

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"EVALUACIÓN DE UN INMUNÓGENO CONGELADO DE
Babesia bovis EN VACAS EN EL SEGUNDO TERCIO DE
GESTACIÓN"

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
TÍTULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

ISELA TAVERA SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR

MVZ PhD JESÚS ANTONIO ÁLVAREZ MARTÍNEZ

MVZ PhD GERMINAL JORGE CANTÓ ALARCÓN

Querétaro, Qro. Noviembre de 2004

BIBLIOTECA CENTRAL, U.A.Q.

No. Adq. H70286

No. Título _____

Clas. TE

670-0810

1950

DEDICATORIAS

A Dios:

Por acompañarme y guiarme hasta donde estoy ahora.

A mis padres:

Por que sin su apoyo amor y confianza nunca habría logrado hacer nada de lo que hoy estoy tan orgullosa y agradecida.

A Eleazar:

Gracias por llegar a formar parte de mi vida

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores:

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Por su apoyo, paciencia y confianza en este trabajo y en especial por su amistad.

Dr. Jesús Antonio Álvarez Martínez

Por su colaboración en la realización de este trabajo.

Al Dr. Héctor Vera, del CENID-Fisiología; Por su apoyo en el aspecto reproductivo del estudio.

Al Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Querétaro, por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo, especialmente al MVZ Juan Manuel Romo Romero, director del Rancho "GB".

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias en especial al CENID-fisiología veterinaria por el apoyo brindado en el desarrollo de este trabajo.

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

A mi hermano; por estar conmigo y quererme durante toda mi vida.

A mis abuelos; gracias por su amor y apoyo en todos los sentidos en especial a papi por el tiempo que estuvo conmigo.

A mis Tíos, primos y sobrinos; por su cariño, muchas gracias en especial a mi tía Chabela donde quiera que esté.

A mis amigas y amigos; por su apoyo en las buenas y las malas siempre que lo necesite. En especial a Emma y María por todo el tiempo que compartimos durante la carrera.

A todas aquellas personas que de alguna manera me apoyaron y me dedicaron algún tiempo

A todos simplemente gracias

JURADO

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

MVZ José Ángel Alemán Castillo

MVZ Esp Alejandro Enríquez Vázquez

M. de C. María de Jesús Guerrero Carrillo

MVZ Jorge Luis Saracho Luna

ÍNDICE

Índice	i
Resumen	ii
I. Introducción	1
II. Revisión Bibliográfica	3
Historia	3
Definición	3
Sinónimos	3
Etiología	4
Taxonomía	4
Distribución Geográfica	5
Epidemiología	5
Ciclo Biológico	7
Signos	10
Patogenia	10
Lesiones Macroscópicas	12
Lesiones Microscópicas	13
Diagnóstico	14
Diagnóstico Diferencial	15
Prevención y Control	16
III. Objetivos	21
IV. Hipótesis	21
V. Material y Métodos	22
Localización	22
Animales Experimentales	22
Sincronización y Gestación de los bovinos	22
Microorganismos Experimentales	22
Esquema de inmunización y Confrontación	23
VI. Resultados y Discusión	25
Vacunación	25
Confrontación	26
VII. Conclusiones	38
VIII. Bibliografía	39
IX. Apéndices	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de <i>Babesia</i> en bovinos	4
Cuadro 2. Ciclo Biológico de <i>Babesia</i>	9
Cuadro 3. Resumen de la acción patógena	12
Cuadro 4. Anemias hemolíticas en bovinos	15
Cuadro 5. Descripción de los grupos experimentales	24
Cuadro 6. Valores obtenidos de las diferentes variables registradas durante la vacunación (medias \pm desviaciones estándar) en los diferentes grupos de animales experimentales.	26
Cuadro 7. Valores obtenidos de las diferentes variables registradas durante la confrontación (medias \pm desviaciones estándar) en los diferentes grupos de animales experimentales.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de los resultados promedio por grupo de temperatura rectal en los seis grupos experimentales durante las fases de vacunación y confrontación.	30
Figura 2. Comparación de los resultados promedio por grupo del descenso del Volumen Celular Aglomerado (VCA) en los seis grupos experimentales durante la fase de vacunación.	31
Figura 3. Comparación de los resultados promedio por grupo del descenso del Volumen Celular Aglomerado (VCA) en los seis grupos experimentales durante la fase de confrontación.	32
Figura 4. Comparación del porcentaje promedio por grupo del descenso del Volumen Celular Aglomerado (VCA) entre los animales Gestantes no vacunados (Grupo 2) y No gestantes no vacunados (Grupo 4). El día 21 PC un animal del grupo 2 abortó y fue eliminado del estudio. El día 10 PC un animal del grupo 4 murió de babesiosis aguda.	33
Figura 5. Comparación del porcentaje promedio por grupo del descenso del Volumen Celular Aglomerado entre los animales gestantes vacunados (Grupo 1) y no gestantes vacunados (Grupo 3).	34
Figura 6. Comparación del porcentaje promedio por grupo del descenso del VCA entre los animales gestantes vacunados (Grupo 1) y gestantes no vacunados (Grupo 2). El día 21 PC un animal del grupo 2 abortó y fue eliminado del estudio.	35
Figura 7. Comparación del porcentaje promedio por grupo del descenso del volumen celular aglomerado entre los animales no gestantes vacunados (Grupo 3) y no gestantes no vacunados (Grupo 4). El día 10 PC un animal del grupo 4 murió de babesiosis aguda.	36
Figura 8. Comparación del porcentaje promedio por grupo del descenso del VCA entre los animales gestantes vacunados y confrontados con <i>B. bovis</i> (Grupo 1) y gestantes vacunados y confrontados con <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i> (Grupo 5).	37

RESUMEN

Con el fin de evaluar en hembras gestantes la inocuidad y capacidad inmunoprotectora de la cepa BOR de *Babesia bovis* derivada de un cultivo *in vitro* y mantenida en Nitrógeno líquido se inocularon bovinos hembras al final del primer tercio y al inicio del segundo tercio de gestación a una dosis de 1×10^8 eritrocitos infectados (EI). Los animales se dividieron en seis grupos de tres animales cada uno; los grupos 1, 3 y 5 fueron inmunizados y los animales de los grupos 2, 4 y 6 recibieron eritrocitos normales. Los animales fueron monitoreados individualmente mediante la temperatura rectal, el volúmen celular aglomerado (VCA) y muestras de sangre para realizar frotis sanguíneos. Determinándose que la clona administrada aun conserva su infectividad, pero se comporta como atenuada. A los 57 días los animales de los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron confrontados con una cepa de campo de *B. bovis* a una dosis de 1×10^7 EI, los animales del grupo 5 fueron confrontados además con una cepa de campo de *B. bigemina* a la misma dosis. Durante la confrontación se observó que las hembras gestantes no vacunadas fueron las que presentaron el mayor descenso del VCA lo que nos indica que el estado fisiológico de la gestación puede aumentar la susceptibilidad al protozooario, por el contrario los animales vacunados fueron los que presentaron el menor descenso del VCA, lo que nos indica que hubo una buena inmunidad. Durante el desafío una de las hembras no vacunadas murió el 10 PC después de haber sufrido la enfermedad aguda y otra aborto el día 21 PC.

I. INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad hemoparasitaria causada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia* y transmitidos por garrapatas del género *Boophilus* a las cuales se les atribuye su distribución. (Ristic, 1981).

Entre las latitudes 35° Sur y 40° Norte del Ecuador, que incluye la mayoría de los países tropicales y subtropicales del mundo, es donde se encuentra la mayor incidencia de la enfermedad (McCosker, 1981; Álvarez y Cantó, 1985).

La enfermedad causada por *B. bovis* y *B. bigemina* tiene una mortalidad del 25% en animales jóvenes y de un 50 a un 90% en animales adultos (Osorno, 1978; Quiroz, 1988) sino se aplican las medidas terapéuticas a tiempo provocando pérdidas estimadas en siete mil millones de dólares anualmente en todo el mundo (Uilenberg, 1994).

Los animales que llegan a recuperarse quedan como portadores asintomáticos, disminuyendo su producción láctea, la ganancia de peso y el desarrollo somático, además pueden llegar a sufrir abortos (Kuttler, 1986; Quiroz, 1988).

En América Latina la babesiosis produjo pérdidas por 875 millones de dólares anuales (Smith, 1984) y en México las pérdidas se calcularon en 2715 millones de pesos anuales (Delegación Mexicana, FAO 1981).

A partir de la primera descripción de *B. bovis* (Babes, 1888) y del descubrimiento del huésped intermediario, la garrapata *Boophilus spp* (Smith y Kilborne, 1893) se han realizado numerosos ensayos para el control de la enfermedad producida por estos protozoarios sanguíneos. Esta incluye el control y erradicación del vector, el ataque directo mediante producción de babesicidas, la premunización con sangre proveniente de animales afectados, la vacunación con antígenos inactivados del parásito (Smith, *et al.*, 1979; Timms, *et al.*, 1983); o bien con eritrocitos infectados con parásitos atenuados mediante pases continuos en cultivo *in vitro* e irradiación (Hernández, 1990; Cantó, *et al.*, 1996; Figueroa, *et al.*, 1998).

Por la falta de información precisa sobre la distribución de la enfermedad, el desconocimiento de los factores epidemiológicos asociados a la ocurrencia de brotes, el escaso conocimiento en detalle de los mecanismos de acción del sistema inmune de los bovinos y las interacciones que permiten a los animales obtener un grado de resistencia sólida y duradera contra la babesiosis, no ha sido posible la erradicación de la enfermedad y mucho menos de la garrapata vector de la babesiosis, por lo que es necesaria la planeación, producción y distribución de una vacuna para ayudar a controlar esta enfermedad en México (Olvera, 1998).

Trabajos previos realizados por investigadores del CENID-PAVET desde 1988 han demostrado que se cuenta con una cepa de *B. bovis* clonada e irradiada (Rodríguez, *et al.*, 1983) que después de ser evaluada en condiciones controladas de campo es capaz de proteger a más del 90% de los animales vacunados contra la confrontación de aislados patógenos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

HISTORIA

El gobierno Rumano en 1887, en respuesta a la persistencia de una enfermedad que afectaba a los bovinos, estableció una comisión dirigida por el Dr. Víctor Babes para investigar y determinar la causa y buscar una solución al problema; concluyendo que la causa de la enfermedad denominada Hemoglobinuria enzootica era ocasionada por un microorganismo intraeritrocítico el cual nombró *Haematococcus bovis* (Babes, 1888).

Smith en 1889, observó el agente etiológico de la fiebre de Texas; posteriormente Smith y Kilborne propusieron el nombre de *Pyroplasma bigeminum*, estableciendo por primera vez que este protozoario puede ser transmitido por un huésped intermediario (Smith y 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 del género *Boophilus spp* que afecta a mamíferos domésticos y silvestres causando fiebre, anemia, hemoglobinuria, ictericia y frecuentemente muerte (McCosker, 1981).

SINÓNIMOS

Piroplasmosis

Ranilla

Tristeza

Fiebre de Texas (Quiroz, 1994)

ETIOLOGÍA

Las especies de *Babesia* en el ganado bovino son seis (Cuadro 1) de las cuales *B. bovis* se le considera la más patógena; pueden presentarse en forma redondeada o anillada alargada y en forma de pera (piriforme), la forma redondeada mide de 1-2.5 micras y la piriforme de 2-2.5 micras (Purnell, 1981).

Babesia spp pueden causar un amplio rango de manifestaciones clínicas debido a las diferencias en su virulencia y patogenicidad de las cepas dentro de cada especie. Las infecciones de *B. bovis* siempre causan un síndrome agudo, aunque esta severidad puede variar (Wright, 1981).

Cuadro 1. Especies de *Babesia* en bovinos

Especie	Sinónimo
<i>Babesia bovis</i> (Babes, 1888)	<i>B. argentina, B. berbera, B. colcicha</i>
<i>Babesia bigemina</i> (Smith y Kilborne, 1893)	<i>Pyrosoma bigeminum, Aplososma bigeminum</i>
<i>Babesia divergens</i> (M'Fadyean y Stockman, 1991)	<i>B. caucásica, B occidentalis, B. Kolerica</i>
<i>Babesia jakimovi</i>	
<i>Babesia ovata</i>	
<i>Babesia major</i> (Sergent, 1926)	

(Purnell, 1981)

TAXONOMÍA

Reino: Animalia

Subreino: Protozoa

Phylum III: Apicomplexa

Clase 2: Sporozoa

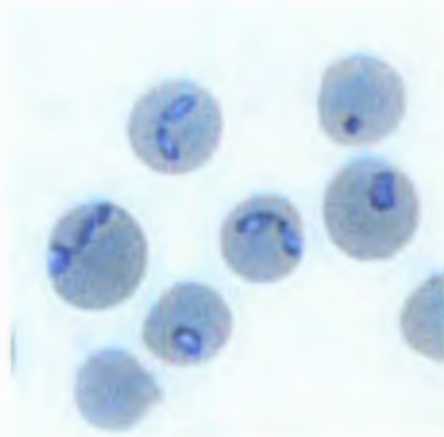
Subclase 3: Piroplasmia

Orden: Piroplasmida

Género: *Babesia*

Especie: *bovis*

(Levine, et al., 1980; Levine, 1982)



Babesia bovis

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Su distribución mundial corresponde a la distribución de las garrapatas del género *Boophilus spp* (Quiroz, 1988). Se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales y semitropicales del mundo entre el paralelo 32 latitud sur y el paralelo 40 latitud norte del Ecuador; la babesiosis produce un importante impacto económico dentro de la ganadería y en especial de países no desarrollados. Por lo que esta enfermedad presenta un obstáculo para la introducción de ganado especializado y establecimiento de un mayor número de ganaderías en estas regiones (Ristic, 1984).

La mayoría de la población mundial bovina (1.2×10^9) está potencialmente expuesta a una o más especies de *Babesia spp* y al menos 1.3 billones de animales domésticos están en riesgo de ser infectados (Solorio y Rodríguez, 1997).

