se debe a una menor infestación por garrapatas.

El parásito *Babesia* spp. posee mecanismos de evasión de la respuesta inmune dentro del huésped de los cuales se mencionan: variabilidad antigénica, inmunosupresión, la infección de células carentes de núcleo (eritrocitos), la citoadherencia y el secuestro de los eritrocitos al endotelio vascular (De vos *et al.*, 1976; Allred, 1995; Allred, 2003).

Los mecanismos que intervienen en la respuesta contra la infección por *Babesia* spp. son dependientes de la respuesta inmune innata y/o humoral. La respuesta innata es aquella que determina que los bovinos jóvenes posean tolerancia a la babesiosis. (Brown *et al.*, 1991). Estos mecanismos se deben a la activación de macrófagos, monocitos, células NK (Natural

Killer), liberación de radicales libres, de oxígeno y de nitrógeno. (Goff *et al.*, 2010). EL bazo en la inmunidad innata de los becerros, es de gran importancia, dado a su producción de interleucina -12 (IL-12) y de óxido nítrico (ON) (Goff *et al.*, 2001); la respuesta inmune tipo I que involucra el ON, la IL-4, IFN- $\gamma$  (interferón) y la expresión de óxido nítrico sintetasa (iNOS) (Shoda *et al.*, 2000; Goff *et al.*, 2002) posee relevancia dada su alta actividad fagocítica en el bazo (Schneider *et al.*, 2011; Everitt *et al.*, 1986). Además, la *Babesia* spp. es sensible al estrés oxidativo debido a los procesos de peroxidación lipídica y el daño a las membranas, ácidos nucleicos y proteínas ocasionándole la muerte al parásito (Doyle *et al.*, 2016).

En tanto, los mecanismos de la respuesta inmune humoral o adquirida, obedecen a la respuesta dependiente de las células T cooperadoras, las cuales, contribuyen en la producción de citocinas que activan los macrófagos o la formación de anticuerpos específicos contra *Babesia* spp. (Brown *et al.*, 1993; Goff *et al.*, 2003). También se debe, a la estimulación de las líneas de defensa de células T ayudadoras CD4+ (Brown y Logan, 1992), estableciendo una respuesta del tipo Th-1, ya que poseen actividad en la fijación del complemento y actividad efectora en macrófagos, así mismo, la inducción de interferón (INF) que funciona como interruptor en la producción de anticuerpos del tipo opsonizante IgG 2 (Brown *et al.*, 2001; Bastos *et al.*, 2008).

### **2.3.7. Diagnóstico**

El monitoreo de la enfermedad requiere del uso de métodos diagnósticos que posean una alta sensibilidad y especificidad, ya que, la prevalencia de la enfermedad es importante para la implementación de técnicas de control (Buling *et al.*, 2007).

La infección por *Babesia* spp. se puede diagnosticar de dos maneras; la primera consiste en la identificación directa del parásito en muestras de sangre completa del bovino. En la segunda se evalúa la huella inmunológica dentro del huésped. Para la observación microscópica del parásito se implementan: la elaboración de frotis sanguíneos teñidos con colorante de Giemsa y revisados al microscopio a los 100x.; técnicas moleculares como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que permite identificar al genoma del parásito dentro del genoma del huésped (Figuroa *et al.*, 1993; Chaudhry, *et al.*, 2010).

Las pruebas serológicas se realizan con la finalidad de determinar la huella inmunológica de la infección por *Babesia* spp. estas son: la enzimoimmunoensayo (ELISA), fijación del complemento; radioimmunoensayo (RIA) e inmunofluorescencia indirecta (IFI) esta última es ampliamente utilizada ya que permite identificar animales portadores asintomáticos (>90%) (OIE, 2014).

## **2.4. Anaplasmosis**

### **2.4.1. Generalidades**

*Anaplasma marginale* es una bacteria Gram (-). Se clasifica taxonómicamente en el orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, que son organismos intracelulares obligados, se encuentran exclusivamente dentro de las vacuolas unidas a la membrana de la célula del huésped, y se multiplican tanto en individuos vertebrados como invertebrados. Debido sus características, de carencia de citoplasma y al ubicarse al margen del eritrocito se propuso el nombre de *Anaplasma marginale* (Kocan *et al.*, 2010).

La anaplasmosis tiene un gran impacto económico. Sus pérdidas se reportan para América Latina en los 875 millones de dólares. estas están estimadas por la alta morbilidad y mortalidad de bovinos que a su vez ocasiona disminución en los parámetros de producción de leche y conversión alimenticia en el ganado de carne; conjuntamente, es una de las principales barreras para poder implementar programas de mejoramiento genético en zonas tropicales y subtropicales (Rodríguez *et al.*, 1999).

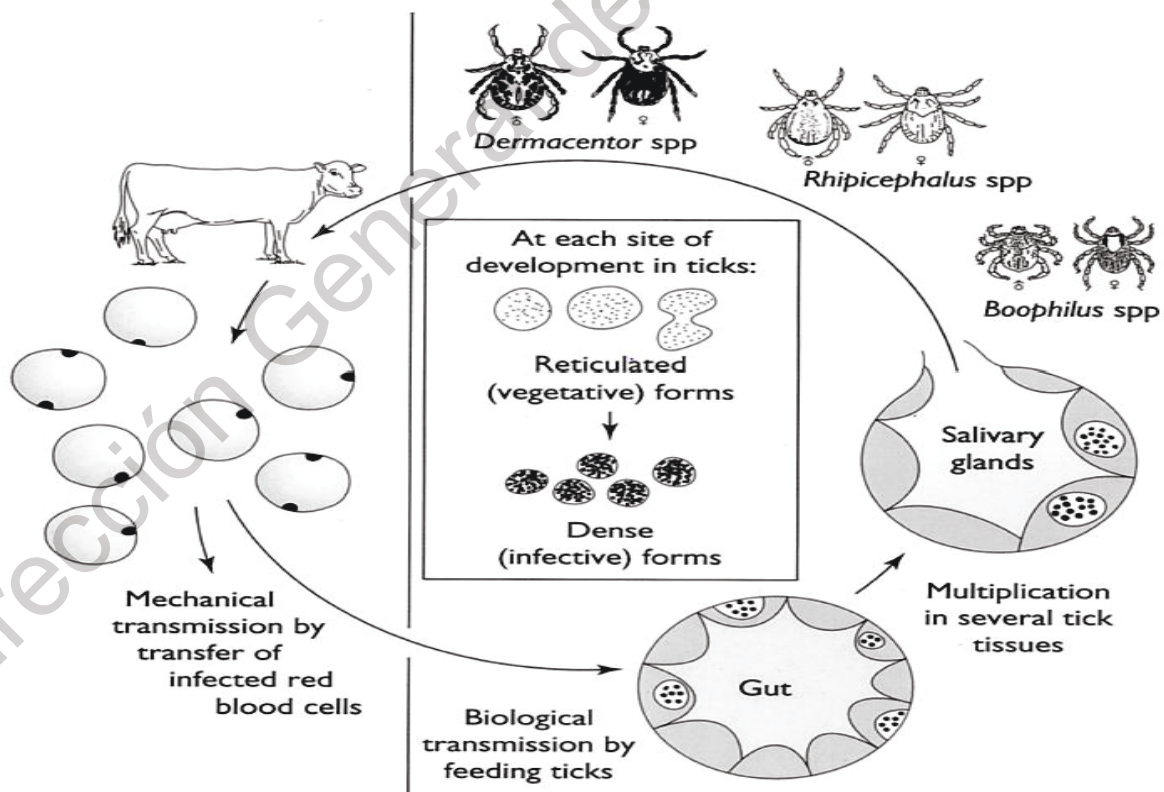
La enfermedad fue descrita por (Theiler 1911) en Sudáfrica, identificó un pequeño agente en los eritrocitos de los bovinos afectados por una anemia aguda, diferenciándolo del causante de la fiebre de Texas con la que se solía confundir. Además de que se estableció que la anaplasmosis podía coexistir con babesiosis dentro de un mismo individuo.

### **2.4.2. Ciclo de vida**

La transmisión de *Anaplasma marginale* puede ser de manera mecánica por picadura de insectos hematófagos o fómites que contengan sangre infectada. Biológicamente por garrapatas ya que *A. marginale* tiene dentro de estos organismos parte de su ciclo de vida, siendo éste un mecanismo más eficiente (Kocan, *et al.*, 2010), además de los vectores

biológicos, *A. marginale* también se puede transmitir de manera transplacentaria. (Potgieter y Van Rensburg, 1987).

El ciclo de desarrollo de *A. marginale* en garrapatas es complejo y coordinado con el ciclo de alimentación de esta, comienza en las células del intestino siguiendo con las células musculares del mismo, después muchos otros tejidos de la garrapata llegan a ser infectados, incluyendo las glándulas salivales (Kocan *et al.*, 2004). En cada sitio de desarrollo en la garrapata, *A. marginale* se multiplica dentro de cuerpos de inclusión unidos a las membranas llamadas vacuolas. Cada ciclo involucra dos estadios: la primera forma de *A. marginale* es la forma denominada reticular o vegetativa, en la que se divide por fisión binaria, formando colonias grandes que pueden contener cientos de organismos. La forma reticular cambia a la forma densa que es la forma infecciosa y que puede sobrevivir fuera de las células de la garrapata. El bovino llega a ser infectado con *A. marginale* cuando la forma densa es transmitida durante la alimentación de la garrapata a través de las glándulas salivales. Como se muestra en la siguiente figura 2 (Palmer *et al.*, 1999; Kocan *et al.*, 2010).



