

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

EVALUACIÓN EN CONDICIONES CONTROLADAS DEL COMPORTAMIENTO DE INMUNÓGENOS
DERIVADOS DE CULTIVO *in vitro* DE *Babesia bovis* Y *Babesia bigemina* ATENUADAS, Y
DESARROLLADO EN BOVINOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA
VALERIA OVIEDO GARCÍA

ASESORES
M.V.Z. PhD GERMINAL JORGE CANTÓ ALARCÓN
M.V.Z. PhD JULIO VICENTE FIGUEROA MILLÁN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, 1999.

No Adq. H61290

No. Título _____

Clas. 636.2

096 e

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, el Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón.

Dr. Julio Figueroa Millán.

Al Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria del estado de Querétaro, por las facilidades brindadas para el desarrollo de este trabajo, en especial al M.V.Z. Juan Manuel Romo Romero, director del Rancho "GB".

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, en especial al CENID-PAVET, por la facilidades brindadas para el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro.

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

RESUMEN

El objetivo de éste estudio, fue obtener a través de animales multiplicadores, un número alto de dosis de inmunógeno mixto de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, que fuera probado ser inocuo, que redujera los costos de producción en forma drástica y que fuera capaz de inducir una respuesta inmune en animales vacunados para resistir la confrontación de aislados de campo en condiciones controladas. Para esto se utilizaron 35 bovinos mayores de 15 meses, libres de anticuerpos contra el protozoario, provenientes de una zona libre de garrapatas *Boophilus* spp, (30 animales experimentales y 5 bovinos esplenectomizados e inmunodeprimidos para la reproducción de las cepas vacunales y aislados de desafío). Se dividieron a los animales en cinco grupos: el grupo 1 de diez bovinos inoculados con inmunógeno mixto, el grupo 2, de cinco bovinos inoculados con un inmunógeno contra *B. bigemina* y el grupo 3, de cinco bovinos inoculados con un inmunógeno contra *B. bovis*, todos provenientes de los animales multiplicadores; el grupo 4, de cinco bovinos inoculados con un inmunógeno mixto proveniente directamente de cultivo *in vitro* (testigo de vacunación), y el grupo 5, de cinco bovinos sin inóculo (testigo de desafío). La dosis de inoculación de bovinos multiplicadores fue de 1×10^9 eritrocitos infectados (ei) de cada especie del parásito, la dosis de vacunación de los animales experimentales fue de 1×10^7 ei, y la dosis de confrontación de los mismos fue de 1×10^8 ei, con aislados patógenos. El desafío se realizó 54 días posvacunación. Mediante el uso de animales multiplicadores se logró obtener parasitemias de 1.14% y de 0.5% para *B. bigemina* y *B. bovis* respectivamente, las cuales indican que con solo un volumen de 4 litros de sangre se obtuvieron 10,000 dosis de inmunógeno contra *B. bovis* y 22,000 dosis contra *B. bigemina*. A la inmunización de los animales experimentales se observaron cambios mínimos en las variables estudiadas (Volumen Celular Aglomerado (VCA) y temperatura rectal). Al desafío de estos animales en el que se utilizaron inmunógenos frescos se observó un grado de protección adecuado ya que ninguno murió y las variables medidas no sufrieron cambios importantes. Del grupo testigo 1 animal murió y dos sufrieron cambios notables en el VCA.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
III.	OBJETIVOS	13
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	14
V.	RESULTADOS	17
VI.	DISCUSIÓN	28
VII.	CONCLUSIONES	31
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	32
IX.	APÉNDICES	38

I. INTRODUCCIÓN

Es evidente que el trópico mexicano produce una cantidad considerable de leche aún cuando predominan cruces de Cebú con Criollo, Suizo pardo y en menor grado Holandés. De la misma forma, miles de cabezas de ganado especializado han sido transportadas a éstas áreas y la muerte por babesiosis ha sido la causa común de pérdidas en animales recién llegados. (Barnet, 1974).

La babesiosis bovina es una de las principales enfermedades hemotrópicas que se reconocen en las regiones tropicales y subtropicales y cuya etiología corresponde principalmente a cuatro especies, *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *B. major* y *B. divergens* (FAO,1978), los cuales son protozoarios intraeritrocíticos, transmitidos por ácaros hematófagos conocidos como garrapatas.