EPIDEMIOLOGÍA

La transmisión de la babesiosis esta dada por la tríada, vector, parásito y huésped; sin embargo; hay una serie de factores que pueden modificar la transmisión y presencia de la enfermedad (Álvarez y Cantó, 1985)

1.- Infección del vector: la infección de la garrapata del genero *Boophilus spp* con la *Babesia* inicia desde que el ácaro ingiere sangre del hospedero infectado (Mahoney y Mirre, 1979; Alonso, *et al*, 1990; Solorio y Rodríguez, 1997).



Garrapata pletórica

La transmisión de *B. bovis* por garrapata de un solo huésped (*Boophilus spp*) es únicamente a través de la fase larval (Mahoney, 1977); las larvas pierden la infección después de haber ocurrido la transmisión impidiéndose de esta forma la

transmisión vertical (Callow, 1985). Por lo tanto la transmisión de *B. bovis* de una generación de garrapatas a otra solo es posible si la garrapata hembra adulta se alimenta de un huésped infectado (Mahoney, 1977).

2.- Edad de las garrapatas: las larvas de *B. microplus* que son 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 estas en condiciones hasta 200 días (Álvarez y Cantó, 1985).

3.- Factores físicos:

✓ Temperatura; la ovoposición a temperaturas de 30°C a 37°C, inducen el desarrollo de estadios infectivos de *B. bovis* en los huevos de garrapatas *B. microplus*.

✓ Humedad relativa; es el factor más importante para el desarrollo de la garrapata y se considera un 80% como el nivel óptimo.

4.- Factores del huésped:

✓ Genéticos; se ha demostrado que el ganado *Bos indicus* es más resistente a la babesiosis que el ganado europeo *Bos taurus* (Johnston *et al*, 1978).

✓ Edad; debido a la ingestión de anticuerpos calostrales los becerros son más resistentes a la enfermedad por lo tanto los becerros menores de dos meses quedan protegidos de la enfermedad clínica mas no de la infección; los animales que nacen de hembras susceptibles son más resistentes a la enfermedad hasta los ocho meses de edad (Trueman y Blight, 1978; Álvarez y Cantó, 1985). Se ha informado de una mayor proporción de brotes en animales de 10 a 24 meses de edad que los menores de nueve meses (Rogers, 1971).

✓ Inmunidad; se adquiere de forma activa por la exposición del huésped al parásito vivo o inactivado, e incluso por productos de los mismos. La respuesta inmune del hospedero controla la parasitemia destruyendo los parásitos y eritrocitos, deteniendo tanto el crecimiento como la multiplicación de *Babesia* (Mahoney y Goodger, 1972; Callow, 1985). Los animales que sobreviven a la fase aguda de la infección quedan inmunes a la reinfección (Callow, 1985).

Los bovinos que se recuperan de la enfermedad quedan como portadores sanos por un periodo variable de tiempo y sirven como focos de infección para los animales sanos (Álvarez y Cantó, 1985); además la enfermedad se asocia con la fluctuaciones estacionales en el número de garrapatas (Rogers, 1971), el cual aumenta después del final de la temporada de lluvias (Álvarez y Cantó, 1985).

En general la presentación de brotes de la babesiosis es por dos condiciones:

1.- Exposición del ganado susceptible a la enfermedad; esta ocurre al introducir o cambiar ganado infestado a zonas libres, lo que ocasiona que las garrapatas se distribuyan en lugares en que normalmente no se encuentran o en caso contrario, se introducen animales susceptibles explotaciones infestadas (Álvarez y Cantó, 1985).

2.- Inestabilidad enzoótica; se refiere a la presencia de una proporción de animales de un hato que no se infectan con *Babesia* sino hasta un tiempo después del nacimiento; siempre y cuando exista una exposición a garrapatas (Rogers, 1971).

Las regiones en donde se observa la babesiosis se clasifican como: zonas endémicas y marginales. En las zonas endémicas existe una población de garrapatas, mas o menos estable, suficiente para asegurar la exposición de los becerros a *Babesia spp* en los primeros nueve meses de vida, lo que provoca un estado de premunición por la presencia de parásitos. Las zonas marginales, presentan variaciones poblacionales durante el año lo que conduce a que muchos animales no se infecten en la primera etapa de vida, infectándose posteriormente y presentando una enfermedad severa (Mahoney y Ross, 1972)

CICLO BIOLÓGICO

Para su estudio se divide en cuatro etapas:

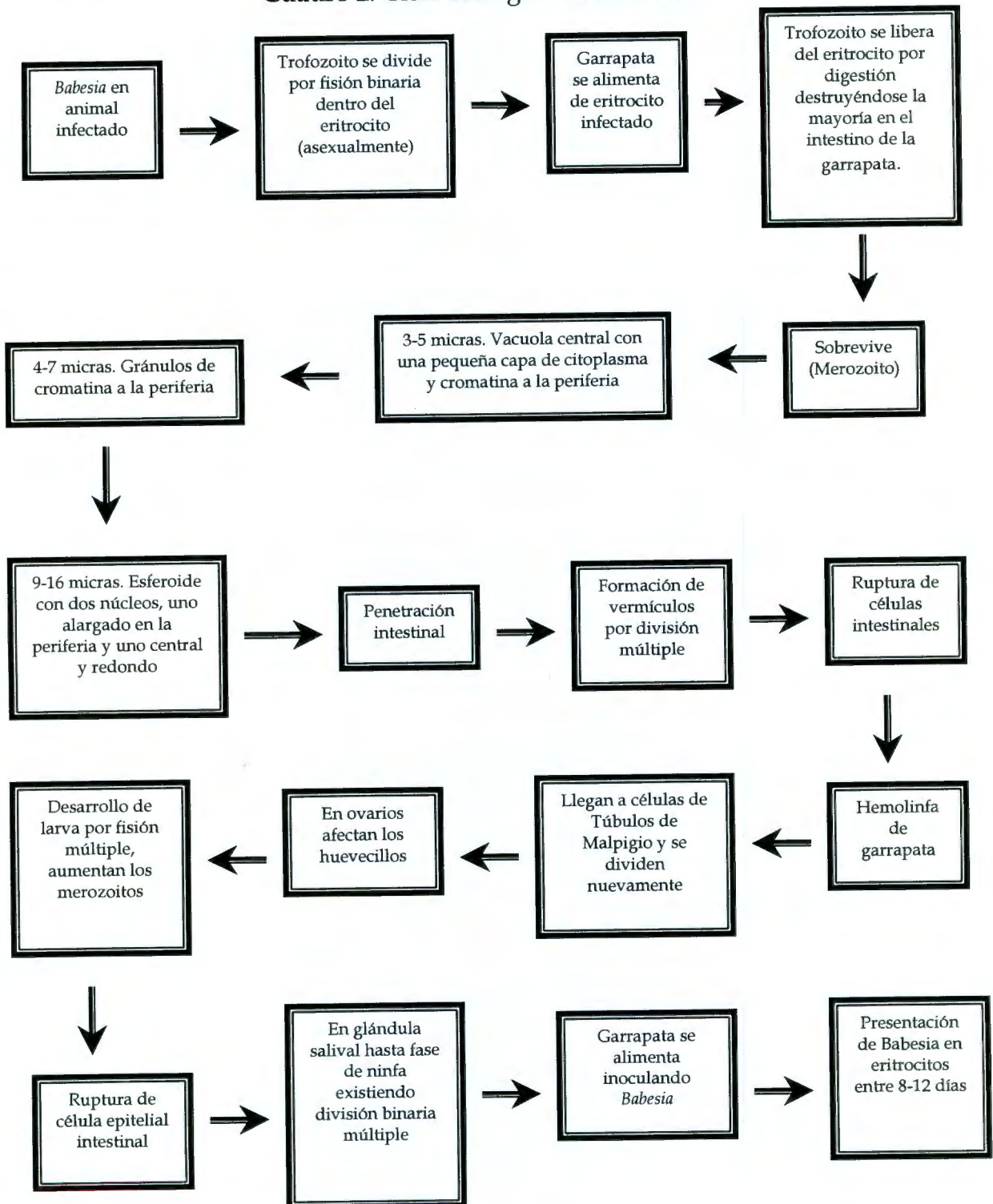
1) Fisión binaria en los eritrocitos: la forma infecciosa de *Babesia spp* es inoculada al huésped por la garrapata al momento de alimentarse, penetrando al glóbulo rojo en forma de merozoito por un proceso activo (Jack y Ward, 1981). Posteriormente se forma una vacuola parasitófora la que se diferencia para

formar el estado de alimentación (trofozoito), el cual se divide por fisión binaria longitudinal formando merozoitos (formas de pera) que abandonan la célula para invadir otra. Esta división asexual continua hasta que el huésped muere, se elimina el parásito o es ingerido por otra garrapata (Quiroz, 1994). (Cuadro 2)

- 2) Fisión múltiple en el epitelio intestinal o túbulos de Malpigio. La garrapata adquiere la infección cuando ingiere sangre infectada en las ultimas horas antes de desprenderse. Los eritrocitos son destruidos y los parásitos se liberan en el lumen intestinal del artrópodo, donde mueren una gran proporción y solo un porcentaje de las formas sanguíneas sobrevive a la digestión; estas forman un cuerpo de fisión que liberan formas conocidas como quinetos o vermículos en el lumen intestinal. Los quinetos atraviesan el intestino, migrando hacia la hemolinfa de la garrapata y llegan a las células de los túbulos de Malpigio donde se redondean (Smith, 1978).
- 3) Fisión múltiple en ovarios e invasión de huevos. Los quinetos van a los ovarios donde se dividen e invaden los huevos antes de que sean cubiertos por quitina y permanecen en el vitelo (Smith, 1978).
- 4) Fisión múltiple en intestino y glándulas salivales de las larvas: después de la ovoposición y durante el desarrollo del embrión dentro del huevo los quinetos invaden las células del intestino donde se forma otro cuerpo de fisión y liberación de otra generación de quinetos (Smith, 1978).

Por medio de la hemolinfa los vermículos alcanzan las células de las glándulas salivales en donde ocurre otra división múltiple con la liberación de miles de cuerpos anulares que se transforman en peras las cuales son formas infectantes de *Babesia* que inoculan las larvas (Friedhoff y Smith, 1981).

Cuadro 2. Ciclo Biológico de la *Babesia*



(Quiroz, 1994)

SIGNOS

La infección producida por *Babesia bovis* presenta un síndrome que va desde un curso benigno con recuperación espontánea hasta progresar a una segunda fase y producir una condición debilitante que finaliza con la muerte del animal (Kuttler, 1988; Larios, 1989).

Como constantes de la enfermedad se puede presentar hemólisis, edema y anemia, aunque no es tan severo en el caso de *B. bovis*; también hay falta de oxigenación en los tejidos y órganos (Cordero y Rojo, 1999).

Las manifestaciones clínicas se observan después de un periodo de incubación de 8 a 14 días (Kuttler, 1986). Hay un aumento de temperatura hasta de 42°C que permanece durante 2 a 7 días o más (Soulsby, 1982), acompañada por mucosas pálidas llegando a presentarse ictericas conforme avanza la infección, así como anemia hemolítica, depresión, anorexia, atonía ruminal, postración, lagrimeo, aumento de la salivación, aumento de la frecuencia cardiaca y respiratoria, agalactia, en animales gestantes puede causar aborto y en casos severos produce la muerte (Osorno, 1978; Alonso, *et al.*, 1990; Quiroz, 1994).

Las alteraciones hemáticas de anemia no son directamente responsables de la muerte de los animales sino que se debe a un desbalance de los órganos y sistemas importantes, habiendo nefropatía, cardiopatía, hepatopatía y coagulopatía (Larios, *et al.*, 1984).

Se ha sugerido que la anemia no solo es el resultado de la ruptura de los eritrocitos por salida del parásito, también los glóbulos no infectados pueden ser eliminados o fagocitados probablemente debido a la adsorción de antígenos de *Babesia* en su membrana, los cuales son reconocidos como cuerpos extraños.

PATOGENIA

Existen tres mecanismos de acción patógena:

- ✓ Acción mecánica; ruptura de eritrocitos.
- ✓ Acción tóxica; elaboración y excreción de productos tóxicos.
- ✓ Acción de competencia con el hospedador (hemoglobina).

Babesia spp se nutre por pinocitosis dentro del eritrocito, a partir de la hemoglobina, la cual es hidrolizada además de metabolizar la glucosa en ácido láctico, manosa y proteína (Cordero y Rojo, 1999)

En la infección de *B. bovis* lo que ocurre generalmente es una alta liberación de sustancias farmacológicamente activas que provocan vasodilatación, éstasis sanguínea y choque anafiláctico, además de una coagulación intravascular diseminada (CID) y trombosis pulmonar mortal (Callow, 1984).

B. bovis produce una enzima que activa la presencia de calicreína en células de varios órganos, especialmente en el estroma de las células rojas. Las cininas producidas tienen efectos vasodilatadores e hipotensivos que incrementan la permeabilidad vascular (Cuadro 3).

Estos fenómenos ocurren temporalmente y preceden a la aparición de la parasitemia. La actividad de las cininas simultáneamente con otros productos porfirínicos degradados induce las lesiones al corazón y riñones (Wright, 1973).

Los antígenos de *Babesia* forman complejos con el fibrinógeno e inducen aglutinación y adherencia a las células rojas sanguíneas parasitadas a la pared vascular incrementando así la acumulación de eritrocitos (Cuadro 3), (Cordero y Rojo, 1999).

El flujo sanguíneo es obstruido y existe distensión capilar principalmente en los riñones y corteza cerebral. La coagulación diseminada se complica con trombosis pulmonar con formación de trombos en riñones e hígado (Morel, 1989).