Tomado de :Kocan *et al.*, 2003.

**Figura 2: Ciclo de vida de *Anaplasma marginale*.**



Durante la infección de *A. marginale* en las células endoteliales, se describe que esta se localiza en el entorno micro capilar, donde se presenta un contacto íntimo entre el eritrocito y las células del endotelio; dado que este es un punto estratégico para infección continua, además de evadir la respuesta inmune del huésped y funcionar como reservorio para que los animales permanezcan persistentemente infectados (Munderloh *et al.*, 2004).

#### **2.4.3. Signos clínicos**

La anaplasmosis bovina cursa con un periodo de incubación que puede variar entre los diferentes individuos, éste puede estar entre un rango de 7 a 70 días con un promedio de 28 días; el cuadro clínico se caracteriza por fiebre, pérdida de peso, aborto, letargo, ictericia, anemia y muerte de los animales. Los bovinos que sobreviven a la infección aguda quedan como persistentemente infectados los cuales manifestarán picos de rickettsemia en diferentes épocas y estados fisiológicos del animal (Kocan, *et al.*, 2003).

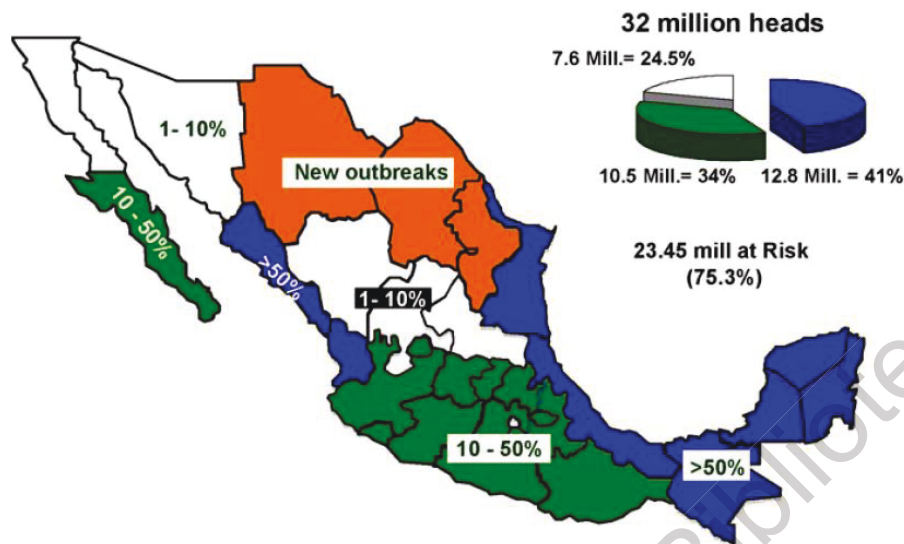
#### **2.4.4. Epidemiología**

La anaplasmosis es endémica de zonas tropicales y subtropicales del mundo, en el caso de América Latina se presenta con excepción de áreas desérticas y ciertas zonas montañosas de los Andes (Guiglielmone, 1995); en zonas donde se presenta una interacción constante, entre huésped-agente-medio ambiente, los animales permanecen como portadores sanos, aunque estos pueden mostrar signos clínicos ante condiciones de estrés (Rogers, 1979; Kocan *et al.*, 2010). Dentro de la misma zona se pueden encontrar diferentes cepas de *A. marginale*, esto debido a la variabilidad genética presente en las *Rickettsias* (Almanzán *et al.*, 2008; Quiroz *et al.*, 2016).

Las seroprevalencias de la enfermedad pueden variar ampliamente entre los países y zonas geográficas, debido a la movilización de ganado y la transmisión de manera mecánica y biológica de los animales persistentemente infectados que funcionan como reservorios (Eriks *et al.*, 1993).

En México la anaplasmosis es endémica a lo largo de los estados del Golfo de México, por medio de seroprevalencia es de 54.6% para la zona norte de Veracruz y de 69% determinado por medio de PCR como reportaron Cossio-Bayugar, *et al.*, (1997). Rodríguez *et al.*, (2009), reportan una prevalencia > a 50%, calculada con base en el censo nacional del

2006. Adicional se observan zonas de nuevos brotes de la enfermedad, como se muestra en la figura 3.



Tomado de: Rodríguez *et al.*, 2009

**Figura 3: Distribución de la Anaplasmosis bovina en México.**

#### 2.4.5. Respuesta Inmunitaria contra *Anaplasma marginale*

La infección por *A. marginale* genera una respuesta inmune de tipo humoral, los animales que se infectan por primera vez establecen una respuesta inmune sólida de tipo celular que se mantiene aún superada la fase aguda de la infección; aunque el animal quede como portador subclínico (Carson *et al.*, 1976; Araujo *et al.*, 2003). Se describe un tipo de resistencia presente en los animales jóvenes menores a los 9 meses de edad (Lahmers *et al.*, 2006).

El animal, posterior a la infección con *A. marginale*, establece una respuesta inmunitaria contra las variaciones de los epítomos de superficie del patógeno generando anticuerpos contra el agente, el principal mecanismo consiste en el modelo de linfocitos T CD4+ que expresan INF- $\gamma$  el cual estimula a los linfocitos T CD8+ éstos pueden tener niveles elevados en la reinfección, que potencializan la síntesis de sustancias opsonizantes de subclase de IgG bovina tipo IgG2, éstas activan a los macrófagos que a su vez aumentan la expresión de receptores, la fagocitosis y la fusión de fagolisosoma y liberación de óxido

nítrico para la destrucción de la bacteria ( Brown *et al.*, 1998; Valdez *et al.*, 2002; Bautista *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2008).

La respuesta del tipo IgG está dirigida contra la inmunodominancia y antigenicidad de las moléculas de Proteína de Superficie de Membrana (MSP) con sus variables MSP2, MSP3. Los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de superficie no son los suficientemente eficientes para eliminar la infección. Además de las constantes variaciones antigénicas que se presentan entre MSP en cada ciclo de la rickettsia (Scott *et al.*, 1990), dificultan la acción de las Ig contra la infección, ya que este es uno de los mecanismos por los cuales la bacteria evade el sistema inmune (Brow *et al.*, 2001; Noh *et al.*, 2008; Brow, 2012).

#### **2.4.6. Diagnóstico**

El diagnóstico de anaplasmosis se realiza por diversas formas: la observación microscópica de la bacteria y la detección de signos clínicos. La observación se realiza mediante el análisis de frotis sanguíneo periférico teñido con colorante de Giemsa (Aboytes *et al.*, 1991); los signos clínicos son: fiebre, decaimiento, anemia marcada, abortos e ictericia en las mucosas.

También se realiza la detección de anticuerpos en el bovino por medio de la prueba serológica enzimo inmuno ensayo (ELISA) debido a su gran especificidad y sensibilidad (98% y 95% respectivamente) en animales infectados (Aubry y Geale, 2010; OIE, 2015).

Otra de las herramientas diagnósticas para la infección por *A.marginale*. Es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esta técnica sirve para un diagnóstico en la fase aguda de la infección y en animales persistentemente infectados. La técnica de PCR anidada es una variante más específica y permite identificar hasta 0.0000001% de rickettsemia en el animal (de Echauide *et al.*, 1998).

### **2.5. *Rhipicephalus microplus***

#### **2.5.1. Generalidades**

*Rhipicephalus microplus* es una garrapata que actúa como parásito endémico de bovinos en lugares tropicales y subtropicales del mundo; generan un impacto negativo en las producciones ganaderas donde se encuentran presentes, puesto que ocasionan pérdidas

económicas ya que afectan la productividad, disminuyendo la ganancia de peso, la conversión alimenticia, la producción de leche y aumento de costos de producción por su control; además de que son el vector de agentes patógenos como la *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* (Casquero *et al.*, 2012).

### 2.5.2. Clasificación Taxonómica

Dentro de la clasificación taxonómica cabe mencionar que anteriormente *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus annulatus* eran conocidas como *Boophilus microplus* y *Boophilus annuatus* pero con base en nuevas técnicas moleculares en parte del genoma se ha podido ubicar a *Boophilus* como un subgénero, por sus diferencias en el ciclo de vida aunque morfológicamente tienen similitudes (Anderson y Magnarelli, 2008).