La babesiosis ocasiona el 25% de mortalidad entre los animales jóvenes y de un 50 a un 90% en animales adultos (Osomo, 1978, Quiroz, 1988). Los animales que llegan a recuperarse quedan como portadores asintomáticos, disminuyen su producción láctea, la ganancia de peso y el desarrollo somático, además pueden llegar a sufrir abortos (Kuttler, 1986, Quiroz, 1988).

Las especies de *B.bigemina* y *B. bovis* han sido identificadas en el continente americano como causantes de la enfermedad en bovinos, las que además tienen una alta prevalencia a nivel mundial. Hasta la fecha son varios los ensayos que se han realizado tratando de encontrar agentes inmunizantes contra babesiosis; sin embargo, aún no existe en México un método comercial para prevenir la enfermedad. En Australia se dispone de vacunas vivas contra la babesiosis bovina, aunque son de difícil manejo. (Morilla, 1981).

A partir de la primera descripción de *B.bovis* (Babes, 1888) y del descubrimiento de que la garrapata *Boophilus* spp. (Smith y Kilborne, 1893) era el vector biológico de *B.bigemina* se han realizado numerosos ensayos para el control de la enfermedad producida por estos protozoarios sanguíneos. Estas incluyen el control y erradicación del vector, el ataque directo contra *Babesia* mediante productos babesicidas, la premunización con sangre proveniente de animales afectados, la vacunación con antígenos inactivados del parásito (Smith *et al.* 1979, y 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.).

Trabajos previos realizados por investigadores del CENID-PAVET desde el año de 1988 han demostrado que se cuenta con una cepa de *B.bigemina* atenuada (Vega *et al.* 1985) y otra de *B. bovis* clonada e irradiada, (Rodríguez, 1983), que después de ser evaluadas en condiciones controladas y de campo son capaces de proteger a más del 90% de los animales vacunados contra la confrontación de aislados patógenos. Sin embargo, el costo y lo laborioso de su producción así como las pocas dosis que pueden ser preparadas mediante cultivo *in vitro*, hacen necesario el contar con un método de producción que reduzca costos, facilite su producción y que esta se pueda llevar a cabo inmediatamente sin depender de insumos de importación.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

DEFINICIÓN

La babesiosis es una enfermedad parasitaria transmitida por garrapatas de hospederos mamíferos, causada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia* la cual es manifestada por anemia, fiebre, hemoglobinuria y a menudo muerte (McCosker, 1981).

TAXONOMÍA

De acuerdo a Levine (1982) y al Comité de Sistemas y Evaluación de la Sociedad de Protozoólogos (Levine *et al.*, 1980), *Babesia* clasificada de la siguiente manera:

Reino. Protista

Subreino. Protozoa

Phylum III. Apicomplexa

Clase 2 Sporozoa

Subclase 3. Piroplasmia

Orden 1. Piroplasmida

Familia. Babesiidae

Género. *Babesia*

A la fecha se han descrito más de 70 especies de *Babesia*, de las cuales se considera que solo 18 causan enfermedad en diferentes mamíferos domésticos y solo se conocen los vectores de 15 de ellas (Levine, 1982).

Cuatro especies de *Babesia* destacan por su importancia económica al afectar a los bovinos (F.A.O., 1975). Estas especies son *B.bovis* (Babes, 1888), *B.bigemina* (Smith y Kilborne, 1893), *B.divergens* (M' Fadyean y Stockman, 1911) y *B.major* (Sergent *et al.*, 1926).

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

B.bovis y *B.bigemina* tienen una amplia distribución mundial que corresponde a la distribución de sus vectores, las garrapatas *B. microplus*, *B. decoloratus* y *B. annulatus* (Quiroz, 1988).

Esta enfermedad persiste en regiones tropicales y semitropicales del mundo entre el paralelo 32 latitud sur y el paralelo 40 latitud norte del ecuador. Aparte tiene un importante impacto económico en la ganadería, especialmente en los países no desarrollados. La presencia de babesiosis presenta un obstáculo para la introducción y establecimiento de más ganaderías en esas regiones (Ristic, 1984).

EPIDEMIOLOGÍA

La transmisión de *Babesia* es un proceso complejo el cual se forma por 3 elementos: vector, parásito y huésped; sin embargo, existen una serie de factores que pueden modificar la transmisión de ésta enfermedad, entre estos se encuentran la infección del vector, temperatura ambiental, etc.