El factor primario en los casos fatales se ha relacionado con la magnitud del cuadro anémico y la consecuente anoxia; sin embargo, estudios posteriores señalan ciertas enzimas proteolíticas (esterasas y proteasas) de origen parasitario como responsables de los signos clínicos y las alteraciones tisulares, además que *B. bovis* involucra también al Sistema Nervioso Central (Larios, *et al.*, 1984).

Cuadro 3. Resumen de la acción patógena de *Babesia bovis*

Fenómeno	Acción		
Liberación de esterases y proteasas	Aumenta la concentración de fibrinógeno	Trombos	CID
Destrucción de eritrocitos	Aumenta forma inmatura de eritrocitos	Anemia	Anoxia
Fenómenos de autoinmunidad	Formación de complejos inmunes	Trombos y fagocitosis de eritrocitos	Anemia y falta de oxigenación en órganos y tejidos
Activación de Caliceína	Aumento de permeabilidad vascular	Vasodilatación, éstasis circulatoria, fenómenos de choque	Pérdida de PDF (Productos de degradación del fibrinógeno) Microtrombos = CID = Edema = Anoxia

(Cordero y Rojo, 1999).

LESIONES MACROSCÓPICAS

Los tejidos se encuentran congestionados, pero si la enfermedad se prolonga estos se observan pálidos. La ictericia puede estar presente pero no es tan obvia si la congestión es intensa (Callow, 1984; Morel, 1989). Hay presencia de hemorragias subserosas, principalmente en corazón y los intestinos. La sangre usualmente fluye aun cuando los vasos están dañados (Callow 1984). La mucosa del abomaso presenta inflamación catarral con pequeñas hemorragias y erosiones en la región pilórica (Quiroz, 1994). La vejiga contiene orina color vino y en su mucosa se observan pétéquias al igual que en la mucosa vaginal (Ristic, 1981; Callow, 1984; Quiroz, 1988). Los riñones presentan varios grados de congestionamiento y la grasa perirenal esta edematosa e icterica; el bazo en casos crónicos esta aumentado de tamaño y en casos agudos se encuentra congestionado y la pulpa ablandada (Ristic, 1981). El hígado aparece congestionado y friable con el parénquima icterico y la vesícula biliar agrandada, la bilis esta espesa y con coágulos dando al hígado una coloración moteada (Ristic, 1981; Callow, 1984). El corazón y los pulmones usualmente están normales, excepto por la variable presencia de hemorragias y edema; los pulmones afectados por lo tanto contienen una copiosa cantidad de

exudado sanguinolento (Callow, 1984). La superficie de la materia gris del encéfalo esta un poco rosada; esto puede traer la presentación de signos nerviosos cuando el encéfalo contienen fluido en exceso y esta mas blando de lo normal (Morel, 1989). Se ha reportado marasmo (emaciación y debilidad progresiva) en la musculatura intercostal de los miembros posteriores, además de que observaron que la medula ósea se encuentra rojiza (Wright, *et al.*, 1981)

LESIONES MICROSCÓPICAS

Los principales cambios se observan en el hígado, con necrosis centrilobular en zona media, y distensión de los canalículos biliares (Callow, 1984), infiltración grasa y presencia de neutrófilos en zonas necrosadas (Quiroz, 1988). En otros tejidos linfáticos (bazo, linfonodos) hay menos linfocitos de lo normal, simultáneamente hay abundancia de macrófagos, muchos de los cuales contienen hemosiderina (Callow, 1984); en el bazo hay una reducción del radio de la pulpa roja y blanca (Quiroz, 1988). En casos severos los riñones están afectados con degeneración tubular y depósitos de hemosiderina a lo largo de todas las nefronas. Quizá se encuentre derramado y presente material hialino y de incorporación granular de la hemoglobina. Los vasos más pequeños se encuentran llenos con eritrocitos parasitados; en el encéfalo los eritrocitos infectados taponan los capilares, ocasionando algunas veces edema intersticial (Callow, 1963).

En el pulmón los capilares están congestionados y contienen una gran cantidad de linfocitos, neutrófilos y macrófagos. El corazón presenta subendocarditis, subpericarditis y hemorragias miocárdicas, los grandes vasos presentan baja parasitemia, mientras que en los capilares periféricos sucede lo contrario (Quiroz, 1994). Cuando el edema pulmonar ocurre, el depósito de fibrina y la trombosis son encontrados en este y en otros tejidos (Morel, 1989). Se ha encontrado extensa degeneración del músculo esquelético de los miembros posteriores, con edema perivascular en casos agudos (Wright, *et al.*, 1981).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la babesiosis se puede realizar fácilmente si los signos son muy marcados y el vector está presente. Se debe tomar en cuenta también la raza y ver si el animal es nuevo en la zona de prevalencia de la enfermedad (Callow, 1984).

El diagnóstico en laboratorio puede realizarse de manera directa o indirecta y puede ser del tipo de diagnóstico clínico patológico individualizado o de tipo epidemiológico considerando grupo o grupos de animales.

La serología es útil par analizar la epidemiología de la babesiosis bovina; estos estudios seroepidemiológicos nos ayudan a conocer la distribución geográfica e la enfermedad (Álvarez y Cantó, 1991).

Métodos directos

- a) Frotis sanguíneos; teñidos con colorante de Giemsa, es el más frecuente, es suficiente sensible en casos de parasitosis bajas; sin embargo en bovinos portadores de *Babesia spp* no siempre detectan la infección (Ristic, 1981; García 1991). La sangre se puede obtener de las venas auriculares o caudales. Para apoyar 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 anemia (Callow, 1984).
- b) Improntas cerebrales (Buening, 1991); de gran utilidad en el caso de *B. bovis* ya que existe un marcada concentración de eritrocitos infectados en los capilares de cerebro y cerebelo (Kuttler, 1986).
- c) Inoculación de animales susceptibles (FAO, 1993).
- d) Cultivo celular (Erp *et al*, 1980).
- e) Sondas de ADN (Aboytes, *et al.*, 1991).
- f) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR); mediante la cual es posible detectar el ADN del parásito, la cual es de mucha utilidad para determinar animales portadores (Figueroa, *et al*, 1992).

Métodos indirectos

- a) Fijación de Complemento (Buening, 1991).
- b) Inmunofluorescencia indirecta (Domínguez *et al.*, 1992). Prueba de elección para la detección de anticuerpos específicos (Kuttler, 1986).
- c) Radioinmunoensayo (Kalhl, *et al.*, 1982)
- d) Inmunoabsorción enzimática (ELISA) (Domínguez, *et al.*, 1995).

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

Existen otras enfermedades de los bovinos que se caracterizan por la anemia hemolítica aguda con hemoglobinuria o sin ella, las cuales podrían confundirse con babesiosis (Cuadro 4).

Cuadro 4. Anemias hemolíticas en bovinos

ENFERMEDAD	EPIDEMIOLOGÍA	SIGNOS CLÍNICOS
Babesiosis (<i>B. bovis</i>)	Ganado joven y adulto afectado	Mucosas pálidas o ictéricas, fiebre
Babesiosis (<i>B. bigemina</i>)	Ganado joven y adulto afectado	Mucosas pálidas o ictéricas, fiebre, hemoglobinuria y anemia marcada.
Anaplasmosis	Ganado adulto afectado	Mucosa pálidas o ictéricas, fiebre en fase crítica.
Leptospirosis	Todas las edades afectadas, en becerros alta mortalidad, en adultos baja	Fiebre aguda y abortos, hemoglobinuria, muerte entre 24 y 48 horas.
Hemoglobinuria posterior al parto	Vacas lecheras en alto rendimiento, 4-6 semanas después del parto	Sin fiebre, hemoglobinuria intensa, muerte entre 12-48 horas.
Intoxicación crónica por cobre	Posterior a medicamentos y alimentos con cobre como la gallinaza, pollinaza, cerdaza por periodos prolongados	Ictericia intensa, no hay fiebre, hemoglobinuria
Intoxicación por col y nabo	Todas las edades	No hay fiebre, muerte en pocas horas, hemoglobinuria

(García, *et al.*, 1999)

PREVENCIÓN Y CONTROL

Existen diferentes métodos para evitar el desarrollo y transmisión del parásito en la garrapata, los cuales intervienen en tres niveles de acción:

- 1.- Mecanismos que afectan la alimentación y biología del vector con un efecto secundario de reducción en la población del hemoparásito.
- 2.- Mecanismos que afectan directamente al hemoparásito con un efecto secundario de reducción en la infección y desarrollo en la garrapata, así como en la transmisión a partir del vector.
- 3.- Combinación de estos dos mecanismos (Kalhl, *et al.*, 1982).

Al vector se le ha tratado de controlar utilizando acaricidas con los cuales se busca romper el ciclo de transmisión de la enfermedad; control biológico (plantas devoradoras o repelentes, nematodos o insectos entomo-patogénicos), modificadores del hábitat y el desarrollo de huéspedes resistentes a la garrapata, los cuales son los métodos mas comunes (FAO, 1984).

El acaricida se usa frecuentemente en baños garrapaticidas (de inmersión o aspersión) pero su uso muy seguido no es muy recomendable ya que, en caso de ser mal utilizado, interrumpe el balance infección-transmisión creando inestabilidad enzoótica que puede causar severos brotes de la enfermedad (Pérez, 1992).

Otra forma de utilizar acaricidas es por medio de la aplicación "spot" o "pour-on", que son bolos de liberación lenta del acaricida y de aretes impregnados del principio activo (Kocan, 1995).

El principal inconveniente del uso continuo de acaricidas es el desarrollo de resistencia; las garrapatas de un solo huésped desarrollan resistencia mas rápidamente que otros tipos de vectores, esto es por tener un ciclo entre generaciones mas corto y a la exposición continua a los pesticidas (Norval, *et al.*, 1991).

También es importante el control de la movilización del ganado ya que con esto se puede evitar que entre ganado infectado en zonas libres (Pérez, 1992). Otra

estrategia es el uso de ganado resistente; debido a que el ganado *Bos indicus* tiene habilidad para desarrollar inmunidad a la infestación con garrapatas, esto a conducido a la utilización de cruzas *Bos indicus* con *Bos taurus* (Álvarez, 1991).

Existen vacunas dirigidas contra el vector o los hemoparásitos, parecen ser una alternativa a considerar en los programas de control. Las inmunoglobulinas desarrolladas por el huésped pueden pasar al vector y cruzar las células epiteliales del intestino del invertebrado y alcanzar la hemolinfa sin sufrir desnaturalización.

Al inmunizar el ganado contra las garrapatas y/o estadios del hemoparásito presentes en el vector, se espera que el bovino produzca anticuerpos dirigidos contra ellos.

Los bovinos expuestos a infestaciones repetidas de garrapata desarrollan un tipo de resistencia que afecta al vector. Los efectos están representados por una disminución en la engurgitación, retardo en el comienzo de la ovoposición y reducción en la concentración de huevecillos (McGowan, *et al.*, 1980).

Las vacunas elaboradas a partir del tejido intestinal y ganglionar de *B. microplus*, estimulan una buena protección contra fases larvarias en procesos de infestación severa (Willadsen y Kemp, 1988; Willadsen y McKenna, 1991).

El adelanto en vacunas contra diferentes estadios de la *Babesia* spp. durante su desarrollo en la garrapata, presenta algunas limitaciones. Entre ésta se cuentan la caracterización de gametos y esporozoitos, la complejidad del ciclo de vida de la *Babesia* y la dificultad para producir garrapatas con infecciones severas (Opdebeeck, *et al.*, 1990; Lee, *et al.*, 1991).

El método que se utiliza para la prevención de la babesiosis bovina es la premunización o inmunidad infecciosa que consiste en provocar la infección transfiriendo sangre de un bovino recuperado o portador a bovinos susceptibles provocando reacciones menos severas (Callow y Tammemagi, 1967) y controlando las manifestaciones clínicas mediante un tratamiento específico, de tal manera que permita el estímulo antigénico suficiente y a la vez evite la muerte del animal (Figueroa, *et al.*, 1992).

Existen dos principios que han sido aplicados para este procedimiento: primero, el ganado usualmente adquiere una fuerte y larga inmunidad después de recuperarse de la infección; y segundo, la sangre tomada del ganado infectado puede ser usada para inmunizar a otros animales (Dalglish, *et al.*, 1990). A estos principios se les conoce como premunización o inmunidad infecciosa, que consiste en la transferencia de sangre de un bovino recuperado o portador a bovinos susceptibles provocando reacciones menos severas en los receptores que en los animales asintomáticos.

En 1966 Callow y Mellors afinaron este proceso y estandarizaron el número de parásitos de *B. bovis* en cada dosis 1×10^7 eritrocitos infectados (EI) utilizando pases seriados para disminuir la virulencia en becerros esplenectomizados. Con este método se puede producir una mayor cantidad de vacunas en un mínimo volumen de sangre, pero su vida media es muy corta (siete días) en refrigeración y es posible la estimulación de eritrolisis neonatal en terneros de vacas vacunadas y una posible contaminación con otros patógenos no detectables en frotis como el virus de Leucosis bovina (Rogers, *et al.*, 1988).

El siguiente paso fue el de desarrollar una metodología para atenuar *B. bovis*, mediante pases rápidos seriados de las cepas vacunales en terneros esplenectomizados para inducir una notable disminución de virulencia en animales adultos susceptibles (Callow y Mellors, 1966; Callow, *et al.*, 1979). Otra forma de modificar o inactivar parásitos es someterlos a radiaciones ionizantes con Cobalto⁶⁰, haciéndolos no patógenos pero manteniendo su inmunogenicidad (Álvarez, 1991). Mahoney *et al.* (1973), trabajaron con *B. bovis* irradiada entre 20-50 kilorads (Kr), observando que conservaba su inmunogenicidad. Posteriormente se realizaron experimentos con irradiación y conservación de *B. bovis* concluyendo que la mejor dosis es 35 Kr (Wright, *et al.*, 1980), comprobándolo mediante la inoculación de becerros no esplenectomizados con dosis de 1×10^8 parásitos recientemente irradiados. Al conservar el inmunógeno irradiado en nitrógeno líquido durante diez meses para su posterior inoculación en becerros, verificaron

que la mayoría de los animales sufrieron infección moderada. También se comprobó que bovinos vacunados de esta forma son capaces de resistir un desafío de diez a doce meses pos vacunación (Wright, *et al.*, 1982), pero estos parásitos pierden la capacidad de ser transmitidos por la garrapatas (Wright, *et al.* 1983).