**Cuadro 2: Clasificación taxonómica de la garrapata *Rhipicephalus microplus*.**

Categoría	Taxon
Filo	Artropoda
Clase	Arachnida
Orden	Acarina
Suborden	Ixodoidea
Familia	Ixodidae
Género	<i>Rhipicephalus</i>
Especie	<i>microplus, annulatus</i>

**Tomado de:** (Echeverry y Ríos Osorio, 2016)

### 2.5.3. Medidas de control

El control de garrapatas se realiza mediante control químico, biológico entre otros. El control químico se lleva a cabo con el uso de sustancias acaricidas como: arsénico, hidrocarburos clorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, formamidinas, lactonas macrocíclicas, piretroides los cuales actúan sobre el sistema nervioso de la garrapata. El control biológico consiste en el uso de hongos entomopatógenos, bacterias, nematodos entomopatógenos. Otra de las alternativas es el control integrado de parásito el cual consiste en la asociación del medio ambiente, la población de las plagas y la utilización de técnicas y

métodos sustentables; esta técnica involucra el uso de razas resistentes, rotación y descanso de praderas, y la implementación de uno o más métodos de control disminuyendo así el número de aplicación de los productos químicos (Chandler *et al.*, 2000.; George, 2000; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

El uso indiscriminado e incorrecto de estas sustancias han ocasionado que los parásitos desarrollen resistencia a uno o varios de los compuestos (Domínguez-García *et al.*, 2010, Fernandez-Salas, 2012). La resistencia se define como la capacidad que tiene los individuos de una población que pueden sobrevivir a la dosis letal de un producto químico. (Alonso-Díaz *et al.*, 2006 ) Los costos de inversión en investigaciones y métodos para el control de las garrapatas son altos, dado que la presencia de este parásito afecta la comercialización de los bovinos, Rivera (2012) afirma que en el caso de México este problema se observa principalmente con EE. UU.

#### **2.5.4. Importancia económica**

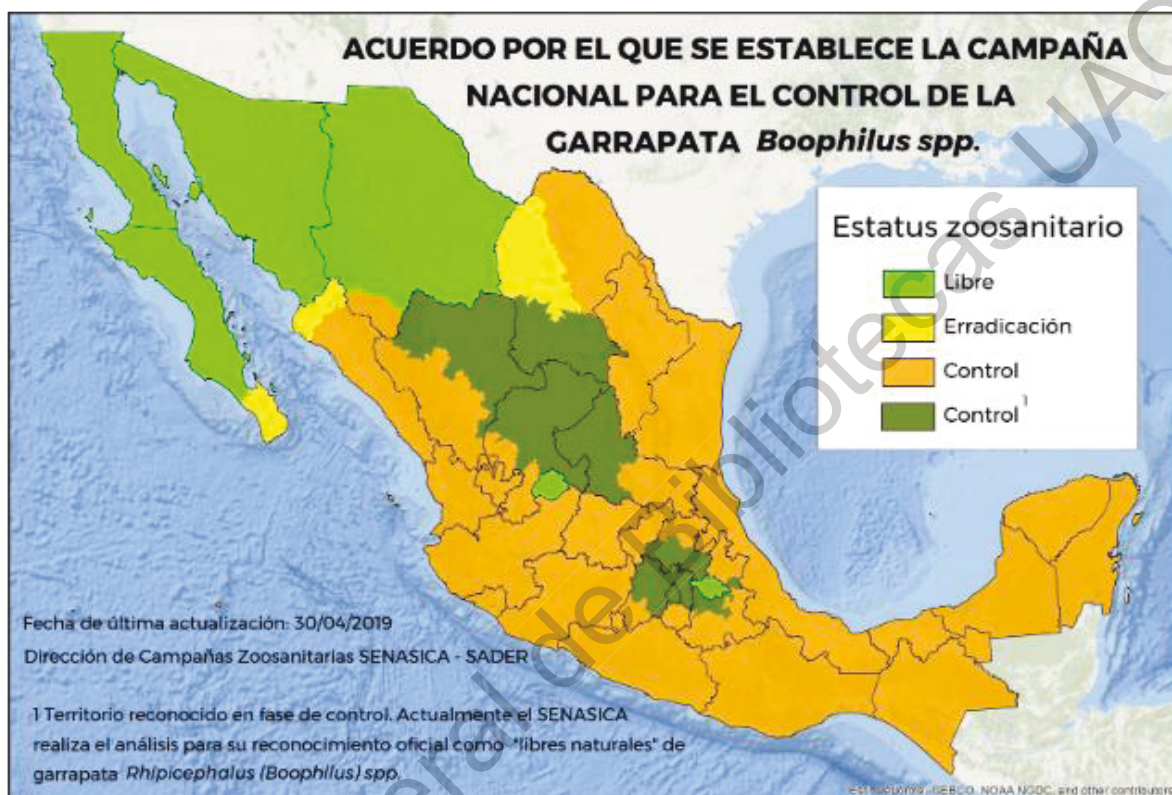
El impacto negativo de la presencia de garrapata dentro de las unidades productivas ganaderas se ve reflejado por la transmisión de microorganismos que afectan en la disminución de los parámetros de producción: (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017) reporta que los costos globales anuales estimados varían entre US \$13.9 mil millones y US 18.7 mil millones; en México se estima que las pérdidas son de US\$6'878.894 en tanto; Domínguez García *et al.*, (2016) estima que el hato ganadero es de 30 millones de cabezas bovinas, en base a este cálculo las pérdidas anuales por el control químico podrían ascender a USD \$ 942.207.692.

#### **2.5.5. Distribución en México**

México tiene el acuerdo Oficial Mexicano NOM-019-ZOO-1994 que establece los procedimientos, criterios, actividades y técnicas para el control y erradicación de la garrapata, de las cuales sigue señalando a *Boophilus spp.* (*Rhipicephalus microplus*) como el género a tratar por las enfermedades que transmiten a los bovinos.

La distribución de *Rhipicephalus spp.* está determinada por factores bióticos y abióticos principalmente en zonas tropicales y subtropicales (Estrada *et al.*, 2006; Alcalá *et al.*, 2018),

que coinciden con la zona de control y distribución reportada en 2019 por SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) en la Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus spp.*, como se muestra en la figura 4



Tomado de :SENASICA-Sader 2019

**Figura 4: Presencia de la garrapata *Boophilus spp.* en México**

### III. JUSTIFICACIÓN

La presencia de enfermedades transmitidas por garrapatas, como la anaplasmosis y la babesiosis son de gran importancia para las unidades de producción; ya que estas ocasionan grandes pérdidas económicas. Algunos autores señalan que en los becerros hay una resistencia debido a la inmunidad pasiva derivada de la ingesta de calostro hacia estas enfermedades; en tanto que otros indican que se debe a un proceso de la respuesta inmune adaptativa; la mayoría de estas teorías se han desarrollado en condiciones experimentales. Por eso es importante conocer el efecto de su consumo de calostro procedente de madres seropositivas, en la resistencia a la infección de babesiosis y anaplasmosis de becerros de zonas endémicas de *Rhipicephalus microplus*.

#### IV. **Hipótesis**

El consumo de calostro materno o calostro comercial por bovinos neonatos no interfiere en la manifestación clínica de babesiosis y anaplasmosis en becerros de zonas endémicas de *Rhipicephalus microplus*.

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## V. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Comprobar si el calostro interviene en la resistencia contra *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* en becerros recién nacidos y hasta los 6 meses de edad; en zonas endémicas de *Rhipicephalus microplus*.

### 5.2. Objetivos específicos

- Determinar la presencia de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*, en las hembras gestantes mediante métodos serológicos y moleculares.
- Determinar la presencia de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*, en los becerros al nacimiento, antes del consumo de calostro, a las 4 y 8 semanas de vida por técnicas serológicas y moleculares.
- Verificar si la presencia de babesiosis y anaplasmosis clínica en becerros es influenciada por el calostro.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Proceso experimental en campo

#### 6.1.1. Ubicación

El presente estudio se realizó en el Rancho Santa Cruz ubicado en la localidad de Xoyoquila, municipio de Hueytamalco, en el estado de Puebla, a una altitud de 339 msnm. El clima de la región está clasificado como Af (m) w (e), correspondiente al cálido húmedo, de acuerdo con la clasificación de Köeppen, modificada por García (1981).

#### 6.1.2. Bovinos empleados y tratamiento

**Madres:** Se utilizaron 26 vacas de raza  $\frac{3}{4}$  Pardo Suizo Europeo X Brahmán y  $\frac{3}{4}$  Holstein X Brahmán, seleccionadas en el último tercio de gestación.

**Crías:** se emplearon las crías (26) de las vacas mencionadas y se dividieron de manera aleatoria en dos grupos conforme iban naciendo.

#### Tratamientos:

**Grupo 1: calostro comercial (CC):** Se les suministró 4 litros de calostro comercial, dividido en dos tomas durante las primeras 24 horas de vida, evitando el consumo de sus madres.

**Grupo 2: calostro materno (CM):** Se les permitió alimentarse directamente de sus madres, durante las primeras 24 horas.

Posteriormente a las 24 horas, a todos los animales se les incorporó al sistema de crianza artificial de becerros en trópico.

#### 6.1.3. Manejo

##### 6.1.3.1 Alimentación:

Los bovinos se mantuvieron en pastoreo rotacional de pasto estrella y *Brachiarias*, desde el día de su nacimiento, para asegurar el contacto con los ixódidos.

##### 6.1.3.2 Toma de muestras:

**Madres:** Se les tomó muestra de sangre por venopunción de la vena coccígea para realizar la prueba diagnóstica por PCR para *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma*

*marginale*. Posteriormente se separó el suero al cual se le realizaron pruebas serológicas (ELISA e IFI).