Infección del vector.

La infección del Ixódido *B.microplus* y *B.annulatus* con *Babesia* spp. ; es un ciclo complejo, que se inicia desde que ingieren sangre del hospedero. Pero hay que tomar en cuenta que *B.bovis* se transmite únicamente por larvas y *B.bigemina* por ninfas y adultos (Mahoney y Mirre 1979, Potgieter y Els, 1977). Las larvas pierden la infección luego de haber ocurrido la transmisión, impidiéndose de esta forma la transmisión vertical.

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 y estas larvas pueden sobrevivir en esas condiciones hasta 200 días.

Factores físicos.

- Temperatura: la ovoposición a temperaturas de 30 a 37°C, inducen el desarrollo de estadios infectivos de *B. bovis* y *B. bigemina* en *B. microplus*.
- Humedad relativa: es uno de los factores más importantes para el desarrollo de la garrapata, aunque no importante para el desarrollo de *Babesia* spp. , se considera un nivel óptimo el 80%.

Factores del hospedero.

- Factores genéticos: se ha demostrado la diferente susceptibilidad e infecciones con *Babesia* por determinantes genéticos (Mahoney, 1972). Se sabe que el ganado *Bos indicus*, es más resistente que el *Bos taurus* a *B. bovis* (Jonhston *et al.* , 1978).
- Edad: desde las primeras observaciones hechas por Smith y Kilbome en 1893, se observó que los becerros resistían más la enfermedad y esto es debido a la ingestión de anticuerpos colostrales transmitidos por hembras inmunes (Hall *et al.* 1968, Trueman y Blight, 1978). Debido a esto, los becerros menores de 2 meses quedan protegidos de la enfermedad clínica mas no de la infección. También la edad puede determinar la severidad de la infección (Rogers, 1971).

Inmunidad.

Se adquiere activamente contra las babesias por exposición del hospedero al parásito vivo o inactivado o bien por productos de los mismos. La respuesta inmune del hospedero controla la parasitemia destruyendo los parásitos, eritrocitos y deteniendo tanto crecimiento como la multiplicación de la *Babesia* (Phillips, 1971; Mahoney y Goodger, 1972, Callow, *et al.* , 1974). Si los animales sobreviven a la fase aguda de la infección, quedan inmunes a la reinfección con la cepa homóloga. Se ha reportado que existe un estado de inmunidad estéril con una duración hasta de varios años, lo que indica que no únicamente la premunición es necesaria para mantener un nivel estable de inmunidad (Callow *et al.* , 1974). En zonas endémicas de la enfermedad, los animales que la sufren y reciben quimioterapia, van a ser inmunes contra el parásito de por vida; ya que al ser reinfectedos inmediatamente posterior al tratamiento muestran respuestas secundarias suficientemente fuertes para resistir esta segunda confrontación. Además como se mencionó

anteriormente, se presenta una inmunidad estéril, *ie.*, la existencia de inmunidad sin presencia de los parásitos.

CICLO BIOLÓGICO.

Desarrollo de *Babesia* en el vector.

Las garrapatas *Boophilus* son el principal vector de *B. bigemina*. Estas garrapatas son consideradas hospederos desde el desarrollo y la muda de los estadios de la garrapata (larva-ninfa-adulto), que toma lugar solo en animal infestado (Friedhoff and Smith, 1981).

Una garrapata hembra no infectada adquiere la infección primaria mientras se alimenta de un hospedero infectado (Callow and Hoyte, 1961). La infección es adquirida durante las últimas 16 a 24 horas antes que deje de alimentarse del hospedero (Callow, 1968).

Riek (1964), demostró que temperaturas abajo de 20 °C inhiben completamente la infección por medio de la alimentación de *B. microplus* con *B. bigemina*. Los parásitos que están en el hospedero infectan la sangre y posteriormente las garrapatas susceptibles comienzan a adquirir la infección en el lumen intestinal al alimentarse de este.