En México *B. bovis* fué cultivada *in vitro* por primera vez en el año de 1980, en Palo Alto, DF (Erp, *et al.*, 1980). Posteriormente Rodríguez, *et al.* (1983), lograron su clonación a partir del cultivo de un solo eritrocito infectado, aislándolo por medio de diluciones críticas. Dicha poblaciones, fueron diluídas por segunda y tercera vez para asegurar su pureza. Una de estas clonas con crecimiento más acelerado que el de la cepa original, fue usada como vacuna y comparada con la población original en animales susceptibles (Rodríguez, 1985). La clona produjo reacciones clínicas menos severas que las de la cepa original (Rodríguez, *et al.*, 1993).

A partir de estas ultimas investigaciones el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) inició estudios con la cepa BOR para conocer su inocuidad y capacidad inmunoprotectora contra el desafío controlado y de campo de aislados patógenos.

En un primer estudio se demostró que los animales inoculados por vía intramuscular tenían las menores alteraciones en el Volumen Celular Aglomerado (VCA) y Temperatura Rectal (TR) (Salas *et al.*, 1988). Con estos resultados en otro estudio se determinó que la dosis que produjera los menores cambios al desafío fué la de 1×10^7 eritrocitos infectados (EI), pero eran capaces de resistir un desafío de 1×10^8 EI de una cepa de campo (Cantó *et al.*, 1996). En estos estudios la vacunación se realizó con eritrocitos infectados provenientes directamente de cultivo *in vitro*, por lo que se pensó que este material podría ser congelado en nitrógeno líquido para facilitar su transporte y difusión, determinándose que la dosis óptima del inmunógeno mixto congelado capaz de resistir una confrontación de campo es de 1×10^8 (Olvera, 1998). Lo siguiente que se determinó fue que los

inmunógenos se podían utilizar como vacuna mixta presentando resultados similares a los observados como inmunógenos únicos (Cantó *et al.*, 1999).

Posteriormente se realizó un estudio en una zona endémica (Cantó *et al.*, 2003¹). Los resultados mostraron que los animales inmunizados no requirieron tratamiento confiriendo una protección del 100% contra el desafío de campo a través de *Boophilus* spp. En una segunda fase de este estudio se obtuvo una protección del 70% en la vacunación de animales provenientes de zonas libres en zonas tropicales (Cantó *et al.*, 2003²).

En un primer estudio realizado en hembras gestantes, se evaluó la capacidad inmunoprotectora de un inmunógeno mixto congelado. Se inocularon a diferentes dosis vacas que se encontraban en el segundo tercio de la gestación, siendo desafiadas en el último mes de preñez. Durante el proceso de inmunización no se observaron variaciones significativas entre las hembras vacunadas y las testigo sin vacunación. Sin embargo, al realizarse la confrontación se observó que todos los grupos de animales se enfermaron, muriendo algunos por babesiosis aguda, y otras más murieron durante el trabajo de parto. Por lo que se determinó que la vacunación con *B. bovis* atenuada no produce alteraciones importantes en vacas en el segundo tercio de gestación; sin embargo, la confrontación de estos animales con cepas virulentas en el último mes de gestación, produce la muerte de los animales y/o aborto, a pesar de la vacunación (García *et al.*, 2004).

Debido a la continua introducción de vacas gestantes a las zonas endémicas de babesiosis y a los resultados observados por García *et al.* (2002) para el presente estudio se pensó que al realizar tanto la vacunación como la confrontación entre el primero y segundo tercio de la gestación, reduciría la probabilidad de la presentación de aborto o muerte de las hembras gestantes.

III. OBJETIVOS

- Determinar la inocuidad del inmunógeno en vacas gestantes al ser aplicado en el primer tercio de gestación
- Evaluar la capacidad inmunoprotectora de la cepa BOR contra el desafío controlado en vacas gestantes en el segundo tercio de gestación.

IV. HIPÓTESIS

El inmunógeno atenuado a partir de la cepa BOR de *Babesia bovis* es capaz de proteger al 100% de las hembras gestantes, vacunadas al final del primer tercio y al inicio del segundo tercio de gestación o vacías contra una confrontación controlada de una cepa patógena a dosis de 1×10^7 , 60 días posterior a la inmunización.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Localización: el presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del rancho González Blanco perteneciente a Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Querétaro, localizado en el municipio del Marqués a 27 km de la ciudad de Querétaro, con una precipitación anual de 500-600 mm y una temperatura promedio de 20°C.

Animales experimentales: se utilizaron 18 bovinos hembras, 12 gestantes y 6 sin gestar *Bos taurus* mayores de 15 meses de edad con un peso entre los 320-400kg nacidas en el Rancho GB.

A los animales se le tomaron las muestras necesarias para realizar el diagnóstico de brucelosis y se realizó la prueba intradérmica de tuberculina. Se comprobó la negatividad de todos los animales a *Babesia spp.* mediante de inmunofluorescencia indirecta antes de iniciar el estudio.

Los bovinos fueron vacunados a una dosis de 1×10^8 EI de la cepa BOR de *Babesia bovis* cuando presentaban una gestación de 3 meses 6 animales y 4 meses 6 animales, y al grupo testigo se le administró una dosis equivalente de eritrocitos normales. Todos los animales fueron inoculados por vía intramuscular.

Sincronización estral y gestación de los bovinos: se realizó la sincronización estral de los 18 animales con objeto de lograr la gestación de por lo menos 12 de ellos la cual se consiguió después de dos ciclos por lo que la diferencia en el periodo de gestación fue de aproximadamente de 28 días.

Microorganismos experimentales: Se utilizó una cepa de *Babesia bovis* derivada de un cultivo *in vitro*, clonada e irradiada en una fuente de Cobalto⁶⁰ (Rodríguez, 1985) y mantenida en Nitrógeno líquido hasta su uso.

Para realizar la confrontación se utilizó una cepa virulenta de *Babesia bovis* y una cepa virulenta de *B. bigemina*, ambas aisladas a partir de casos clínicos y que han demostrado ser altamente patógenas en estudios previos (Cantó *et al.*, 1996; Figueroa *et al.*, 1998). Antes de ser utilizadas en la confrontación se inocularon en dos bovinos esplenectomizados para permitir su reactivación y posteriormente llevar a cabo la confrontación en los animales experimentales.

Esquema de inmunización y confrontación:

Inmunización: Los animales se dividieron al azar en seis grupos de tres animales cada uno (Cuadro 5). El día 0, los tres bovinos de los grupos 1, 3 y 5 fueron vacunados con el protozario atenuado y los animales de los grupos 2, 4 y 6 recibieron glóbulos rojos normales.

Durante los 57 días posteriores los animales fueron monitoreados llevándolos a una manga de manejo en donde fueron tomadas temperatura rectal (TR) y muestras de sangre para posteriormente realizar un frotis sanguíneo y determinar el volúmen celular aglomerado (VCA) o hematocrito (Benjamin, 1991), (Apéndice 1).

Confrontación: 57 días después de la vacunación los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron confrontados con una cepa de campo de *B. bovis* a una dosis de 1×10^7 EI. Los animales del grupo 5 fueron desafiados con la cepa de *B. bovis* y una cepa de campo de *B. bigemina* ambas a una dosis de 1×10^7 EI. Los animales fueron monitoreados, se tomó TR y muestras de sangre para realizar frotis sanguíneos y VCA hasta la finalización del estudio.

Cuadro 5. Descripción de los grupos experimentales

GRUPO	NÚMERO DE ANIMALES	VACUNACIÓN	CONFRONTACIÓN
1) Hembras gestantes vacunadas	3	<i>B. bovis</i>	<i>B. bovis</i>
2) Hembras gestantes no vacunadas	3	Eritrocitos normales	<i>B. bovis</i>
3) Hembras no gestantes vacunadas	3	<i>B. bovis</i>	<i>B. bovis</i>
4) Hembras no gestantes no vacunadas	3	Eritrocitos normales	<i>B. bovis</i>
5) Hembras gestantes vacunadas, confrontación mixta	3	<i>B. bovis</i>	<i>B. bovis</i> / <i>B. bigemina</i>
6) Hembras gestantes, testigo	3	-	-

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Vacunación.

El incremento de temperatura observada el día 8 posterior a la vacunación en los animales de los grupos 1, 3 y 5 con el inmunógeno atenuado de *B. bovis* (Cuadro 6), probablemente se debió a la reproducción del parásito en el torrente sanguíneo; sin embargo, el hecho de que la fiebre no haya sido por arriba de los 40°C (Figura 1), es indicativo de que la clona administrada aún cuando conserva su infectividad, se comporta como atenuada. Estos resultados coinciden con lo descrito anteriormente al utilizar esta población de parásitos, donde se observó fiebre para el día 7 posvacunación (PV) (Cantó *et al.*, 1996).

Los valores de VCA durante esta etapa sólo se vieron afectados en los animales de los grupos inoculados con el inmunógeno atenuado, grupos 1,3 y 5, observándose descensos de 12.2%, 16.2% y 18.9% respectivamente (Figura 2). Estos resultados son inferiores a los descensos observados por Cantó *et al.* (1996) en los que utilizando la misma dosis encontraron un descenso de 23.8% en becerros Holstein y similar a lo observado por Larrauri (2003) donde se determinó un descenso de 18.5% también en becerros Holstein.

El que no se hayan presentado diferencias entre los animales gestantes y no gestantes, aunado a la ausencia de abortos, indican la inocuidad de la vacuna en animales gestantes entre los tres y cuatro meses de gestación.

Cuadro 6. Valores obtenidos de las diferentes variables registradas durante la vacunación (medias \pm desviaciones estándar) en los diferentes grupos de animales experimentales.

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	Gestantes vacuna <i>B. bovis</i>	Gestantes no vacunadas	No gestantes vacuna <i>B. bovis</i>	No gestantes no vacunadas	Gestantes vacuna <i>B. bovis</i> Confrontación mixta	Testigos
Animales por grupo	3	3	3	3	3	3
Temperatura máxima °C	39.6 \pm 1.06	39 \pm 0.32	39.8 \pm 0.92	39 \pm 0.5	39.7 \pm 0.81	39.1 \pm 0.3
Temperatura >39°C (días)	2	0	1	0	1	2
Máxima reducción del VCA (%)*	12.2	0	16.2	0	18.9	0
Valor mínimo promedio del VCA (%)	28.6 \pm 3.51	32.3 \pm 1.52	24.3 \pm 4.5	27.6 \pm 3.05	25.6 \pm 3.21	30 \pm 3.46
Valor mínimo individual del VCA (%)	25	31	20	27	22	28
Parasitemia en sangre (%)	<0.1	0	<0.1	0	<0.1	0

* Volumen celular aglomerado

Confrontación.

Durante esta etapa del estudio, se observó que todos los animales, con excepción del grupo testigo sin confrontar, sufrieron en diferente magnitud la confrontación con *B. bovis* o *B. bovis* y *B. bigemina* (Figura 3). En el cuadro 7 se presenta un resumen de lo sucedido con las diferentes variables estudiadas.

Con relación a los animales confrontados únicamente con *B. bovis*, se pudo apreciar que los bovinos gestantes no vacunados (Grupo 2) fueron los que presentaron el mayor descenso promedio del VCA al comparar el hematocrito observado durante esta fase, con el valor basal al inicio de la confrontación (27.4%),

seguido por los animales no gestantes no vacunados (Grupo 4) con un 21.6% de descenso en el VCA. Esta diferencia de 5.8%, aunque no significativa debido al número reducido de animales por grupo y a la variabilidad observada dentro del grupo, nos muestra que el estado fisiológico de gestación quizá pudo incrementar la susceptibilidad de los animales al protozoario (Cuadro 7, Figura 4).

Contrariamente y como se esperaba, los animales vacunados de los grupos 1 (hembras gestantes) y 3 (hembras no gestantes), fueron los que presentaron el menor descenso del VCA, 8.8% y 14.5% respectivamente, que al compararlos con los grupos no vacunados, indica claramente que los bovinos de los grupos vacunados presentaban una buena inmunidad (Cuadro 7, Figura 5).

En un estudio anterior realizado por García *et al.* (2004) se mostró que no obstante la vacunación, hembras que son confrontadas con el hemoparásito en el último mes de gestación, abortan o mueren al parto. El hecho de que en el presente estudio se observara un descenso de solo el 8.8% en las hembras gestantes vacunadas y que se haya presentado un mayor descenso en el VCA en los animales no gestantes vacunados (14.5%), podría indicar que la confrontación de hembras inmunizadas que se encuentran entre los cinco y seis meses de gestación, no es un factor que incremente la susceptibilidad de estos animales a sufrir aborto o ponga en peligro su vida

La Figura 6 nos muestra una comparación de los valores promedio del descenso del VCA entre las hembras gestantes vacunadas (grupo 1) y las hembras gestantes no vacunadas (grupo 2). Se puede apreciar que las diferencias comienzan a aparecer a partir del día 7 posconfrontación (PC) y se mantiene hasta la finalización del estudio. Se aprecian descensos máximos de 8.8% y 27.4% para las hembras vacunadas y no vacunadas respectivamente (Cuadro 7), lo que significa un porcentual superior al 200%. Asimismo, el día 21 PC una de las hembras no vacunadas abortó, probablemente debido a la sintomatología producida por el parásito en los días previos cuando en este animal se detectó temperatura superior

a los 40°C por tres días consecutivos entre los días 11 y 13 y un descenso del 33% del VCA entre los días 11 y 15 PC (Apéndice 2).