**Crías:** Se les tomaron, muestras de sangre y suero de la vena yugular.

**Grupo 1:** Antes de la ingesta de calostro.

**Grupo 2:** Entre las 4-6 horas en promedio, posterior a la ingesta de calostro.

A las 24 horas de nacidos se volvieron a muestrear los dos grupos y así cada semana hasta llegar a la número 12.

**Temperatura rectal:** a los becerros se les midió la temperatura cada tercer día entre las 6 y las 8 de la mañana, durante 12 semanas.

**Control del volumen celular aglomerado (VCA):** Cada tercer día se realizó la técnica de hematocrito para conocer el VCA y frotis sanguíneo para determinar la presencia del agente infeccioso en sangre.

#### 6.1.4 Tratamiento

Con el propósito de evitar la muerte de los animales por alguno de los agentes patógenos, estos recibieron el tratamiento adecuado cuando el volumen celular aglomerado (VCA) fue menor al 50% con respecto al VCA tomado en la segunda semana de vida, con presencia del agente en sangre y con fiebre de más de 42C° por dos días consecutivos.

#### 6.2. Procesamiento de Muestras en Laboratorio

Se obtuvieron 780 muestras de sangre completa: 390 muestras en tubos vacutainer® de 5 ml con anticoagulante EDTA (morado) y 390 muestras en tubos vacutainer® de 5 ml sin anticoagulante (rojo) para la obtención de suero. Posteriormente todas las muestras fueron centrifugadas a 1500/rpm durante 10 minutos. De los tubos con EDTA se eliminó plasma, glóbulos blancos y plaquetas, obteniendo sólo las células rojas; de los tubos sin anticoagulante, se extrajo el suero que se colocó en microtubos de 2ml. Todas las muestras fueron identificadas y congeladas, para transportarse al laboratorio.

### 6.2.1. Frotis Sanguíneo

Para realizar el frotis sanguíneo, se tomó una pequeña muestra de sangre de los tubos con EDTA, con un tubo capilar para micro hematocrito. Primero se puso una gota sobre uno de los extremos de una lámina porta objetos, y a continuación con otra lámina en una inclinación de 45° se extiende la muestra, de uno de los extremos al otro, para obtener un extendido delgado, se secó de manera mecánica y rápida, por último, se le adiciona metanol para la fijación.

Después de la fijación se procedió a realizar una tinción con colorante de Giemsa-agua estéril con un pH 7.2 en una proporción de 3/1 dejando actuar por 15 minutos, posteriormente se lavaron y se dejaron secar a temperatura ambiente, para ser observadas al microscopio.

### 6.2.2 Técnica de Hematocrito

El VCA se midió a partir de la muestra de sangre con EDTA con la cual se llenó un tubo capilar para micro hematocrito, se selló en uno de los extremos y se colocó en una centrifuga para micro hematocrito durante 5 minutos a 12,000 rpm. Se realizó la lectura de los capilares con la ayuda de una regla graduada en milímetros, y aplicando la siguiente fórmula:

$$VCA \% = \frac{\text{Longitud total de la columna capilar en cm}}{\text{Longitud de la columna de eritrocitos en cm}} \times 100$$

### 6.2.4. Extracción de ADN

Para realizar la extracción del ADN se utilizó el paquete de eritrocitos obtenidos por la centrifugación previa, empleando el protocolo para la extracción de sangre completa mediante el Kit comercial de GE Healthcare illustra blood genomicPrep mini Spin ®.

Primero se tomaron 20µl de proteinasa K en un tubo de 1.5 ml; se añadieron 200 µl de muestra y 400 µl de solución búfer de lisis tipo 10, se agitó en un agitador de vórtice por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos con agitaciones intermitentes. Después se transfirió el contenido a una columna de extracción acoplada a un

tubo de 2.0 ml limpio (ambos suministrados por el KIT) y se centrifugó a 11,000 xg durante 1 minuto, para decantar el sobrenadante. Posteriormente se añadieron 500 µl de solución búfer de lisis tipo 10, nuevamente se centrifugó a 11,000 xg durante 1 minuto, para tirar el sobrenadante. El sedimento se resuspendió y lavó con 500 µl de solución búfer de lavado tipo 6, se centrifugó a 11,000 xg durante 3 minutos a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante, para volver a centrifugar a 11,000 xg durante 1 minuto. Por último, la columna de extracción se depositó en un tubo estéril de 1.5 ml, el contenido se diluyó con 50 µl de solución búfer de elución tipo 5 (previamente calentada a 70°C), se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifugó a 11,000 xg durante 1 minuto. Para finalizar, el extracto de ADN (sobrenadante) se guardó a -20°C hasta su uso.

#### **6.2.4. Cuantificación de ADN**

Para determinar la concentración de ADN en una muestra, se realizó la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a las longitudes de onda de 260 y 280 nm. Una densidad óptica de una unidad arbitraria de absorbancia (u.a.a.) corresponde; aproximadamente a 50µg/ml; si el ADN es monocatenario: el valor del cociente de lectura de absorbancia medidas a 260 y 280 nm permitirá estimar la pureza de los ácidos nucleicos. Si este cociente oscila entre 1.8 y 2.0nm esto indica que el ADN de la muestra es suficientemente puro para poder ser cuantificado y empleado en la PCR.

#### **6.2.5. Determinación de la Integridad de ADN**

La integridad del ADN se verificó mediante la Técnica de Electroforesis. Primero se preparó un gel de agarosa al 1% de la siguiente forma: Se pesó la agarosa en una balanza analítica, posteriormente se mezcló en un matraz con solución TAE 1X y se homogenizó en un horno de microondas durante varios segundos (50-70).

Cada muestra se preparó mezclando 5 µl de ADN con 2µl de búfer de carga (blue-orange con gel red). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Una vez cargadas las muestras en el gel, éste se sumergió completamente en solución búfer TAE 1x en la cámara de Electroforesis. El ADN migra entre los 80-100 voltios desde el polo negativo al positivo durante 45 minutos para la separación adecuada del ADN y su visualización en un fotodocumentador.

### 6.2.6. Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

Cada una de las muestras de ADN se sometió a tres PCR anidados; para la detección de *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale*. Los oligonucleótidos empleados fueron sintetizados comercialmente por la empresa IDT (EUA). En el cuadro 2 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos y el gen diana para cada una de los patógenos. Los oligonucleótidos de cada par (Forward y Reverse) fueron marcados en el extremo 5' con gel red, para poder observarlos posteriormente mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 1.8%.

**Cuadro 3: Cebadores empleados en la amplificación por PCR anidada**

Agente	Cebador	Secuencia (5' – 3')
<i>Babesia bigemina</i> (gen:gp45) <sup>1</sup>	B.bigF	5'-CATCTAATTTCTCTCCATACCCC-3'
	B.bigR	5'-CCTCGGCTTCAACTCTGATGCC -3'
	B.BiFint	5'-CGCAAGCCCAGCACGCCCCGGT -3'
	B.biRint	5'-CCGACCTGGATAGGCTGTGATG -3'
<i>Babesia bovis</i> (gen: rap-1) <sup>1</sup>	B.boF	5'-CGAGGAAGG -3' AACTACCGATG-3'
	B.boR	5'-GCAGCTTCAACGTACGAGGT -3'
	B.boFint	5'-TGGCTACCATGAACTACAAGACTTA-3'
	B.boRint	5'-GAGCAGAACCTTCTTCACCAT -3'
<i>Anaplasma marginale</i> (gen:msp5) <sup>2</sup>	A.mF	5'-GCATAGCCTCCCCCTCTTTC -3'
	A.mR	5'-TCCTCGCCTTGCCCCTCAGA-3'
	A.mFint	5'-TACACGTGCCCTACCGACTTA-3'

Tomado de: <sup>1</sup>Figuroa *et.al.* 1993 y <sup>2</sup>Torioni *et.al.*,1998

Los tiempos y los componentes de la reacción para la PCR anidada se muestran en los siguientes cuadros.

**Cuadro 4: Componentes para la PCR Anidada.**

Componentes	Paso 1	Paso 2
H <sub>2</sub> O	Hasta volumen final de 25 µl	Hasta volumen final de 25 µl
GoTaqBuffer 10X	1X (12.5mM MgCl <sub>2</sub> )	1X (12.5mM MGCl <sub>2</sub> )
Primer Fw	1 µl	1 µl
Primer Rv	1 µl	1 µl
DNA	X (≈ 100ng)	1 µl del producto del paso 1
Volumen final	25 µl	25 µl

**Cuadro 5 Temperatura y tiempos de termociclado empleados en la PCR anidada para cada uno de los agentes**

	Ciclo <i>Babesia</i> spp	Ciclo <i>A. marginale</i>
<b>Ciclado 1</b>	95°C 5 min 95°C 1 min 56.9°C 1 min 73°C 1 min 73°C 10 min } <u>X 35</u>	94°C 3 min 95°C 30 seg 65°C 58 seg 72°C 30min 72°C 10 min } <u>X 15</u>
<b>Ciclado 2</b>	95°C 5 min 95°C 1 min 56.9°C 1 min 73°C 1 min 73°C 10 min } <u>X 35</u>	95°C 3 min 95°C 30 seg 65°C 50 seg 72°C 40 seg 72°C 10 min } <u>X 35</u>

#### 6.2.7. Ensayo inmuno-enzimático en placa (ELISA)

Para el diagnóstico serológico de *A. marginale* se utilizó la prueba de ELISA, siguiendo el protocolo del PADIANA VET. (Paquete para la detección de anticuerpos ANTI *Anaplasma marginale* en bovinos) del laboratorio de anaplasmosis de INIFAP- CENID Parasitología Veterinaria.