Dentro del intestino de la garrapata *B. microplus* se han identificado en las primeras 24 horas diferentes formas de *B. bigemina* y no se ha podido observar una relación directa entre ellas, con base en características morfológicas y similitudes con otros géneros Ampicomplexa; Young y Morzania en 1986 sugirieron que podrían representar formas similares a los gametos y el cigoto respaldados en los trabajos de Friedhoff y Smith en 1981. Las formas de *B. bigemina* en el intestino de la garrapata es probablemente un estadio sexual. (Friedhoff and Buscher, 1976; Weber and Friedhoff, 1977).

Existen estados intraeritrocíticos ovoides o esféricos que se desarrollan a parásitos con rayos y que son estados sexuales (Mehlhorn and Schein, 1984); para otros autores representan formas degeneradas que proliferan durante el mantenimiento artificial de cepas y no son precursores de formas infectivas para garrapatas (Stewart, 1978, Dalgliesh *et al.* , 1981, Stewart *et al.* , 1986). Después se observan formas esferoides intracelulares, las cuales se convierten en un cuerpo de

fisión que libera hasta 200 formas conocidas como quinetos o vermículos en el lumen intestinal (Friedhoff y Smith, 1981); estos migran hacia la hemolinfa, ya que atraviesan el intestino y penetran a los óvulos antes de que estos se cubran de quitina (Smith, 1978). Después de la ovoposición y mientras se desarrolla el embrión, los quinetos invaden las células del intestino y se forma otro cuerpo de fisión liberándose una segunda generación de quinetos (Riek, 1964). Estos se van hacia las células de las glándulas salivales por medio de la hemolinfa y se presenta una fase de fisión múltiple con la liberación de miles de cuerpos anulares que se convierten en piroplasmas (peras) (Smith, 1978), las cuales son las formas infectantes de *Babesia* que inoculan las larvas en caso de *B. bovis* (Friedhoff y Smith, 1981) o las ninfas o adultos en caso de *B. bigemina* al bovino (Callow y Hoyte, 1961, Riek, 1964, Morzaria *et al.*, 1977; Potgieter and Els, 1977).

Desarrollo de *Babesia* en el hospedero vertebrado.

El ciclo de vida de *Babesia* en los mamíferos ocurre exclusivamente dentro de los eritrocitos (Friedhoff, 1981).

Los esporozoitos de *Babesia* transmitidos transováricamente por la garrapata, entran al eritrocito directamente (Young and Morzaria, 1986). Este mecanismo no está completamente entendido, pero la invasión de merozoitos ha sido bien estudiada. Esta invasión es un proceso activo que envuelve 5 pasos: 1) contacto entre el merozoito y el eritrocito, 2) orientación del polo apical del merozoito a la superficie del eritrocito, 3) fusión de membrana entre el merozoito y el eritrocito, 4) descarga del contenido de roptrias y 5) invaginación de la membrana del eritrocito y entrada del merozoito (Young and Morzaria, 1986). Durante el paso final el límite de la membrana del eritrocito no es destruido, el parásito está cerca de ésta membrana. En el desarrollo la membrana desaparece y el parásito se introduce al citoplasma del eritrocito (Rudzinska, 1981). El parásito es ahora llamado trofozoito (estado de alimentación) y es una división asexual en el eritrocito (Melhorn and Schein, 1984).

Los merozoitos producidos en los eritrocitos abandonan la célula e inmediatamente invaden más eritrocitos. Esta división asexual continúa indefinidamente hasta que muere el huésped y es eliminado el parásito o es ingerido por otra garrapata en la última fase de repleción (Rudzinska, 1981).

PATOGENIA

Se sabe que los elementos introducidos por las garrapatas al bovino invaden los eritrocitos, en los cuales se dividen por fisión binaria longitudinal tomando la forma característica de pera (Kuttler, 1986, Morzaria and Young 1986). La *Babesia* ejerce acción traumática al liberarse del eritrocito, acción expoliatriz al alimentarse de hemoglobina, acción mecánica al formar acúmulos del parásito a nivel capilar y por último una acción tóxica con sus productos metabólicos (Quiroz, 1988).

El parásito altera las características de la membrana, lo que provoca la formación de anticuerpos que actúan como opsoninas que fijan el complemento, aumentan la fagocitosis, además los eritrocitos alteran su permeabilidad provocando una mayor fragilidad osmótica que los predispone a una lisis espontánea en los capilares sanguíneos (Wright, 1973).