La importancia de la vacunación también se observó al comparar los animales no gestantes, vacunados (Grupo 3) o no vacunados (Grupo 4). Se pudo apreciar una mayor disminución promedio del VCA en las hembras no vacunadas (21.6%) al compararlas con los animales vacunados (14.5%), lo que demuestra la inmunidad que presentaban los animales vacunados (Figura 7). Aun más importante, fue el hecho de que uno de los animales no vacunados murió el día 10 PC, después de haber sufrido la enfermedad aguda con fiebre por arriba de los 40°C por tres días consecutivos entre los días 10 y 12 PC, presentando un hematocrito del 16% el día de su muerte; es decir, sufrió un descenso del 46.6% con respecto al VCA que tenía al inicio de la fase de confrontación (Apéndice 2).

Con el propósito de determinar la presencia o ausencia de inmunidad cruzada conferida por la inmunización con *B. bovis*, contra una confrontación mixta con *B. bigemina* y *B. bovis*, los animales del grupo 5; es decir, hembras gestantes vacunadas, fueron confrontados con ambas especies del parásito. Se observó que los animales confrontados con ambas especies de *Babesia* sufrieron un descenso mayor en el hematocrito, que aquellos confrontados únicamente con *B. bovis*, aunque este fue de solo el 3.3%, determinándose disminuciones de 12.1% para los confrontados con *B. bovis* y *B. bigemina*, contra el 8.8% observado en los bovinos desafiados solo con *B. bovis* (Figura 8). Trabajos realizados con anterioridad sugieren que la inmunidad cruzada con estas especies de protozoarios tiene variaciones. Se ha afirmado que la protección contra *B. bovis* esta íntimamente asociada a la estimulación específica de especie (Mahoney *et al.*, 1979), sin embargo, en un estudio realizado por Vega *et al.* (1999), se observó que la vacunación con *B. bovis*, es capaz de prevenir la muerte del 75% de los animales contra el desafío con ambas especies del parásito.

Callow y Mellors (1966) informan de la presencia de isoeritrolisis neonatal en vacas que fueron vacunadas con eritrocitos parasitados con *Babesia spp.* En el

presente trabajo se continuo la observación de las hembras gestantes al parto y de los becerros nacidos de ellas durante los primeros 15 días posparto no observándose en ninguno de los casos problemas de isoeritrolisis neonatal.

Los resultados del presente estudio indican la factibilidad de poder vacunar animales gestantes que vayan a ser introducidos a zonas endémicas de babesiosis con objeto de mejorar la calidad genética del hato.

Cuadro 7. Valores obtenidos de las diferentes variables registradas durante la confrontación (medias \pm desviaciones estándar) en los diferentes grupos de animales experimentales.

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
	Gestantes vacuna <i>B. bovis</i>	Gestantes no vacunadas	No gestantes vacuna <i>B. bovis</i>	No gestantes no vacunadas	Gestantes vacuna <i>B. bovis</i> Confrontación mixta	Testigos
Animales por grupo	3	3	3	3	3	3
Temperatura máxima °C	39.5 \pm 0.2	39.3 \pm 1.23	39 \pm 0.35	39 \pm 0.81	39.2 \pm 0.2	39.3 \pm 0.17
Temperatura >39°C. (Días)	1	1	0	0	2	1
Máxima reducción del VCA (%)*	8.8	27.4	14.5	21.6	12.1	7.3
Valor mínimo promedio del VCA (%)	27 \pm 2	22 \pm 2	25.3 \pm 3.21	22.6 \pm 5.85	24.6 \pm 3.78	29 \pm 1
Valor mínimo individual del VCA (%)	25	20	23	16	22	28
Aborto	0	1	0	0	0	0
Muerte	0	0	0	1	0	0
Parasitemia en sangre (%)	<0.1	<0.1	<1.0	<0.1	<0.1	0

*Volumen celular aglomerado

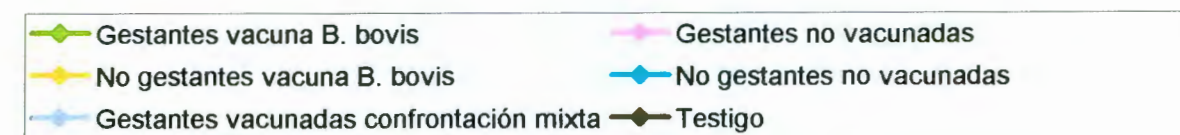
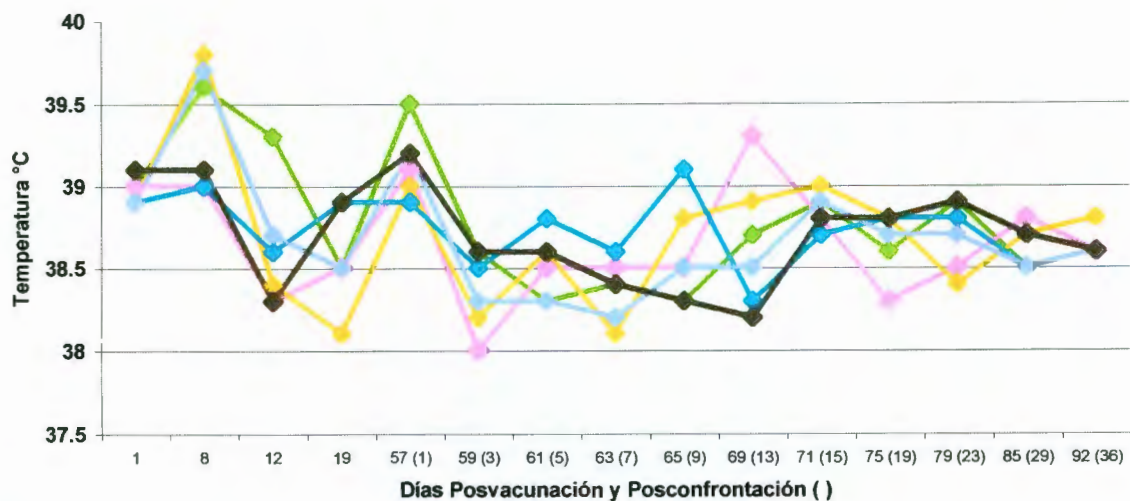


FIGURA 1. Comparación de los resultados promedio por grupo de temperatura rectal en los seis grupos experimentales durante las fases de vacunación y confrontación.

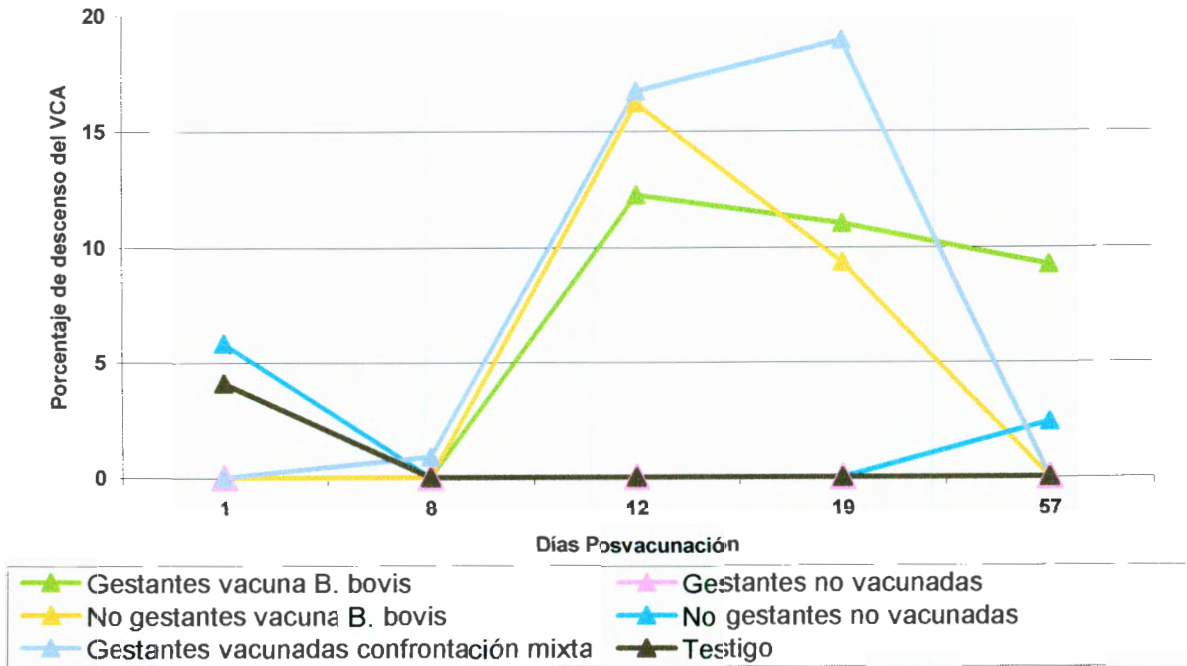


FIGURA 2. Comparación de los resultados promedio por grupo del descenso del Volumen Celular Aglomerado (VCA) en los seis grupos experimentales durante la fase de vacunación.

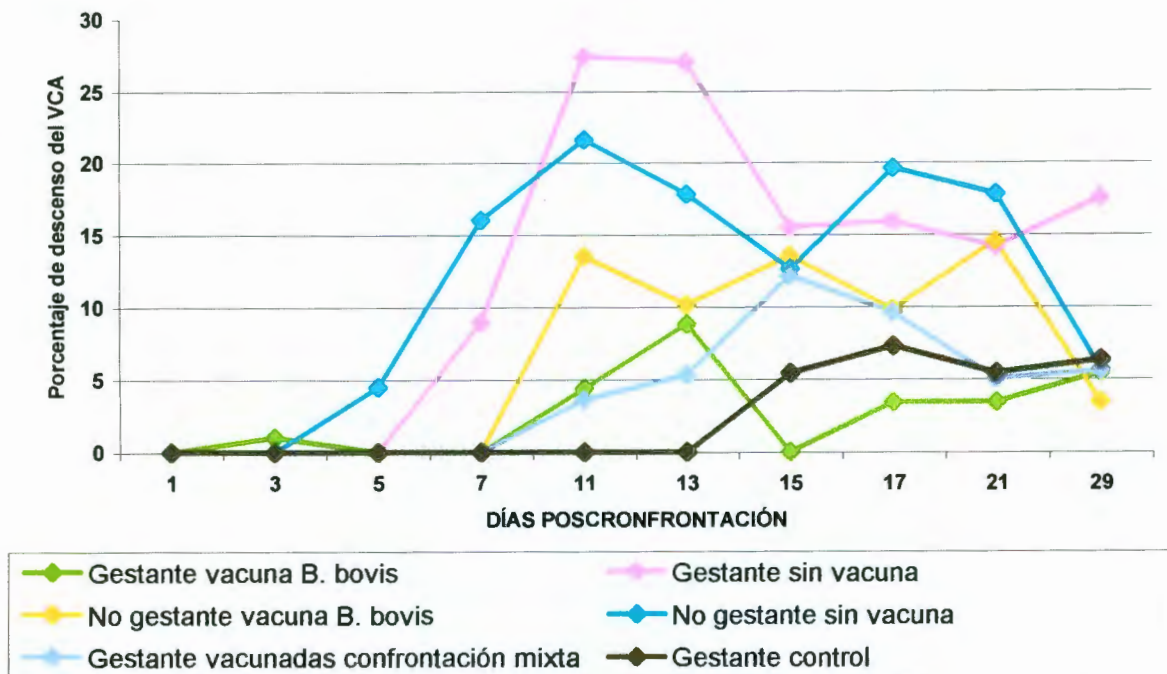


FIGURA 3. Comparación de los resultados promedio por grupo del descenso del Volumen Celular Aglomerado (VCA) en los seis grupos experimentales durante la fase de confrontación.

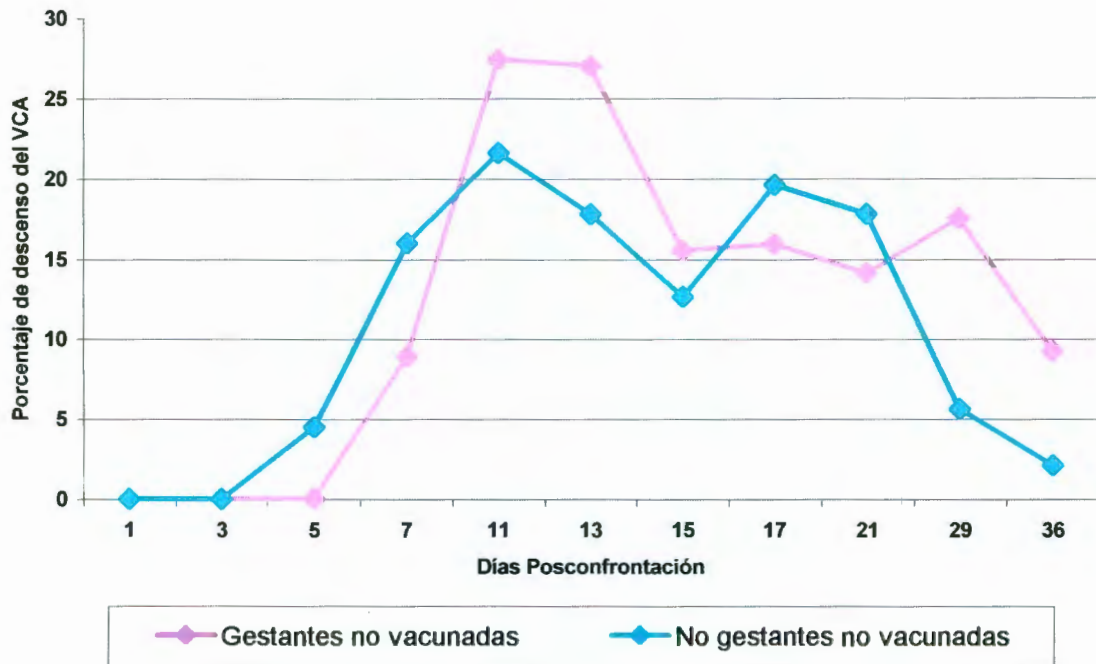


FIGURA 4. Comparación del porcentaje promedio por grupo del descenso del Volumen Celular Aglomerado (VCA) entre los animales Gestantes no vacunados (Grupo 2) y No gestantes no vacunados (Grupo 4). El día 21 PC un animal del grupo 2 abortó y fue eliminado del estudio. El día 10 PC un animal del grupo 4 murió de babesiosis aguda.