Las muestras de suero obtenidas se colocaron por triplicado en placas de poliestireno de 96 pozos, previamente sensibilizadas con 5 µg de antígeno de *A. marginale* (cepa Yucatán) y bloqueadas con una solución de leche descremada en polvo al 5% SSAF/Tween 20. Se

utilizó un volumen de 200 µl por pozo de una dilución 1:100 sueros-SSAFT, incluyendo controles positivos y negativos. Se incubaron durante una hora a 37°C, posteriormente se lavaron las placas con una solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (SSAF)–Tween 20 al 0.05%, a temperatura ambiente por tres ocasiones. Después de los lavados, se agregó el conjugado de anti-IgG bovina de origen cabra con fosfatasa alcalina, diluido a una concentración de 1:5,000 en SSAF/Tween 20 en un volumen de 200µl por pozo y se incubaron las placas por una hora a 37°C y se repitieron los lavados. A continuación del último lavado, se depositaron 200 µl por pozo del sustrato p-nitrofenilfosfato al 0.075% en solución reguladora de Tris 100Mm, pH 9.5. Se incubaron las placas por 50 minutos a 37°C y en un espectrofotómetro se registró la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm; los valores se expresaron en unidades de densidad óptica. La determinación de positividad se estableció para los sueros que presentaron valores superiores al punto de corte, calculado como resultado del promedio de densidad óptica de los controles negativos más 3 veces su desviación estándar. (Preciado *et al.*, 2006).

#### **6.2.8 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

El diagnóstico serológico de *Babesia* spp. se realizó mediante el protocolo de IFI establecido en el laboratorio de babesiosis del CENID-PAVET. Se utilizó un antígeno proveniente de cultivo *in vitro* del cual se elaboraron frotis delgados en láminas porta objetos para cada especie de *Babesia*. con un porcentaje de parasitemia determinado (*Babesia bovis* 5%, *B. bigemina* 6%), los frotis se fijaron con acetona. Al suero se le realizó una dilución de 1:80 en PBS incluyendo controles positivos y negativos, se dejan incubar a 37°C por 30 min y se lavaron con PBS dos veces y una con agua destilada, cada lavado tiene una duración de 5 minutos; se adiciona el conjugado de anti-IgG bovino con ALEXA 488 elaborado en ratón (1:200 en PBS). Se repiten los lavados y se dejan secar los frotis. Para la lectura se debe colocar una gota de glicerina en dilución (1:10) en PBS y se observen el microscopio de epifluorescencia a 100x. Tomando como positivo una señal igual o mayor al control positivo de la reacción fluorescente (Castillo *et al.*, 2017).



### **6.3 Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante una prueba T student para ver la diferencia entre grupos, y un análisis de varianza (ANOVA) de muestras pareadas independientes para la comparación de medias entre los grupos. Los análisis estadísticos se realizaron por medio del programa estadístico SPSS versión 23®.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron pruebas serológicas y moleculares a las madres con la finalidad de demostrar la endemidad en la zona, los resultados se muestran en el cuadro 6 donde se evidencia las prevalencias de cada uno de los agentes en las madres de cada grupo experimental.

**Cuadro 6. Número y porcentaje de madres reactivas positivas en serología y en la reacción en cadena de la polimerasa para *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale***

	Total, de las madres positivas					
	<i>Babesia bovis</i>		<i>Babesia bigemina</i>		<i>Anaplasma marginale</i>	
	IFI	PCR	IFI	PCR	ELISA	PCR
<b>Calostro comercial N=10</b>	9/10	10/10	9/10	5/10	7/10	10/10
<b>Calostro materno N=16</b>	13/16	15/16	12/16	6/16	12/16	14/16
<b>Prevalencia %</b>	95.6	96.1	91.3	42.3	82.6	92.6

La seroprevalencia obtenida fue para *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* fue 95.6% y 91.3% respectivamente, a su vez en *Anaplasma marginale* fue de 82.6 %; las cuales se encontraron elevadas en comparación con la reportada por Ortega (1982), la cual fue obtenida en la misma región que el presente estudio; donde, para *Babesia spp.* se reportó 59.9%. En tanto, Lira *et al.*, (2015) reportan una prevalencia en el sitio experimental “Aldama” localizado en Tamaulipas de 90.2% para *B. bovis* y de 83.7% para *B. bigemina*. También, en el centro experimental “La Posta” situado en el estado de Veracruz, las prevalencias reportadas fueron de 73.1% para *B. bigemina* que se asemeja a los resultados de este trabajo. En tanto para *B. bovis* tuvo una prevalencia de 64.5% En contraste de lo encontrado en este trabajo.

La seroprevalencia de anaplasmosis se encuentra dentro de los rangos reportados por García-Tapia (1996), quien reportó, en zonas cercanas a la región donde se realizó este trabajo, un porcentaje del 76 al 100% de animales positivos. Por otro lado, Cossío-Bayugar *et al.*, (1997) en la zona norte de Veracruz reportaron una prevalencia del 54.6%, y Rodríguez-Vivas *et al.*, (2004) reportan, para el estado de Yucatán, una seroprevalencia de 69.75%, estas se encuentran por debajo de las presentadas en presente trabajo; esto puede deberse al tipo de pruebas utilizadas ya que en los trabajos antes mencionados las pruebas utilizadas fueron la fijación del complemento y aglutinación en placa. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la alta endemidad que se tenía en la zona de estudio.

En los cuadros 7 y 8 se muestra las concentraciones de inmunoglobulinas en el calostro de las madres mediante el calostrómetro, donde se evidencia una fluctuación de los valores en las concentraciones de las inmunoglobulinas. La calidad del calostro está determinada por la concentración de inmunoglobulinas, donde se considerará que un calostro de buena calidad debe de tener una concentración mínima de 50 mg/ml (Dunn *et al.*, 2017). Esto con la finalidad de asegurar una transferencia adecuada de la inmunidad pasiva al becerro (Reyes *et al.*, 2015).

**Cuadro 7: Concentración de Inmunoglobulinas del calostro, de las madres con Calostrómetro para grupo de calostro comercial**

Número de vaca	(Ig) mg/ml
1180	20
1182	60
9883	100
6137	80
6138	100
1188	110
9880	80

1123	40
19917	120

**Cuadro 8: Concentración de Inmunoglobulinas del calostro, de las madres con Calostrómetro para grupo de calostro materno**

Número de vaca	(Ig) mg/ml
1189	40
1199	40
1239	40
9866	10
1198	40
9872	60
1185	90
1195	80
9863	70
9932	100
9874	110

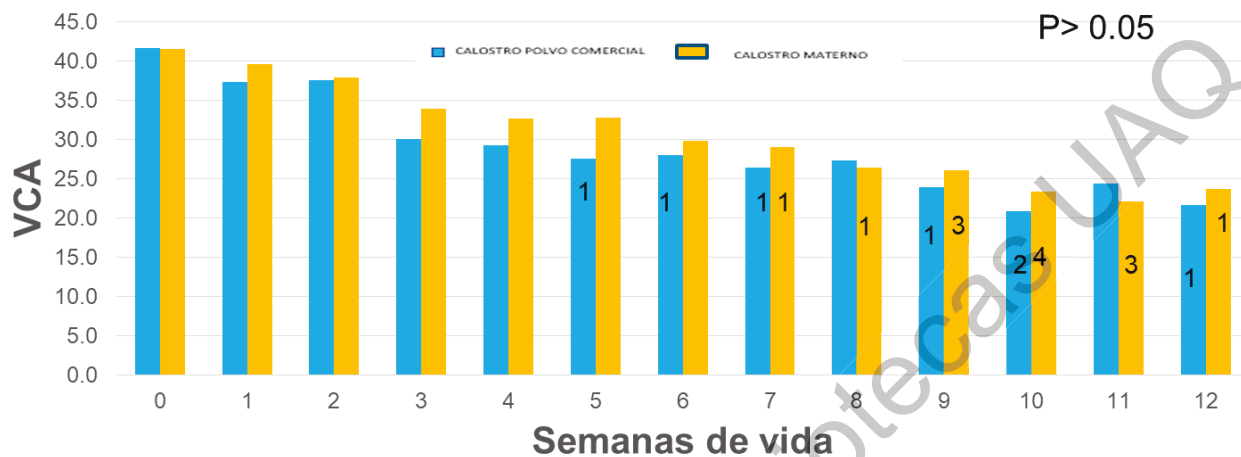
Durante el periodo experimental, los animales fueron monitoreados mediante frotis sanguíneo, para el cual, en ninguno de los animales se detectó la presencia de *Babesia bovis*, 4 animales fueron positivos a *Babesia bigemina* y todos los animales resultaron positivos a *Anaplasma marginale*. Se realizaron pruebas serológicas y moleculares a los becerros a las 8 semanas de vida, con excepción de la prueba de ELISA para *Anaplasma marginale* que se realizó a las 14 semanas después del nacimiento. Los resultados se muestran en el cuadro 9.