La causa de muerte en babesiosis ha sido atribuida a choque por inflamación generalizada, debido a la activación de sustancias vasoactivas (Wright, 1972), a la formación de complejos inmunes antígeno- anticuerpo que se depositan en el riñón ocasionando glomerulonefritis y a la coagulación intravascular diseminada complicada con trombosis pulmonar (Dalglish *et al.*, 1976).

SIGNOS

Las infecciones por *B. bovis* se asemejan en muchos aspectos a aquellos observados en *B. bigemina*, sin embargo, existen algunas características que las hacen diferentes. El nivel de anemia es menos severo con *B. bovis*, pero con mayor frecuencia se ve involucrado el sistema nervioso central en las infecciones con esta especie. Es generalmente aceptado que *B. bovis* es el más virulento de ambos organismos (Kuttler, 1986).

Los signos agudos de la babesiosis se manifiestan después de un periodo de incubación de 8 a 14 días (Kuttler, 1986). El primer signo de la enfermedad es el aumento de la temperatura corporal, la cual puede alcanzar hasta 42°C con una duración de 2 a 7 días o más (Soulsby, 1982), durante este periodo febril se desarrolla un cuadro anémico, acompañado de hemoglobinuria y taquicardia. En este momento el parásito alcanza sus más altas tasas de reproducción, llegando a destruir hasta el

75% de los glóbulos rojos (Mahoney, 1977; Hildebrandt, 1981), con reducción mayor al 50% en el valor del hematocrito.

Al inicio de la enfermedad las mucosas están pálidas y la orina tiene un color normal; conforme la lisis eritrocítica ocurre, las mucosas se toman ictericas, el animal se debilita, enflaquece y la orina se toma de color rojo vino. Al examinar la sangre, esta resulta de menor densidad, ligeramente rojiza y de lenta coagulación, con frecuencia la diarrea es seguida de constipación acompañada de moco y coágulos de sangre (Kuttler, 1986).

Se ha sugerido que la anemia no solo es el resultado de la ruptura de los eritrocitos por la salida del parásito, Mahoney en 1977 indica que 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.

LESIONES MACROSCÓPICAS.

Los tejidos se encuentran de congestionados a pálidos de acuerdo a la prolongación de la enfermedad. Se presenta ictericia, pero quizá no sea tan obvia si la congestión es intensa (Callow, 1984; Morel, 1989). Hay hemorragias subserosas en el corazón y en los intestinos. La sangre fluye aunque los vasos estén dañados (Callow, 1984). La vejiga contiene orina roja, los riñones presentan varios grados de congestionamiento, hay esplenomegalia con sangre oscura y la pulpa ablandada, hepatomegalia, la vesícula biliar está llena de bilis granulosa. El corazón y los pulmones están normales excepto por la variable presencia de hemorragias y manifestación ocasional de edema. Los pulmones afectados contienen una copiosa cantidad de exudado sanguinolento. El encéfalo está normal, pero si está infectado con *B. bovis* la materia gris de la superficie quizá esté distintivamente rosada (Callow, 1984). La mucosa del abomaso presenta inflamación catarral con pequeñas hemorragias y erosiones en la región pilórica. En la mucosa vaginal hay petequias (Quiroz, 1988).

LESIONES MICROSCÓPICAS

En cerebro hay distensión en capilares por los eritrocitos parasitados. En bazo se observa reducción del radio de la pulpa roja y blanca. Los centros germinales contienen pocas células y están rodeados por una capa de linfocitos, hay un gran número de células con cariorexis y los macrófagos contienen hemosiderina (Ristic, 1980). En casos severos los riñones están afectados con degeneración tubular y depósito de hemosiderina a lo largo de todas las nefronas (Callow and McGavin, 1963). En hígado hay necrosis centrolobular, infiltración de grasa, y neutrófilos en las áreas necrosadas. En pulmón los capilares están congestionados y contienen, linfocitos, macrófagos y neutrófilos. En el corazón se presenta subendocarditis, subepicarditis y hemorragias miocárdicas. Los grandes vasos presentan baja parasitemia, mientras que en los capilares periféricos sucede lo contrario (Quiroz, 1988).