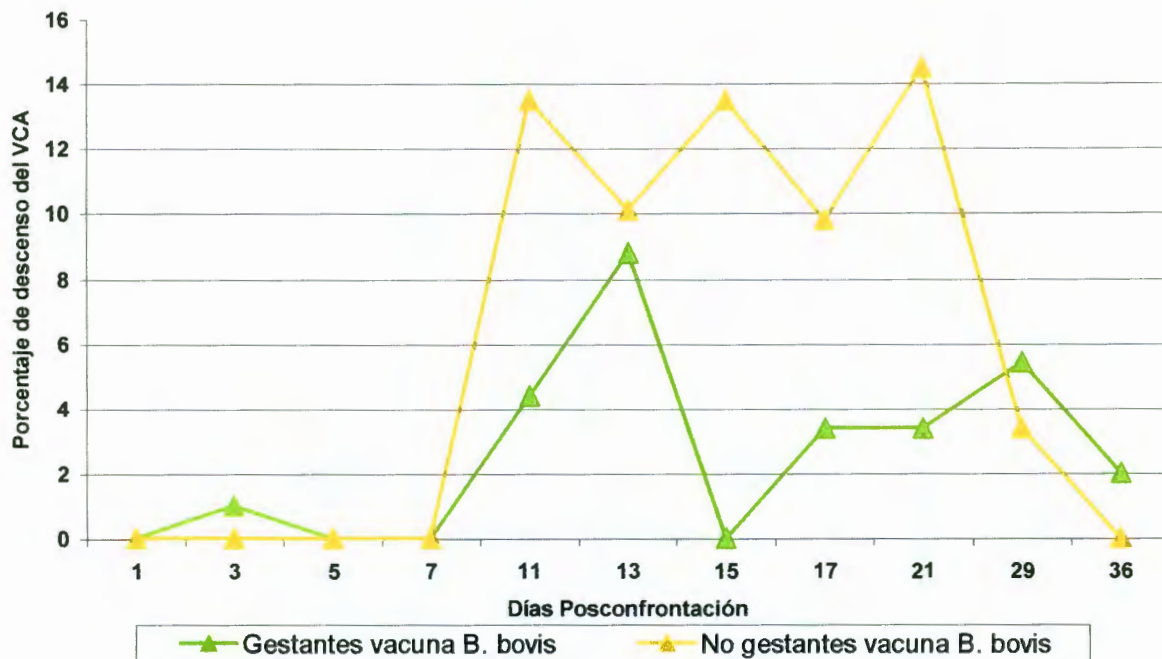


FIGURA 5. Comparación del porcentaje promedio por grupo del descenso del Volumen Celular Aglomerado entre los animales gestantes vacunados (Grupo 1) y no gestantes vacunados (Grupo 3).

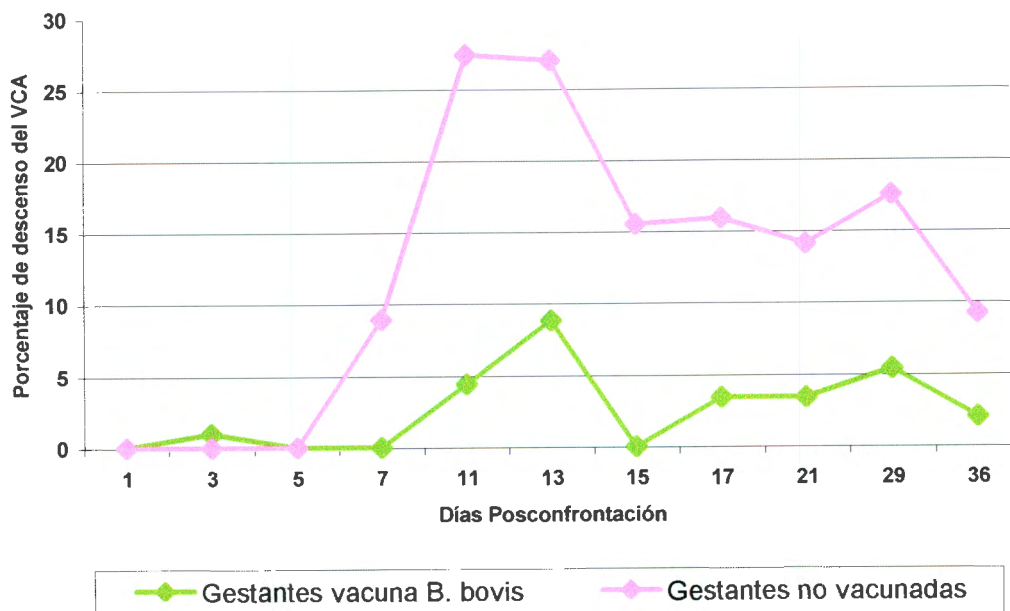


FIGURA 6. Comparación del porcentaje promedio por grupo del descenso del VCA entre los animales gestantes vacunados (Grupo 1) y gestantes no vacunados (Grupo 2). El día 21 PC un animal del grupo 2 abortó y fue eliminado del estudio.

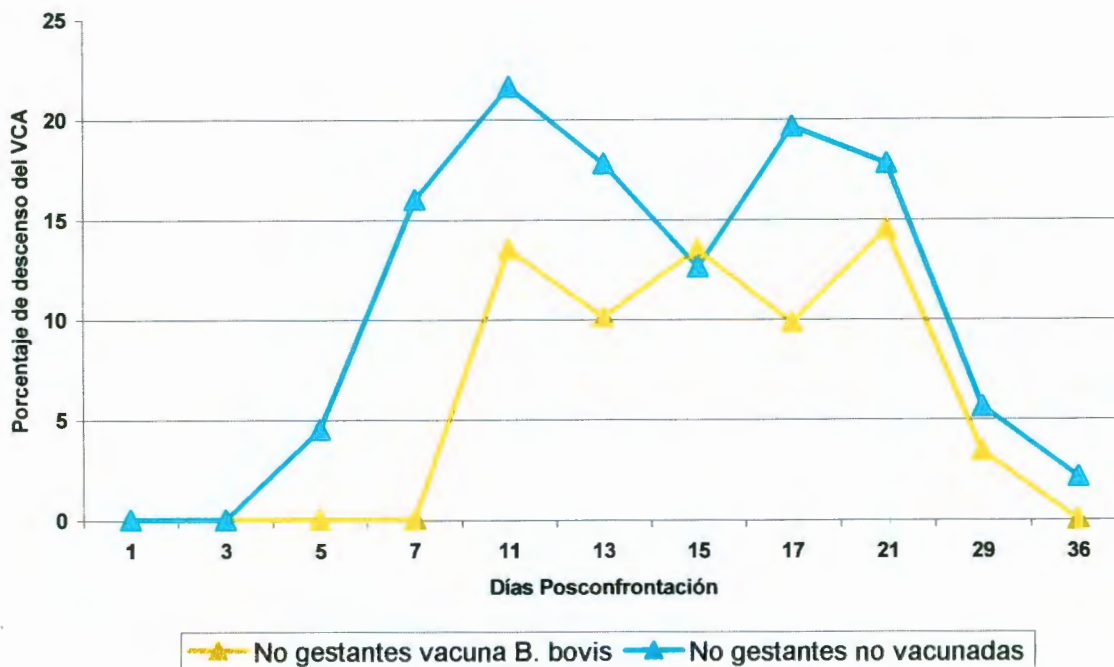


FIGURA 7. Comparación del porcentaje promedio por grupo del descenso del volumen celular aglomerado entre los animales no gestantes vacunados (Grupo 3) y no gestantes no vacunados (Grupo 4). El día 10 PC un animal del grupo 4 murió de babesiosis aguda.

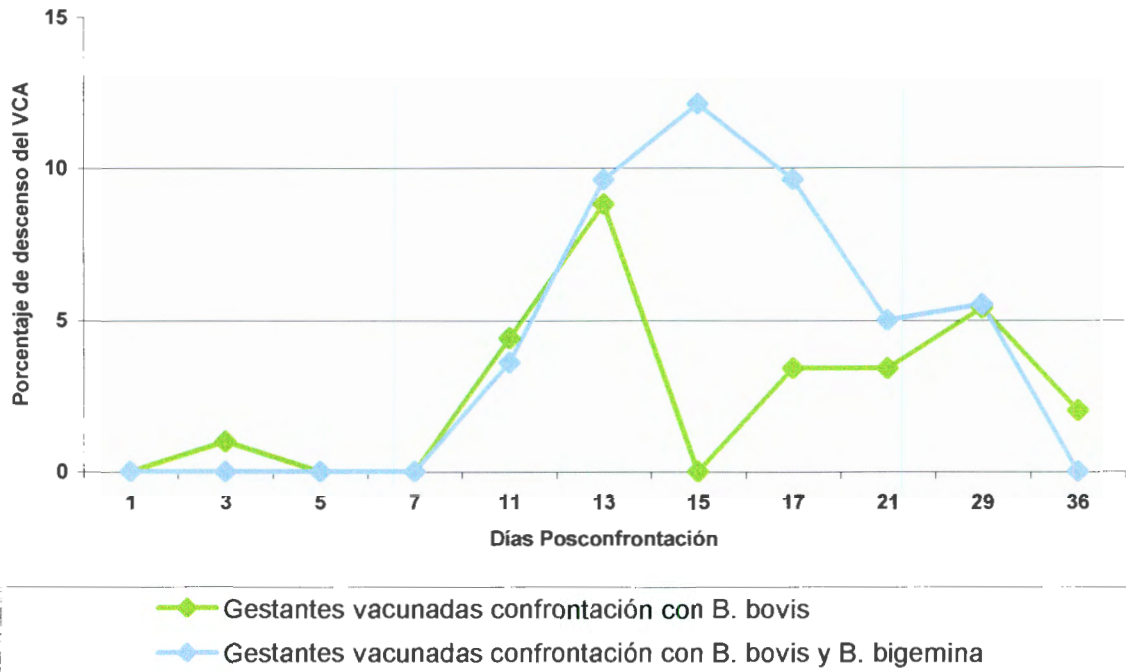


FIGURA 8. Comparación del porcentaje promedio por grupo del descenso del VCA entre los animales gestantes vacunados y confrontados con *B. bovis* (Grupo 1) y gestantes vacunados y confrontados con *B. bovis* y *B. bigemina* (Grupo 5).

VII. CONCLUSIONES

El inmunógeno atenuado y congelado de *B. bovis* a una dosis de 1×10^8 EI, no produce riesgos de aborto en hembras gestantes al final del primer tercio y el inicio del segundo tercio de gestación.

A la confrontación, se observó que los animales vacunados presentaban una inmunidad adecuada, ya que sufrieron descensos de VCA bajos, no presentándose muerte o abortos en estos animales.

Durante la confrontación un animal gestante no vacunado abortó y un animal no gestante no vacunado murió, probablemente debido a la acción del parásito, lo que indica que la confrontación fue adecuada.

Animales gestantes vacunados contra *B. bovis* entre los tres y cuatro meses de gestación, son capaces de resistir la confrontación hasta los seis meses de preñez, sin que esto le cause problemas al producto.

Los resultados del estudio dan una herramienta más al ganadero de zonas tropicales y subtropicales para la introducción de animales especializados, provenientes de zonas libres del parásito, a zonas endémicas de babesiosis.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Aboytes, R., Buening, G., Figueroa, J., Vega, C., El uso de sondas de ADN para el diagnóstico de hemoparásitos. *Rvta Cub Cienc Vet.* 1991. 22:173-181.

Alonso, M., Arellano, C., Cerese, V.H., Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and Caribbean. United Nations, Food and Agricultural Organization, Committee of Experts in Haemoparasites for Latin America and the Caribbean. 1990. pp. 714-725.

Álvarez, J.A., Métodos más comunes para la prevención de la babesiosis bovina. En 2º Seminario Internacional de Parasitol. Anim. División educación continua. 1991. pp. 200-208.

Álvarez, J.A., Cantó, G.J. Epidemiología de la babesiosis. En "Parasitología" Vol. Conmemorativo 25 Aniv de la Soc Mex. de parasitología. 1985. Vol 1:54-75

Álvarez, J.A. y Cantó, G.J., Diagnóstico de la babesiosis. En: Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. Editado por Quiroz, H. UNAM. México, D.F. 1991. pp. 62-74.

Babes, V. Sur l'hémoglobine bacterienne du boeuf. *CR. Hebd. Seances Acad. Sci. París.* 1888; 107:692-694.

Benjamín, M.M., Manual de Patología Clínica Veterinaria. Ed. Noriega LIMUSA. 1991. pp. 33-39; 87-89.

Buening, G.M., Diagnosis of Babesiosis: Past, present and future. En: memorias del II seminario internacional de parasitología animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Morelos, México. 1991. pp. 180-189.

Callow, L.L. *Babesia spp* in the brains of clinically normal cattle and their detection by brain smear technique. *Aust. Vet. J.* 1963. 39:25-31.

Callow, L.L., Protozoal and Rickettsial Diseases, In Animal Health in Australia. Vol. 5 Australian Government Publishing Service. 1984. pp. 123-160.

Callow, L.L., *Babesia bigemina* in ticks grown on non bovine host and its transmission to these hosts. *Parasit.* 1985. 55:375-381.

Callow, L.L., Mellors, L.T., A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomized cattle. *Aust. Vet. J.* 1966. 42:464-465.