**Cuadro 9. Número y Porcentaje de becerros reactores positivos en serología y en la reacción en cadena de la polimerasa para *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale***

	<i>Babesia bovis</i> *		<i>Babesia bigemina</i> *		<i>Anaplasma marginale</i> **	
	IFI	PCR	IFI	PCR	ELISA	PCR
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>Calostro comercial</b>	<b>10/10 (100.0)</b>	<b>9/10 (90.0)</b>	<b>8/10 (80)</b>	<b>9/10 (90)</b>	<b>4/10 (40)</b>	<b>9/10 (90)</b>
<b>Calostro materno</b>	<b>14/16= (87.5)</b>	<b>16/16 (100.0)</b>	<b>13/16 (81.25)</b>	<b>16/16 (100.0)</b>	<b>9/16 (56.25)</b>	<b>12/16 (75.0)</b>
<b>Prevalencia</b>	<b>92.3</b>	<b>96.1</b>	<b>80.7</b>	<b>96.1</b>	<b>50.0</b>	<b>80.7</b>

(\* IFI a las 8 semanas de edad y \*\*ELISA a las 14 semanas de edad)

Según lo reportado por Osorio *et al.*, (2010) se puede determinar epidemiológicamente una zona estable a babesiosis si se tiene una seropositividad mayor al 75% en animales con edades entre los tres y nueve meses de edad. Por lo cual y en comparación a lo encontrado en este trabajo, podemos determinar la estabilidad enzoótica en los animales hacia *Babesia spp.*, ya que a los 2 meses de edad hay una seropositividad mayor al 75; Solís-Calderón *et al* (1998), evaluaron la dinámica de los anticuerpos para *B. bigemina* en animales jóvenes, encontrando una prevalencia de presencia de inmunoglobulinas del tipo G en animales menores a los tres meses de edad de 57.3%, la cual es inferior a lo encontrado en este trabajo con edades similares.



**Figura 5: Promedio de volumen celular aglomerado para el grupo de calostro en polvo comercial y para el grupo de calostro materno por semana de vida**

En la figura 5 se muestra el promedio de volumen celular aglomerado en cada grupo de los animales por semana de vida, dentro de cada barra por semana los números de animales que presentaron anaplasmosis clínica en cada uno de los grupos, a los cuales se les se les considero muerte experimental, por requerir un tratamiento.

El monitoreo constante de los animales durante este trabajo permitió observar anaplasmosis clínica. Se determinó muerte experimental a 7 de 10 animales del grupo de CC por lo que fueron tratados para la enfermedad, a su vez 13 de 16 animales para el grupo de CM fueron tratados por la misma situación. Con base en el descenso de VCA se realizó una prueba de T student, para determinar la diferencia entre los grupos, en la cual no se encontró diferencia estadística ( $P=>0.05$ )

Los resultados mostrados en el presente estudio confirman lo señalado por Mahoney *et al.*, (1973) en cuanto a la existencia de una resistencia innata que presentan los becerros en contra de *Babesia* spp. Dicha resistencia se debe a los mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa relacionada con las moléculas producidas por los macrófagos activados, liberación de citocinas proinflamatorias y óxido nítrico como lo describe: Brown *et al.*, (1991), Goff *et al.*, (2001,2002 y 2010), Shoda *et al.*, (2000); sin embargo, en relación a

anaplasmosis nuestros resultados indican que no se presenta una resistencia en los animales menores a los 9 meses como la describe Lahmers *et al.*, (2006); posiblemente debido a una inadecuada respuesta inmune a la rickettsia en animales jóvenes que se encuentran en zonas con alta endemicidad, lo que no corresponde a lo señalado por: Carson *et al.*, (1976), Araujo *et al.*, (2003) donde indican que es un proceso de la respuesta solida de tipo celular. En tanto, si podemos corroborar lo descrito por Zaugg y Kuttler en (1984) donde la ingesta de calostro con anticuerpos contra *A. marginales* no protegió, pero si prolongo el periodo de prepatencia.

Ambos resultados indican claramente que la ingesta de calostro no interfiere en la resistencia a anaplasmosis y babesiosis en becerros de zona de alta endemicidad, que la resistencia está dada por mecanismos innatos de los individuos.

## VIII. CONCLUSIONES

- La prevalencia encontrada en las madres determinó la endemicidad de babesiosis y anaplasmosis en la zona analizada.
- Los animales, desde su nacimiento, se encuentran expuestos al vector y a la infección por *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale*.
- Se observó que, sin importar la fuente de calostro, los becerros son capaces de controlar la infección a *Babesia spp.*
- Para *A. marginale*, los animales presentan la enfermedad de manera aguda sin importar el origen del calostro que hayan consumido.



## IX. LITERATURA CITADA

1. Aboytes, R., Buening G., Figueroa J. y Vega C., 1991. El uso de sondas ADN para el diagnóstico de hemoparásitos. Rvta. Cub. Cienc. Vet. 22 (3) 173-181
2. Allred, D. R. 1995. Immune evasion by *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: cliff-dwellers of the parasite world. Parasitol Today. 11(3), 100-105
3. Allred, DR (2003). Babesiosis: persistencia ante la adversidad. Tendencias en parasitología , 19 (2), 51-55.
4. Alonso, M., Arellano-Sota, C., Cereser, V. H., Cordoves, C. O., Guglielmo, A. A., Kessler, R., y Vega, M. C. A. 1992. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin América and the Caribbean. Rev. - Off. Int. Epizoot. 11, 713-713.
5. Alonso-Díaz, M. A., Rodríguez-Vivas, R. I., Fragoso-Sánchez, H., & Rosario-Cruz, R.,2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Archivos de medicina veterinaria, 38(2), 105-113
6. Anderson, J. F., y Magnarelli, L. A. 2008. Biology of ticks. infect. Dis. Clin. North Am. 22(2), 195-215.
7. Araújo, F. R., Madruga, C. R., Soares, C. O., y Kessler, R. 2003. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. Pesq Vet Bras. 23(4), 139-148.
8. Aubry, P., y Geale, D. W. 2011. A review of bovine anaplasmosis. Transbound Emerg Dis. 58(1), 1-30.
9. Babes, V. 1888. Sur l'hémoglobinurie bacteriennedu boeuf.comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academic des Sciences,Paris 107,692-694-
- Tomado de Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., y Jorgensen, W. 2004. Babesiosis of cattle. Parasitology. 129(S1), S247-S269.
10. Baccili, C. C., de Oliveira, S. M. F. N., Costa, J. F. R., Massoco, C. D. O., Pozzi, C. R., y Gomes, V. 2018. Hematological and immunological development from birth to six months of age in Holstein calves. Arq Bras Med Vet Zootec. 70(6), 1823-1832.32.
11. Barrington, G. M., y Parish, S. M. 2001. Bovine neonatal immunology. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 17(3), 463-476.

12. Bastos, R. G., Johnson, W. C., Mwangi, W., Brown, W. C., y Goff, W. L. 2008. Bovine NK cells acquire cytotoxic activity and produce IFN- $\gamma$  after stimulation by *Mycobacterium bovis* BCG-or *Babesia bovis*-exposed splenic dendritic cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124(3-4), 302-312.
13. Bautista Garfías, C. R., Pedraza Alva, G., Rosenstein Azoulay, Y., y Ontiveros Fernández, J. 2003. Estudio de la respuesta inmune humoral y celular en la infección y reinfección experimental de bovinos con *Anaplasma marginale*. *Vet. Mex.* 34(3)..
14. Bock, R. E., Kingston, T. G., y De Vos, A. J. 1999. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* 77(7), 461-464.
15. Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., y Jorgensen, W. 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology.* 129(S1), S247-S269.
16. Brown, W. C., Zhao S., Woods V. M., Dobbelaere D. A. E., Y amp; Ficht A. R. 1993. *Babesia bovis*-specific CD4+ T cell clones from immune cattle express either the Th0 or Th1 profile of cytokines. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* 46(1-2), 65-69.
17. Brown, W. y Logan K., 1992. *Babesia bovis*: Bovine helper T cell lines reactive with soluble and membrane antigens of merozoites. *Exp Parasitol.* vol. 74, (2) 188-199
18. Brown, W. C. 2012. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: implications for bacterial persistence. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35(3), 241-252.
19. Brown, W. C., Logan, K. S., Wagner, G. G., y Tetzlaff, C. L. 1991. Cell-mediated immune responses to *Babesia bovis* merozoite antigens in cattle following infection with tick-derived or cultured parasites. *Infect. Immun.* 59(7), 2418-2426.
20. Brown, W. C., McGuire, T. C., Zhu, D., Lewin, H. A., Sosnow, J., y Palmer, G. H. 2001. Highly conserved regions of the immunodominant major surface protein 2 of the genogroup II ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* are rich

in naturally derived CD4<sup>+</sup> T lymphocyte epitopes that elicit strong recall responses. *J. Immunol.* 166(2), 1114-1124.