DIAGNÓSTICO

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

En el laboratorio se deben correr las siguientes pruebas:

- Observación al microscopio de frotis sanguíneos para confirmar la presencia del parásito en los eritrocitos (Callow, 1984). El examinar el cerebro nos puede ayudar a diferenciar si la infección es causada por *B. bovis* y *B. bigemina*. La infección por *B. bovis* es caracterizada por un gran número de eritrocitos infectados en los capilares del cerebro (Callow and Johnston, 1963; Hoyte, 1971). La *B. bigemina* en el eritrocito del bovino asume varias formas.
- 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.
- Posteriormente se pueden correr pruebas serológicas para confirmar el diagnóstico, tales como Fijación de Complemento, Inmunofluorescencia Indirecta, Hemoaglutinación pasiva, Aglutinación capilar, Difusión en gel, Aglutinación con bentonita y partículas de látex,

Contrainmunolectroforesis, la técnica de Ensayo inmunoenzimático ELISA (Callow, 1984; Morilla, 1978)

- Aparte existen pruebas para detectar el ADN del parásito como la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), (Figuroa *et. al*, 1992).

CONTROL Y VACUNACIÓN

Para el control de la babesiosis se han formulado muchas variables, las cuales van desde el control y la erradicación del vector de la enfermedad hasta el ataque directo contra la *Babesia* (Blood *et. al*, 1992).

Al vector se le ha tratado de controlar con baños garrapaticidas (de aspersion o de inmersión) (Callow, 1984), pero esto no es muy recomendable ya que en algunas explotaciones existe la estabilidad enzoótica por infecciones naturales moderadas y el empleo de estos baños interrumpe el balance infección-transmisión y se crea la inestabilidad enzootica con la cual aparecen severos brotes de la enfermedad.

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).

El método que se utilizó para la prevención de la babesiosis bovina es la premunización, que consiste en provocar la infección de manera controlada en los animales susceptibles aplicando un tratamiento específico para, por un lado, permitir una suficiente estimulación antigénica y por el otro lado evitar la muerte del animal portador (Bock *et al.* , 1992).

El método profiláctico contra la babesiosis utilizado en la actualidad y desarrollado inicialmente en Australia (Dalglish *et al.* , 1990) consiste en el uso de organismos vivos de reducida virulencia, los cuales se obtienen después de realizar pases seriados en becerros esplenectomizados. Con el advenimiento de técnicas que permiten la multiplicación *in vitro* del parásito, las poblaciones que se pueden utilizar en la vacunación son más uniformes, además de que previenen el riesgo de contaminación por el número de animales e imposibilitan la posible reversión a la virulencia que podría producirse debido a los constantes pases de sangre a los animales.

Trabajos realizados desde 1988 por investigadores del INIFAP han demostrado que se cuenta con una cepa de *B.bigemina* atenuada y otra de *B.bovis* irradiada que después de ser evaluadas en condiciones controladas y de campo son capaces de proteger a más del 90% de los animales vacunados contra la confrontación de aislados patógenos pero el costo es alto y su producción es muy laboriosa (Hernández *et al.* , 1990; Cantó *et al.* , 1996; Figueroa *et al.* , 1998; Cantó *et al.* , 1999)

III. OBJETIVOS

1. Ver la posibilidad de multiplicar las cepas vacunales de *B.bovis* y *B.bigemina* en bovinos esplenectomizados e inmunodeprimidos.
2. Evaluar la inocuidad de las cepas atenuadas provenientes de los animales multiplicadores.
3. Determinar el rendimiento de las cepas provenientes de animales.
4. Evaluar la capacidad inmunoprotectora de las cepas atenuadas de *Babesia* provenientes de animales multiplicadores en contra de la confrontación controlada de aislados patógenos.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

LOCALIZACIÓN

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Rancho González Blanco (GB), que pertenece al Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Querétaro, y está ubicado en el municipio del El Marqués a 27 Km. de la Ciudad de Santiago de Querétaro.

MATERIAL BIOLÓGICO

Microorganismos experimentales.

Se utilizaron dos cepas de *Babesia* derivadas de cultivo *in vitro*, previamente demostradas como atenuadas, las cuales se identificaron como BIS para *B. bigemina* (Vega *et al.* , 1985) y BOR para *B. bovis* (Rodríguez *et al.*, 1983). Los protozoarios se multiplicaron en el laboratorio de acuerdo a lo descrito por Pálmer *et al.* , (1982) y Vega *et al.* (1985) elaborándose las dosis iniciales de inmunización para los animales multiplicadores, las que fueron de 1×10^9 para ambas especies. El inmunógeno se inoculó fresco a dos animales receptores, uno con cada cepa. Es muy importante el aclarar que los animales multiplicadores de los hemoparásitos, tuvieron que ser inoculados con las cepas semilla provenientes del cultivo *in vitro*, ya que si esto no se hubiera realizado, posiblemente se hubieran dado las condiciones para que las cepas originales hubieran revertido a la virulencia. Así mismo y para expandir el inóculo de confrontación que se tenía congelado, se utilizaron dos bovinos uno para cada especie de *Babesia*.