Callow, L.L., Tammemagi, L., Vaccination against bovine babesiosis: Infectivity and virulence of blood from animals either recovered from or reacting to *Babesia argentina*. Aust. Vet. J. 1967. 49:249-256.

Callow, L.L., Mellors, L.T., McGregor, W., Reduction of virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. Int. J. Parasitol. 1979. 9:633-638.

Cantó, G.J., Figueroa, J.V., Martínez, J.A., Ramos, J.A. Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de un cultivo *in vitro*. Tec. Pec. Mex. 1996. 34(3): 127-134.

Cantó G.J. Figueroa J.V. Ramos J.A. Álvarez J.A. Mosqueda J.J. Evaluación de la patogenicidad y capacidad protectora de un inmunógeno fresco combinado de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. Vet Mex. 1999; 30(3):215-220.

Cantó, G.J., Rojas, E.E., Álvarez, J.A., Ramos, J.A., Mosqueda, J.J., Vega, C.A., Figueroa, J.V., Protección contra babesiosis con una vacuna mixta de *B. bovis* y *B. bigemina* derivada de cultivo *in vitro* en una confrontación de campo. Inmunización en un área libre de la enfermedad. Tec. Pecu. Mex. 2003. 41(3):323-332.

Cantó, G.J., Rojas, E.E., Álvarez, J.A., Ramos, J.A., Mosqueda, J.J., Vega, C.A., Figueroa, J.V., Protección contra babesiosis con una vacuna mixta de *B. bovis* y *B. bigemina* derivada de cultivo *in vitro* en una confrontación de campo. II Inmunización en un área endémica. Tec. Pecu. Mex. 2003. 41(3):307-315.

Cordero, C.M., Rojo, V.F.A., Parasitología Veterinaria. 1ª. Ed. McGraw-Hill. Madrid, España. 1999. pp. 283-293.

Dalgliesh, R.J., Jorgensen, W.K., Vos, A.J., Australian frozen vaccines for the control of babesiosis and anaplasmosis in cattle-a review. Trop. Anim. Hlth Prod. 1990. 22: 44-52.

Delegación Mexicana. Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. Bull off Intern Epizoot. 1981; 93:903-905.

Domínguez, A., Cob, G., Inmunofluorecencia. En: 1er. Taller internacional sobre diagnóstico y control de anaplasmosis y babesiosis en rumiantes. FMVZ-UADY, Yucatán, México. 1992. pp. 70-71.

Domínguez, A.J.L., Rodríguez, I.V., Oura, C., Cob-Galera, L.A. Determinación de la especificidad y sensibilidad de las técnicas de Ensayo Inmunoenzimático Indirecto y de Inmunofluorescencia Indirecta para el diagnóstico de *Babesia bovis*. Rev. Biomed. 1995. 6:17-23.

Erp EE, Smith RD, Ristic M, Osorno BM. Continuous cultivation *in vitro* of *Babesia bovis*. Am J Vet Res 1980; 41:1141-1445.

FAO. The epidemiology of tick-borne diseases: diagnosis and differential diagnosis; The epidemiology diseases: serological diagnostic test. In FAO ed. ticks and tick-borne disease control. A practical field manual. Vol. II, Rome: FAO/UNO. 1984. pp. 300-332; 333-372.

FAO. Utilización de métodos biotecnológicos aplicables al diagnóstico de los hemoparásitos. Consulta de expertos de FAO. Informe. Yucatán, México. 1993. pp. 2-19.

Figueroa, J.V., Cantó, G.J., Álvarez, J.A., Lona, R., Ramos, J., Vega y Murguía, C.A., Capacidad protectora en bovinos de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de un cultivo *in vitro*. Tec Pecu. Mex. 1998. 36(2):95-107.

Figueroa, J.V., Chieves, L.P., Johnson, G.S., Buening, G.M., Detection of *Babesia bigemina* infected carriers by Polymerase Chain Reaction Amplification. J. Clin Microbiol. 1992. 30(10):2576-2582.

Friedhoff, K.T., Smith, R.D., Transmission of *Babesia* by ticks. Academic press New York, U.S.A. 1981. pp. 267-321.

García, T.D., Cossío, B.R., García, O.M.A., Rodríguez, C.S.D., Anaplasmosis Bovina. Folleto Técnico No. 1. Diciembre. CENIT-PAVET. 1999.

García D., Álvarez J.A., Ramos J.A., Rojas E.E., Figueroa J.V., Cantó, G.J., Estudio de la seguridad y protección de una vacuna viva atenuada mantenida en congelación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en vacas gestantes, Tec. Pecu. Mex. (Enviado a Publicación).

García, Z., Avances en el conocimiento de la epidemiología de la babesiosis. En: Memorias del II seminario internacional de parasitología animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Morelos, México. 1991. pp. 200-208.

Hernández, R. Estudio sobre el efecto de cuatro aislamientos de *Babesia bigemina* en bovinos y garrapatas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del estado de Morelos. 1990.

Jack, R.M., Ward, P.A., Mechanisms of entry of *Plasmodia* and *Babesia* en the red cell. En babesiosis, Ed. Ristic M. Academic Press Inc. 1981. pp. 445-457.

Johnston, L.A., Leatch, G., Jones, P.N., The duration of latent infection and functional immunity to in drugmaster and hereford cattle following natural infection with *Babesia argentina* and *bigemina*. Aust. Vet. J. 1978. 54: 14-18.

Kahl, L., Anders, R., Callow, L., Development of *Babesia bovis* infected bovine erythrocytes. Int J. Parasitol. 1982. 12:103-109.

Kocan, K.M., Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. Vet. Parasitol. 1995. 57:121-152.

Kuttler, K.L. Enfermedades exóticas de los animales, su prevención, diagnóstico y control. Comisión México-Americana para la prevención de la fiebre aftosa, México, D.F. 1986. pp. 39-58.

Kuttler, K.L., World-wide impact of babesiosis. In: Ristic M, ed. Babesiosis of domestic animals and man. Boca Ratón, Florida: CRC Press Inc. 1988. pp. 10-18.

Larios, F., Monroy, J., Márquez, R., Patogenia y fisiopatología de la babesiosis bovina. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria México. 1984. pp. 230-232.

Larios, F., Fisiopatología de la Babesiosis bovina. En: Morilla GA, ed. Inmunología Veterinaria. México: Editorial Diana. 1989. pp. 215-221.

Larrauri, J.F., Evaluación Comparativa de la virulencia de clonas de *Babesia bovis* adhesivas y no adhesivas a células endoteliales de cerebro bovino, Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Querétaro. 2002.

Lee, R.P., Jackson, L.A., Opdebeeck, J.P., Immune responses of cattle to biochemically modified antigens from the midgut of the cattle tick, *Boophilus microplus*. Parasite Immunol. 1991. 13:661-672.

Levine, N.D., Apicomplexa. In synopsis and classification of living organisms, McGraw-Hill Book, Co. 1982. pp. 571-587.

Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprangue, V., Vaura, J. and Guayanés, F.G., A newly revised classification of the protozoa J. Protozool. 1980. 27(1): 37-58.

M'Fadyean, J. and Stockman, S., A new species of piroplasm found in the blood of British cattle. *J. Comp. Path.* 1911. 24:340-354.

Mahoney, D.F., *Babesia* of domestic animals. Frier J.P. (ed), Parasitic protozoa, Vol. IV, Academic Press, New York, 1977. pp. 1-52.

Mahoney, D.F., Goodger, B.V., *Babesia argentina*: Immunogenicity of plasma from infected animals. *Exp. Parasitol.* 1972. 32:71-85.

Mahoney, D.F., Mirre, G.B., A note on the transmission of *Babesia bovis* by the one host tick *Boophilus microplus*. *Res. Vet. Sci.* 1979. 26:253-254.

Mahoney, D.F., Ross, D.R., Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.* 1972. 48:292-298. Citado por : Álvarez, M. Y Cantó, G.J., Epidemiología de la babesiosis. En: Parasitología, Vol. Conmemorativo del 25 Aniv. De la Soc. Mex. Parasitol. 1:-54-72.

Mahoney, D.F., Wright, I.G., Mirre, G.B., Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1973. 67:197-203.

McCosker, P.J. The global importance of babesiosis. En Ristic, M. Krier J. Eds babesiosis New York Academic Pres. 1981. pp. 1-24.

McGowan, J.J., Homer, J.T., Odell, G.V., performance of ticks fed on rabbits inoculated with extracts derived from homogenized tick *Amblyomma maculatum*-Koch (Acarina:Ixodidae). *J. Parasitol.* 1980. 66:42-48.

Morel, P.C. Tick-borne Diseases of Livestock in Africa. En: Manual of tropical Veterinary Parasitology. Cab International. 1989. pp. 353-390.

Norval, R.A.I., Lawrence, J.A., Young, A.S., *Theileria parva*: Influence of vector, parasite and host relationships on the epidemiology of theileriosis in Southern Africa. *Parasitol.* 1991. 102:347-356.

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 Querétaro. 1998.

Opdebeek, J.P., Wong, J.Y.M., Jackson, L.A., Dobson, C., Vaccines to protect Hereford cattle against the cattle ticks, *Boophilus microplus*. *Immunol.* 1990. 63: 363-367.

Osorno M.B., Babesiosis en México. Estudio recapitulativo. Vet. Mex. 1978; 9:203-216:

Pérez, M.M.E., Determinación de una dosis premunizante contra *Babesia bovis* en bovinos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Querétaro. 1992.

Purnell, R.E. Babesiosis in various hosts. En: Ristic M, Kreier J, ed. Babesiosis. New York: Academic Press, 1981. pp. 25-31.

Quiroz H. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. 2ª ed. Limusa. México. 1988; pp. 187-201.

Quiroz, R.H. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Ed. UTEHA. Quinta reimpresión. México, D.F.. 1994. pp. 187-199.

Rees, C.W. Characteristics of the piroplasm *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* in the United States. J. Agric. Res. 1934. 48:427. citado por: Kuttler, K.L.: World-wide impact of babesiosis. In: Babesiosis of domestic animals and man. CRC Press, Boca Raton, Fl. pp. 1-22.

Ristic, M. Research on babesiosis vaccines. In Ristic, M. Ambroise-Thomas, Eds. Malaria and Nijhoff Publishers, Boston. 1981; pp. 103-122.

Ristic, M., Research on babesiosis vaccines. In Ristic, M., Ambroise-Thomas, P. and Krier, J.P., (eds.) Malaria and Nijhoff Publishers, Boston. 1984. pp. 103-122.

Rodríguez, S.D., Immunochemical characterization of *Babesia bovis* clones. PhD. Dissertation. University of Missouri, Columbia. 1985.

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

Rodríguez, S.D., Buening, G.M., Carson, C.A., Caracterización bioquímica preliminar de *Babesia bovis* irradiadas con Co⁶⁰. Tec. Pec. Mex. 1993. 31:16-24.

Rogers, R.J., An evaluation of tick fever outbreaks in northern Queensland in recent years. Aust. Vet. J. 1971. 47:415-417.

Rogers, R.J., Dimmock, C.K., DE Vos, K.A.J., Rodwell, B.J., Bovine leucosis virus contamination of vaccine produced *in vivo* against bovine Babesiosis and anaplasmosis. Aust. Vet. J. 1988. 65:285-287.

Salas E, García J, Ramos JA, Rodríguez E, Aboytes R, Buening GM, Vega CA. Patogenia de una clona irradiada de *Babesia bovis* obtenida de cultivo *in vitro*. Tec Pecu Mex. 1988; 26:36-45.

Sergent, E., Donatien, A., Parrot, L., Lestoquard, F. and Plantureux, E., Les piroplasmosis bovines dues aux *Babesiella*. Etude d'ensemble avec description d'une espece nouvelle, *B. major*, originaire de France. Archs. Inst. Pasteur Alger. 1926. 4: 318-339.

Smith, R.D., Ciclo biológico de *Babesia* en la garrapata. Ciencia Veterinaria. Ed. Moreno Chan, UNAM. México, D.F. 1978. pp. 233-264.

Smith, R.D. Epidemiology of babesiosis. In: Malaria and babesiosis, research findings. 1984.

Smith, R.D., Carpenter, J., Cabrera A., Grovelly, S.M., Erp, E.E., Osorno, B.M. and Ristic M. Bovine babesiosis vaccination against tick-borne challenge exposure with culture, derived *Babesia bovis* immunogens. Am J. Vet. Res. 1979. 40:1678-1682.

Smith, T. Preliminary observations on the microorganism of Texas fever. Med. News Philadelphia. December. 1889. pp. 689-693.

Smith, T., 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. 1893. 1:1-131.

Solorio, J., Rodríguez, R.I., Epidemiología de la babesiosis bovina. I. Componentes Epidemiológicos. Seminario Internacional de parasitología animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Yucatán, México. 1997. pp. 200-208.

Soulsby, E.J.L., Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos, 7ª. Ed. Interamericana, México, D.F. 1982.

Timms, P., Dalgliesh, R.J., Barry, D.N., Dimmock, C.K. and Rodwell, B.J., *Babesia bovis*: Comparison of culture-derived parasites, non-living antigen and conventional vaccine in the protection of cattle against heterologous challenge. Aust. Vet J. 1983. 60:75-78.

Trueman, K.F., Blight, G.W., The effect of age en resistance of cattle to *Babesia bovis*. Aust. Vet. J. 1978. 54:416-420.

Uilenberg, G., Significance of tick-borne hemoparasitic diseases to animal health in the tropics. En: FAO, 1994. Use of applicable biotechnological methods for diagnosing homoparasites. FAO Roma. 1994; pp. 188.

Vega, C., Cultivo *in vitro* de *Babesia spp* y su potencial en el diagnóstico y profilaxis. En: Seminario Internacional de Parasitología Animal. Morelos, México. 1986. pp. 78-85.

Willadsen, P. Kemp, D.H. Vaccination with «concealed» antigens for tick control. Parasitol Today. 1988. 4:196-198.

Willadsen, p., McKenna, R.V. Vaccination with concealed antigens: myth or reality?. Parasite Immunol. 1991. 13:605-616.