21. Brown, W. C., Ruef, B. J., Norimine, J., Kegerreis, K. A., Suarez, C. E., Conley, P. G., y Rice-Ficht, A. C. 2001. A novel 20-kilodalton protein conserved in *Babesia bovis* and *B. bigemina* stimulates memory CD4<sup>+</sup> T lymphocyte responses in *B. bovis*-immune cattle. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 118(1), 97-109.
22. Brown, W. C., Shkap, V., Zhu, D., McGuire, T. C., Tuo, W., McElwain, T. F., y Palmer, G. H. 1998. CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect. Immun.* 66(11), 5406-5413.
23. Buling, A., Criado-Fornelio, A., Asenzo, G., Benitez, D., Barba-Carretero, J. C., y Florin-Christensen, M. 2007. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.* 147(1-2), 16-25
24. Bush, L. Joo, and T. E. Staley. 1980, Absorption of colostral immunoglobulins in newborn calves." *Journal of Dairy Science* 63.(4 ): 672-680.
25. Carson, C. A., Sells, D. M., y Ristic, M. 1976. Cell-mediated immunity in bovine anaplasmosis and correlation with protection induced by vaccination (a review). *Vet. Parasitol.* 2(1), 75-81.
26. Castillo-Péres I., Lira-Amaya J., Castañeda-Arriola R., Cantú-Covarrubias A., Mejía-Estrada J., Polanco-Martinez D., Álvarez-Martínez J., Rojas-Martínez C. y Figueroa-Millan J., 2017. Comparación de pruebas serológicas para el diagnóstico epidemiológico de babesiosis bovina. *Entomol. Mex.* 4:621-626.
27. Chandler, D., Davidson, G., Pell, J. K., Ball, B. V., Shaw, K., y Sunderland, K. D., 2000. Fungal biocontrol of Acari. *Biocontrol Environ. Sci. Technol.*, 10(4), 357-384.
28. Chaudhry, Z. I., Suleman, M., Younus, M., y Aslim, A. 2010. Molecular detection of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in crossbred carrier cattle through PCR. *Pak J Zool.* 42(2).

29. Cossio-Bayugar, R., Rodriguez, S. D., Garcia-Ortiz, M. A., Garcia-Tapia, D., y Aboytes-Torres, R. 1997. Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. *Prev. Vet. Med.* 32(3-4), 165-170.
30. de Echaide, S. T., Knowles, D. P., McGuire, T. C., Palmer, G. H., Suarez, C. E., y McElwain, T. F. 1998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J. Clin. Microbiol.* 36(3), 777-782.
31. Domínguez-García, D. I., Rosario-Cruz, R., Almazán-García, C., Oaxaca, J. A. S., y De la Fuente, J., 2010,. *Boophilus microplus*: aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12(2), 181-192.
32. Domínguez-García, Agatón, FT y Rosario-Cruz, R.,2016, Nota económica del control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en México / Evaluación económica del control de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) en México. *CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias* , 5 (9), 43-52.
33. Doyle, R. L., Da Silva, A. S., Oliveira, C. B., França, R. T., Carvalho, F. B., Abdalla, F. H., y Castro, V. S. 2016. Cholinesterases as markers of the inflammatory process associated oxidative stress in cattle infected by *Babesia bigemina*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 46, 1-6.
34. Dunn, A., Ashfield, A., Earley, B., Welsh, M., Gordon, A., y Morrison, S. J. 2017. Evaluation of factors associated with immunoglobulin G, fat, protein, and lactose concentrations in bovine colostrum and colostrum management practices in grassland-based dairy systems in Northern Ireland. *J. Dairy Sci.* 100(3), 2068-2079.
35. Echeverry, D. P., y Osorio, L. A. R. 2016. Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Cienc. Tecnol. Agropecuaria*, 17(1), 81-95.
36. Edwards, S. A., Broom, D. M., y Collis, S. G. 1982. Factors affecting levels of passive immunity in dairy calves. *Br. Vet. J.* 138(3), 233-240.

37. Enbiyale, G., Yirga A., Tesfaye A., Negash A., Aman E., Y. and Debalike D. 2018. Review of Heart Water Disease in Domestic Animals. Aust. J. Agric. Res. 3(09).
38. Eriks, I. S., Stiller, D., y Palmer, G. H. 1993. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. J. Clin. Microbiol. 31(8), 2091-2096.
39. Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J. L., Guglielmone, A., Horak, I., Jongejan, F., y Walker, A. R. 2006. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. Exp. Appl. Acarol., 38(2-3), 219-235.
40. Everitt, J. I., Shaddock, J. A., Steinkamp, C., y Clabaugh, G. 1986. Experimental *Babesia bovis* infection in Holstein calves. Vet. Pathol. 23(5), 556-562.
41. Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R. I., y Alonso-Díaz, M. A. 2012, First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. Veterinary Parasitology, 183(3-4), 338-342.
42. Figueroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson, G. S., y Buening, G. M. 1993. Multiplex polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. Vet. Parasitol, 50(1-2), 69-81.
43. Foil, L. D., Coleman, P., Eisler, M., Fragosó-Sánchez, H., García-Vázquez, Z., Guerrero, F. D., y Miller, R. J. 2004. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. Vet. Parasitol. 125(1-2), 163-181.
44. Godden S., 2008. Colostrum Management for dairy calves. vet clin food Anim.24 19-39
45. Goff, W. L., Johnson, W. C., Horn, R. H., Barrington, G. M., y Knowles, D. P. 2003. The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. Parasite Immunol. 25(4), 185-188.
46. Goff, W. L., Johnson, W. C., Parish, S. M., Barrington, G. M., Elsasser, T. H., Davis, W. C., y Valdez, R. A. 2002. IL-4 and IL-10 inhibition of IFN- $\gamma$ -and

TNF- $\alpha$ -dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 84(3-4), 237-251.

47. Goff, W. L., Johnson, W. C., Parish, S. M., Barrington, G. M., Tuo, W., y Valdez, R. A. 2001. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- $\gamma$  and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunol.* 23(9), 463-471.
48. Gohil, S., Herrmann, S., Günther, S., y Cooke, B. M. 2013. Bovine babesiosis in the 21st century: advances in biology and functional genomics. *Int. J. Parasitol.*, 43(2), 125-132.
49. Gonzalez, D. D., y Dus Santos, M. J. 2017. Bovine colostrum cells—the often-forgotten component of colostrum. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 250(9), 998-1005.
50. Good, R. A., y Papermaster, B. W. 1964. Ontogeny and phylogeny of adaptive immunity. *Adv. Immunol.* Academic Press. (Vol. 4, pp. 1-115).
51. Guglielmone, A. A. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57(1-3), 109-119
52. Guglielmone, A. D., Mangold, A. J., Bermudez, A. C., y Hadani, A. 1985. Detección de merozoítos grandes (vermiculos) de *Babesia* en teleoginas de *Boophilus microplus* alimentadas sobre terneros con distintos niveles de parasitemia de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* (= *Babesia argentina*). *Rev Iber Parasitol.* 45(4), 303-311.
53. Han, S., Norimine, J., Palmer, G. H., Mwangi, W., Lahmers, K. K., y Brown, W. C. 2008. Rapid deletion of antigen specific CD4+ T cells following infection represents a strategy of immune evasion and persistence for *Anaplasma marginale*. *J. Immunol.* 181(11), 7759-7769.
54. Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J., y Persing, D. H. 2000. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13(3), 451-469.
55. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., y Kuby, J. (2007). *Inmunología de Kuby* (No. Sirsi) i9789701064542).

56. Kocan, K. M., Blouin, E. F., y Barbet, A. F. 2000. Anaplasmosis control: past, present, and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916(1), 501-509.
57. Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., y Ewing, S. A. 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 167(2-4), 95-107.
58. Kocan, K. M., De la Fuente, J., Guglielmone, A. A., y Meléndez, R. D. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(4), 698-712.
59. Lago, A., Socha, M., Geiger, A., Cook, D., Silva-del-Río, N., Blanc, C., y Leonardi, C. 2018. Efficacy of colostrum replacer versus maternal colostrum on immunological status, health, and growth of preweaned dairy calves. *J. Dairy Sci.* 101(2), 1344-1354.
60. Lira, A. J. J., Vargas, U. P., Cantú, C. A., Castañeda, A. R. O., Álvarez, M. J. A., Rojas, M. C., y Figueroa, M. J. V, 2015, prevalencia de babesiosis bovina en dos explotaciones del país utilizando prueba serológica con antígenos recombinantes. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, que es esto??? 217.15.
61. Lohr KF. 1973: Susceptibility of non-splenectomized and Splenectomized Sahiwal cattle to experimental *Babesia bigemona* infection. *Zentralbl Veterinar med A.* 20,52-56.
62. Mahoney D. F. y Ross F.R. 1972. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis, *Aust. Vet. J.* 48 ,292-298.
63. Mahoney, D. F. 1964. Bovine babesiosis: an assessment of the significance of complement fixing antibody based upon experimental infection. *Aust. Vet. J.* 40(11), 369-375.
64. Mahoney, D. F., Wright, I. G., y Mirre, G. B. 1973. Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. *Ann Trop Med Parasitol.* 67(2), 197-203.
65. McGee, M., y Earley, B. 2019. Passive immunity in beef-suckler calves. *Animal.* 13(4), 810-825.