Animales experimentales.

Se utilizaron 30 bovinos *Bos taurus*, mayores de 14 meses de edad y provenientes de Cuatro Ciénegas, Coahuila, zona libre de garrapatas *Boophilus*. Se tomaron muestras de suero para verificar su negatividad a anticuerpos contra *Babesia* spp, *Anaplasma marginale*, *Brucella abortus*, IBR, BVD y Leucosis bovina. También se les practicó la prueba intradérmica de tuberculina para determinar su negatividad contra *Mycobacterium bovis*.

Animales multiplicadores.

Se utilizaron 3 bovinos del mismo origen que los animales experimentales, los cuales fueron esplenectomizados e inmunodeprimidos con dexametasona durante 5 días consecutivos a una dosis de 6 mg por día. El mismo día de la operación dos de los animales fueron inoculados, uno con una dosis de 1×10^9 eritrocitos infectados con *B. bovis* procedentes de cultivo *in vitro* y el otro con la misma dosis y el mismo origen pero de la especie *bigemina*.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Vacunación

Los animales experimentales se dividieron al azar en cinco grupos. El grupo 1 consistió de 10 animales y recibió un inmunógeno mixto proveniente de los animales multiplicadores a una dosis de 1×10^7 de cada especie de *Babesia*. El grupo 2 formado por 5 animales recibió un inóculo de *B. bovis*, proveniente del bovino multiplicador. El grupo 3, de cinco animales, recibió un inóculo de *B. bigemina* también de origen bovino, el grupo 4, primer grupo testigo, de cinco animales, recibió un inóculo mixto de parásitos frescos derivados directamente de cultivo *in vitro* a las dosis descritas para el grupo 1 y el grupo 5 también de cinco animales fue el grupo testigo de confrontación y no recibió tratamiento alguno.

Confrontación.

Cincuenta y cuatro días después de la inoculación, todos los grupos fueron confrontados con aislados de *Babesia* obtenidos de infecciones de campo a una dosis de 1×10^8 . El grupo 1 fue confrontado contra ambas especies del parásito, el grupo 2 solo contra *B. bovis*, el grupo 3 con *B. bigemina* y los grupos 4 y 5 con las dos especies del protozoario.

Variables medidas.

A todos los animales se les tomó la temperatura rectal y también se obtuvo sangre de los vasos sanguíneos de la base de la cola en su parte inferior, con la cual se hicieron frotis que posteriormente fueron teñidos con colorante de Giemsa para la observación directa al microscopio (Benjamin, 1991), (Apéndice 1). También se determinó el Volumen Celular Aglomerado (VCA) por el

método del microhematocrito (Benjamin, 1991), (Apéndice 1). Estas variables fueron obtenidas en dos ocasiones antes de la inoculación de los animales y correspondieron a los resultados basales.

Posterior a la inoculación, el muestreo se hizo todos los días a partir del día cuatro y hasta el día diez posinoculación (PI) y posteriormente cada siete días hasta la confrontación. Una vez que se realizó esta 54 días después a la inoculación, las mismas variables fueron determinadas iniciando cuatro días posterior a la confrontación y hasta la finalización del experimento. Desde una semana antes de la inmunización y hasta que finalizó el experimento, semanalmente se obtuvo plasma de todos los animales para estudios de anticuerpos y se utilizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta (Morilla, 1986) (Apéndice 1).

V. RESULTADOS

En la primera fase del experimento, cuyo objetivo fue producir mediante animales multiplicadores una elevada cantidad de dosis de inmunógeno atenuado y poder realizar la vacunación de los animales experimentales, se utilizaron 3 bovinos.

En el caso de *B. bigemina* el animal inoculado esplenectomizado e inmunodeprimido, para el día 6 PI presentó una parasitemia de 1.14%, lo que significaría que obteniendo solamente 4.0 litros de sangre se podrían producir 22,857 dosis de 1×10^7 ei (Cuadro 1).