Wright, I.G., Osmotic fragility of erythrocytes in acute *Babesia bigemina* infection splenectomized *Bos taurus*. Res. Vet. Sci. 1973. 15: 299-305.

Wright, I.G., Biochemical characteristics of *Babesia* and physicochemical reaction in the host. En: Ristic M., Kreier, J., ed. Babesiosis. New York: Academic Press. 1981. pp. 172-199.

Wright, I.G., Goodger, B.V., Mahoney, D.F., The irradiation of *Babesia bovis* I. The difference in pathogenicity between irradiated and non-irradiated populations. Z. Parasitenkd. 1980. pp. 63:47.

Wright, I.G., Goodger, B.V., Mckenna, R.V., Mahoney, D.F., Virulent and avirulent strains of *Babesia bovis* the relationship between parasite protease content and pathophysiological effect of strain. J. Protozool. 1981. 28(1):118-120.

Wright, I.G., Mahoney, D.F., Mirre, G.B., Goodger, B.V., Kerr, J.D., The irradiation of *Babesia bovis* II-The immunogenicity of irradiated parasites for intact cattle and splenectomized calves. Vet. Immunol. Immunopathol. 1982. 3:591-601.

Wright, I.G., Mirre, G.B., Mahoney, D.F., Goodger, B.V., Failure of *Boophilus microplus* to transmit irradiated *B. bovis*. Res. Vet. Sci. 1983. 34:124-125.

IX. APÉNDICES

APÉNDICE 1

MICROHEMATOCRITO (VOLUMEN CELULAR AGLOMERADO)

- ✧ Se usan tubos capilares lisos (75mm x 1mm) y se llenan aproximadamente a 1cm del borde
- ✧ Se sostiene el tubo en una 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 centrifugan por 5 min. De 10,000-13,000 rpm o por dos minutos a 16 rpm.
- ✧ Se retiran los tubos y se lee el porcentaje de VPC (Volumen del Paquete Celular) utilizando cualquiera de las diferentes lecturas para tubo de hematocrito (Benjamín, 1991).

✧ FROTIS SANGUÍNEO

- ✧ Deben usarse portaobjetos nuevos y limpios previamente sumergidos en alcohol del 95%
- ✧ De preferencia hacer el frotis con sangre fresca recién extraída.
- ✧ Cuando se agregue anticoagulante se deberán preparar en los 15 minutos siguientes de la obtención de la sangre, la cual deberá mezclarse bien agitando suavemente.
- ✧ Se coloca 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 extender la gota.
- ✧ Posteriormente deberá de secarse rápidamente ondeándolo en el aire para evitar la crenación de los eritrocitos.
- ✧ El grosor debe ser delgado.

- ✧ Fijar con alcohol metílico el cual es el uso más común y dejar secar por dos minutos para solidificar las células y evitar si degeneración autolítica.
- ✧ Se utilizará la tinción de Giemsa el cual es un colorante excelente para muchos parásitos de la sangre.
- ✧ Se diluyen 2 ml de la solución de Giemsa con 8ml 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 y se examina al microscopio (Benjamín, 1991).

APÉNDICE 2

DATOS DEL VOLUMEN CELULAR AGLOMERADO DE LA FASE DE VACUNACIÓN Y DESAFÍO.

		BASAL	VACUNA	DESAFÍO					
Día PV (PD)			1	8	12	19	57 (1)	59 (3)	61 (5)
FECHA			18/06/	25-Jun	29-Jun	06-Jul	14-Ago	16-Ago	18-Ago
GRUPO 1	1032	31	30	33	32	28	27	31	28
	1048	32	32	32	25	28	31	30	31
	1127	35	34	36	29	31	31	30	29
	Media	32.6	32	33.6	28.6	29	29.6	30.3	29.3
	Desv. Est.	2.08	2	2.08	3.51	1.73	2.3	0.57	1.52
GRUPO 2	1060	34	34	34	36	33	31	38	30
	1100	32	31	33	34	32	30	32	31
	1122	32	32	32	35	33	30	34	35
	Media	32.6	32.3	33	35	32.6	30.3	34.6	32
	Desv. Est.	1.15	1.52	1	1	0.57	0.57	3.05	2.64
GRUPO 3	1157	31	31	32	29	27	35	34	34
	1154	27	29	25	20	23	27	29	27
	1153	29	29	30	24	29	27	29	27
	Media	29	29.6	29	24.3	26.3	29.6	30.6	29.3
	Desv. Est.	2	1.15	3.6	4.5	3.05	4.61	2.88	4.04
GRUPO 4	1156	31	31	32	30	27	29	31	32
	1169	28	27	28	30	30	27	37	27
	1139	28	25	32	30	31	30	30	35
	Media	29	27.6	30.6	30	29.3	28.6	32.6	31.3
	Desv. Est.	1.73	3.05	2.3	0	2.08	1.52	3.78	4.04
GRUPO 5	1064	37	37	37	34	27	33	30	34
	1114	27	27	27	23	22	28	30	31
	1076	31	33	30	22	28	23	31	32
	Media	31.6	32.3	31.3	26.3	25.6	28	30.3	32.3
	Desv. Est.	5.03	5.03	5.13	6.65	3.21	5	0.57	1.52
GRUPO 6	1096	31	28	34	32	36	33	36	30
	1075	35	34	37	38	33	30	34	30
	1070	28	28	33	35	34	33	35	33
	Media	31.3	30	34.6	35	34.3	32	35	31
	Desv. Est.	3.51	3.46	2.08	3	1.52	1.73	1	1.73

DATOS DEL VOLUMEN CELULAR AGLOMERADO DE LA FASE DE VACUNACIÓN Y DESAFÍO.

Día PV (PD)		63 (7)	65 (9)	69 (13)	71 (15)	73 (17)	75 (19)	79 (23)	85 (29)	92 (36)
FECHA		20-Ago	22-Ago	26-Ago	28-Ago	30-Ago	01-Sep	05-Sep	13-Sep	20-Sep
GRUPO 1	1032	30	31	30	29	31	27	26	28	28
	1048	29	31	28	27	30	31	28	28	30
	1127	31	32	27	25	30	28	32	28	29
Media		30	31.3	28.3	27	30.3	28.6	28.6	28	29
Desv. Est.		1	0.57	1.52	2	0.57	2.08	3.05	0	1
GRUPO 2	1060	29	30	20	20	25	27	29 ABORTÓ		
	1100	28	24	22	23	26	26	25	27	28
	1122	34	29	24	24	26	23	27	23	27
Media		30.3	27.6	22	22.3	25.6	25.3	26	25	27.5
Desv. Est.		3.21	3.21	2	2.08	0.57	2.08	1.41	2.82	0.7
GRUPO 3	1157	36	36	27	28	26	27	29	30	32
	1154	28	26	25	25	26	25	24	28	28
	1153	28	32	25	27	25	25	23	28	28
Media		30.6	31.3	25.6	26.6	25.6	25.6	25.3	28.6	29.3
Desv. Est.		4.61	5.03	1.15	1.52	0.57	1.15	3.21	1.15	2.3
GRUPO 4	1156	30	27	25	25	29	25	24	26	29
	1169	23	16	16 RIP						
	1139	29	25	21	22	21	21	23	28	27
Media		27.3	22.6	23	23.5	25	23	23.5	27	28
Desv. Est.		3.78	5.85	2.82	2.12	5.65	2.82	0.7	1.41	1.41
GRUPO 5	1064	31	32	28	28	29	29	32	29	33
	1114	30	33	30	25	23	23	24	24	30
	1076	28	31	23	25	22	24	24	26	26
Media		29.6	32	27	26	24.6	25.3	26.6	26.3	29.6
Desv. Est.		1.52	1	3.6	1.73	3.78	3.21	4.61	2.51	3.51
GRUPO 6	1096	32	30	30	30	28	28	29	28	29
	1075	33	33	32	32	30	29	29	30	31
	1070	32	34	32	33	31	30	31	30	34
Media		32.3	32.3	31.3	31.6	29.6	29	29.6	29.3	31.3
Desv. Est.		0.57	2.08	1.15	1.52	1.52	1	1.15	1.15	251

DATOS DE LA TEMPERATURA RECTAL PROMEDIO POR GRUPO DE LA FASE DE VACUNACIÓN Y DESAFÍO.

Día PV (PD) FECHA		VACUNA				DESAFÍO		
		1 18/06/	8 25-Jun	12 29-Jun	19 06-Jul	57 (1) 14-Ago	59 (3) 16-Ago	61 (5) 18-Ago
GRUPO 1	1032	39	38.7	38.6	38.7	39.3	38.5	38.3
	1048	39.1	40.8	40.2	38.2	39.5	38.7	38.3
	1127	39.1	39.4	39.3	38.7	39.7	38.8	38.5
	Media	39	39.6	39.3	38.5	39.5	38.6	38.3
	Desv. Est.	0.057	1.06	0.8	0.28	0.2	0.15	0.11
GRUPO 2	1060	39.3	38.7	38.3	38.6	39.2	36	38.3
	1100	39.2	39.3	38.3	38	39.1	38.9	38
	1122	38.6	39.2	38.5	39	39.1	39	39.3
	Media	39	39	38.3	38.5	39.1	37.9	38.5
	Desv. Est.	0.37	0.32	0.11	0.5	0.05	1.7	0.68
GRUPO 3	1157	38.6	38.8	38	38.1	39.4	38	38.9
	1154	39.1	40.4	39	38.4	39	38.5	38.6
	1153	39	40.4	38.3	38	38.8	38.2	38.5
	Media	38.9	39.8	38.4	38.1	39	38.2	38.6
	Desv. Est.	0.26	0.92	0.51	0.2	0.3	0.25	0.2
GRUPO 4	1156	38.5	39	38.5	38.1	39.2	38.5	39
	1169	39.2	39.5	39	39.6	38.8	38	38.8
	1139	39	38.5	38.3	39.1	38.8	39	38.6
	Media	38.9	39	38.6	38.9	38.9	38.5	38.8
	Desv. Est.	0.36	0.5	0.36	0.76	0.23	0.5	0.2
GRUPO 5	1064	39.1	40.4	39.5	38.8	39.2	38.5	38
	1114	39.3	38.8	38.5	38.6	39	38.3	38.4
	1076	38.6	39.9	38.3	38.1	39.4	38.3	38.6
	Media	39	39.7	38.7	38.5	39.2	38.3	38.3
	Desv. Est.	0.36	0.81	0.64	0.36	0.2	0.11	0.3
GRUPO 6	1096	39.1	38.9	38.3	38.5	39.2	39	38.6
	1075	39.4	39.5	38.5	39.3	39.2	39	39.2
	1070	38.8	39.1	38.2	38.9	39.5	38	38
	Media	39.1	39.1	38.3	38.9	39.3	38.6	38.6
	Desv. Est.	0.3	0.3	0.15	0.4	0.17	0.57	0.6

DATOS DE LA TEMPERATURA RECTAL PROMEDIO POR GRUPO DE LA FASE DE VACUNACION Y DESAFÍO.

Día PV (PD)		63 (7)	65 (9)	69 (13)	71 (15)	75 (19)	79 (23)	85 (29)	92 (36)	
FECHA		20-Ago	22-Ago	26-Ago	28-Ago	01-Sep	05-Sep	13-Sep	20-Sep	
GRUPO 1	1032	38.6	38.5	38.6	38.7	38.6	38.7	38.6	38.6	
	1048	38.3	38	38.4	39	38.3	39	38.6	38.6	
	1127	38.5	38.5	39.2	39	38.9	39	38.5	38.7	
Media		38.4	38.3	38.7	38.9	38.6	38.9	38.5	38.6	
Desv. Est.		0.15	0.28	0.41	0.17	0.3	0.17	0.05	0.05	
GRUPO 2	1060	38.4	39.2	40.7	39.4	38.6	29 ABORTÓ			
	1100	39.3	38.5	38.3	39.2	38.5	38	38.6	38.6	
	1122	38	38	39	38.4	38.1	39	39	38.7	
Media		38.5	38.5	39.3	39	38.4	38.5	38.8	38.65	
Desv. Est.		0.66	0.6	1.23	0.52	0.26	0.7	0.28	0.07	
GRUPO 3	1157	38	38.6	39.8	39.4	38.4	38.6	39	38.6	
	1154	38.5	39.5	38.6	38.7	39	38.6	38.6	38.7	
	1153	38	38.5	38.3	39	39	38	38.6	39.2	
Media		38.1	38.8	38.9	39	38.8	38.4	38.7	38.8	
Desv. Est.		0.28	0.55	0.79	0.35	0.34	0.34	0.23	0.32	
GRUPO 4	1156	38	38.5	38.3	39	39.2	39	38.5	38.8	
	1169	39.5	40	16 RIP						
	1139	38.5	38.7	38.3	38.5	38.5	38.7	38.6	38.5	
Media		38.6	39	38.3	38.75	38.8	38.8	38.5	38.6	
Desv. Est.		0.76	0.81	0	0.35	0.49	0.21	0.07	0.21	
GRUPO 5	1064	38.3	38.6	38.8	39.3	38.2	38.8	38.6	38.6	
	1114	38	38.4	38.2	38.9	38.4	39	38.5	38.1	
	1076	38.3	38.6	38.7	38.5	38.7	38.5	38.6	39.2	
Media		38.2	38.5	38.5	38.9	38.4	38.7	38.5	38.6	
Desv. Est.		0.17	0.11	0.32	0.4	0.25	0.25	0.05	0.55	
GRUPO 6	1096	38.6	38.9	38.2	39	38.7	39.2	38.7	39	
	1075	38.7	38.1	38.2	38.8	39	39	38.7	38.3	
	1070	38	38	38.4	38.7	38.8	38.7	38.8	38.6	
Media		38.4	38.3	38.2	38.8	38.8	38.9	38.7	38.6	
Desv. Est.		0.37	0.49	0.11	0.15	0.15	0.25	0.05	0.35	