66. Meléndez R. D., Benítez M. T., Niccita G., Moreno J., Puzzar S., y Morales, J. 2003. Humoral immune response and hematologic evaluation of pregnant Jersey cows after vaccination with *Anaplasma centrale*. *Vet. Microbiol.* 94(4), 335-339.
67. Meléndez, R. D. 1998. Revisión integral de los factores epidemiológicos que inciden en la relación *Boophilus microplus*-bovino-*Babesia spp.* *Rev. Cientif. FCV- LUZ.* 8(1).
68. Montenegro-James, S. 1992. Prevalence and control of babesiosis in the Américas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 87(suppl3):27-36
69. Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, G., y J Canto, G. 2012. Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Curr. Med. Chem.* 19(10), 1504-1518.
70. Munderloh, U. G., Lynch, M. J., Herron, M. J., Palmer, A. T., Kurtti, T. J., Nelson, R. D., y Goodman, J. L. 2004. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet. Microbiol.* 101(1), 53-64.
71. Neitz, W. O. 1956. Classification, transmission, and biology of piroplasms of domestic animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 64(2), 56-111.
72. Noh, S. M., Brayton, K. A., Brown, W. C., Norimine, J., Munske, G. R., Davitt, C. M., y Palmer, G. H. 2008. Composition of the surface proteome of *Anaplasma marginale* and its role in protective immunity induced by outer membrane immunization. *Infect. Immun.* 76(5), 2219-2226.
73. Novo, S. M. F., dos Reis Costa, J. F., Baccili, C. C., Sobreira, N. M., Silva, B. T., de Oliveira, P. L., y Gomes, V. 2017. Effect of maternal cells transferred with colostrum on the health of neonate calves. *Res. Vet. Sci.* 112, 97-104.
74. OIE, 2014. Código Sanitario para los animales terrestres .3(4.2)1-18
75. Oliveira, P. A., Alves, D. M., Zamboni, R., Scheid, H. V., Alberti, T. S., Marcolongo-Pereira, C., y Sallis, E. S. V. 2018. Cerebral babesiosis in calves. *Pesqui. Vet. Bras.* 38(5), 832-834.
76. Ortega O.L.G., 1982, Prevalencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* y *Babesia spp.* en bovinos de la raza pardo suizo y Cebú en el clima Af(c). Tesis de licenciatura. Fac. de Est. Sup. Cuautitlán. UNAM.



77. Pastoret, P. P., Griebel, P., Bazin, H., y Govaerts, A. 1998. Handbook of vertebrate immunology. Academic Press. San Diego.
78. Potgieter, F. T., y L. Van Rensburg, 1987: The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies in incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. Onderstepoort J. Vet. Res. 54, 57-560.
79. Preciado de la torre J., Garcia M., Rodriguez S., 2006. Guía Técnica para la detección de anticuerpos anti *Anaplasma marginale* en bovinos con el paquete PAdianaVET. INIFAP-CENID- Parasitología Veterinaria, 1-20.
80. Quiroz-Castañeda, R. E., Amaro-Estrada, I., y Rodríguez-Camarillo, S. D. 2016. *Anaplasma marginale*: diversity, virulence, and vaccine landscape through a genomics approach. Biomed Res Int. 2016.
81. Rivera, E. D. 2012. Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus microplus*. Rev colombiana Cienc Anim. Recia. 5(1).
82. Rodríguez, S. D., Ortiz, M. Á. G., Ocampo, R. J., Vega y Murguía, C. A.. 2009. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. Infect. Genet. Evol., 9(6), 1092-1101.
83. Rodríguez-Vivas RI, Mata-Méndez Y., Pérez-Gutiérrez E., y Wagner G. 2004. El efecto de los factores de manejo en la seroprevalencia de *Anaplasma marginale* en el ganado *Bos indicus* en el trópico mexicano. Trop Anim Health Prod, 36 (2), 135-143.
84. Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., Pérez de León, A. A., Silva Villela, H., Torres-Acosta, J. F. D. J., Fragoso Sánchez, H., Y-García Carrasco, D. 2017. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. Rev Mex Cienc Pecu. 8(1).
85. Rodríguez-Vivas, RI, Rosado-Aguilar, JA, Ojeda-Chi, MM, Pérez-Cogollo, LC, Trinidad-Martínez, I. y Bolio-González, M. E. 2014, Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. Ecosistemas y recursos agropecuarios , 1 (3), 295-308.

86. Rogers RJ 1979. Epidemiología y control de la anaplasmosis en Australia. *J S Afr Vet Assoc.* 50 (4), 363-366.
87. Saad-Roy, C. M., Shuai, Z., Y van den Driessche, P. 2015. Models of bovine babesiosis including juvenile cattle. *Bull. Math. Biol.* 77(3), 514-547.
88. Salem, N. Y., Yehia, S. G., Farag, H. S., Y Elkhayat, M. A. 2016. Clinical, hemato-biochemical alterations and oxidant-antioxidant biomarkers in Babesia-infected calves. *Int J Vet Sci Med.* 4(1), 17-22.
89. Santarosa, B. P., Dantas, G. N., Ferreira, D. O. L., Rocha, N. S., Gonçalves, R. C., Amorim, R. M., Y Chiacchio, S. B. 2013. Infecção neurológica por Babesia bovis em bovino neonato: relato de caso. *Vet e Zootec.* 20(3), 9-14
90. Schneider, D. A., Yan, H., Bastos, R. G., Johnson, W. C., Gavin, P. R., Allen, A. J., Y Goff, W. L. 2011. Dynamics of bovine spleen cell populations during the acute response to Babesia bovis infection: an immunohistological study. *Parasite Immunol.* 33(1), 34-44.
91. Shoda, L. K., Palmer, G. H., Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Godson, D. L., Y Brown, W. C. 2000. Babesia bovis-stimulated macrophages express interleukin-1 $\beta$ , interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infect. Immun.* 68(9), 5139-5145.
92. Smith RD.1978, Ciclo biológico de Babesia en la garrapata. En: Moreno ChR editor. *Ciencia Veterinaria Vol 2*, UNAM, México. :233-264.
93. Smith, T. y Kilborne, F.L. 1893. Investigation into the nature, causation and prevention of Southern cattle fever. In Ninth Annual Report of the Bureau of animal industry for the Year 1892, pp. 177-304. Washington, Government Printing office. Tomado de Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., y Jorgensen, W. 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology.* 129(S1), S247-S269.
94. Solís-Calderón J.J., Rodríguez-Vivas R. I., y Dajer-Abimerhi A. 1998. Monitoreo serológico de anticuerpos (IgG e IgM) contra Babesia bigemina (*Haemosporidia: Babesiidae*) en becerros del trópico mexicano. *Rev. biol. Trop.* 1125-1130.

95. Solorio-Rivera, J. L., Y Rodríguez-Vivas, R. I. 1997. Epidemiología de la babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. *Biomédica*, 8(2).
96. Staley, TE y Bush, LJ (1985). Mecanismos de los receptores del intestino neonatal y su relación con la absorción y la enfermedad de inmunoglobulina, 2. *Journal of milk science* , 68 (1), 184-205.
97. Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., Y Wheeler, T. T. 2009. Immune components of bovine colostrum and milk. *J. Animal Sci.* 87(suppl\_13), 3-9.
98. Suárez CE, y Noh S. (2011). Perspectivas emergentes en la investigación de la babesiosis bovina y la anaplasmosis. *Vet. Parasito.*, 180 (1-2), 109-125.
99. Theiler, A., 1911. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. In: 1st Report of the director of Veterinary Research. Department of Agriculture of the Union of South Africa, pp. 7-46. Tomado de: Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., y Ewing, S. A. 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 167(2-4), 95-107.
100. Tizard, I. R. 2009. Introducción a la inmunología veterinaria. Elsevier Health Sciences. 18:233-236
101. Uilenberg, G. 2006. Babesia—a historical overview. *Vet. Parasitol.* 138(1-2), 3-10.
102. Wilson, C. B., Penix, L., Weaver, W. M., Melvin, A., Y Lewis, D. B. 1992. Ontogeny of T Lymphocyte Function in The Neonate. *Am J Reprod Immunol.* 28(3-4), 132-135.
103. Wright, I. G., Goodger, B. V., y Clark, I. A. 1988. Immunopathophysiology of Babesia bovis and Plasmodium falciparum infections. *Parasitol Today.* 4(8), 214-218.
104. Wyatt CR., MAdrugá C, Cluff C., 1994. Differential distribution of gamma - delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood spleen of young and adult cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 40, 187-199
105. Yusuf, J. J. 2017. Review on Bovine Babesiosis and its Economic Importance *Jemal. J Adv Vet Res.*

106. Zaugg, J. L., & Kuttler, K. L. 1984. Bovine anaplasmosis: in utero transmission and the immunologic significance of ingested colostral antibodies, *Am J Vet Res*, 45(3), 440-443.

Dirección General de Bibliotecas UAQ