Para el caso de *B. bovis* se utilizaron dos animales esplenectomizados e inmunodeprimidos, debido a que en la inoculación del primer animal se obtuvo una parasitemia menor a 0.001%, la cual sería insuficiente para producir un número considerable de dosis de vacuna. En este animal se observó un alza de temperatura hasta de 41.5 °C y un descenso del 55% en el VCA con respecto al hematocrito basal para el día 6 PI, por lo tanto fue necesario realizar un pase inoculando 250 ml de sangre de este bovino a un segundo animal, obteniéndose para el día 5 una parasitemia de 0.5%, suficiente para que con 4 litros de sangre se pudieran obtener 10,309 dosis de 1×10^7 (Cuadro 2).

TEMPERATURA

Fase de Vacunación

En esta fase hubo ligeros aumentos de la temperatura en todos los grupos experimentales, sin que se observara fiebre mayor a 39.9 °C en ninguno de los grupos. Estos cambios se debieron en primer lugar a las reacciones producidas por la inoculación de los agentes vacunales y en segundo lugar a que los animales venían de pastoreo extensivo y no habían tenido manejo alguno, por lo tanto presentaban un fuerte estrés en cada ocasión en que eran manejados. En el grupo testigo aunque no fue vacunado, la simple inyección de eritrocitos pudo provocar también reacciones por parte del animal, ya que estos actuaron como agentes extraños.

Fase de Confrontación

Durante esta etapa se pudo observar que se presentaron dos picos de incremento de temperatura, uno para el día 3 PI y el otro para el día 11 PI, viendo en ambas ocasiones superior en el grupo testigo en comparación con los grupos vacunados.

Así mismo no se observaron diferencias entre los grupos vacunados con el inmunógeno mixto fuese este de origen bovino o de cultivo *in vitro* (Gráfica 1).

VOLUMEN CELULAR AGLOMERADO

Fase de Vacunación

En todos los grupos incluyendo al grupo testigo se observó una baja en el hematocrito, la cual llegó a su máximo descenso para el día 8 PV. La gráfica 2 nos muestra claramente que es el grupo testigo el que sufre el menor descenso, siendo de 13.2 con respecto al hematocrito basal. Esta baja fue probablemente causada por una adaptación fisiológica sufrida por los animales, los cuales eran originarios del norte del país de una zona desértica.

En cuanto a los grupos vacunados se observaron descensos del 27.3%, 18.1%, 30.1% y 28.9% para los grupos mixto bovino (grupo 1), *B. bigemina* (grupo 2), *B. bovis* (grupo 3) y mixto fresco (grupo 4) respectivamente. Estos descensos quizá hayan sido producidos por la presencia de las poblaciones de parásitos aunadas al descenso fisiológico observado también en los animales testigo.

Fase de Confrontación

Durante ésta fase se observó un decremento en el VCA de todos los animales sin importar a que grupo pertenecían. Se observaron disminuciones, con respecto al VCA basal del 5.2% (día 12), 4.3% (día 6), 8.5% (día 14), 8.4% (día 8) y del 13.6% (día 14) para los grupos 1, 2, 3, 4, y testigo (grupo 5), lo que indica claramente una protección generada por el inmunógeno producido en los animales multiplicadores (Gráfica 3).

Para observar con mayor claridad la importancia de estas disminuciones, la gráfica 4 nos muestra en forma de porcentaje, el descenso que sufrió el hematocrito de los animales de los grupos experimentales. Se puede apreciar claramente que los grupos vacunados con los inmunógenos mixtos, de origen bovino o cultivo *in vitro* se comportan de una forma parecida. Asimismo, el desafío con *B. bigemina* es el que produce menor descenso (12.7%) y es el grupo testigo donde se observa la mayor caída (43%). El descenso máximo para los otros tres grupos fue de 16.1% (mixto bovino), 24.8% (*B. bovis*) y 23.5% para los grupos vacunado con el inmunógeno proveniente del cultivo. A partir del día 14 PD se observa que todos los animales comienzan a recuperarse elevando su VCA.

Durante la fase de confrontación sólo uno de los animales del grupo testigo murió, presentando hematocrito del 14%, temperatura rectal por arriba de 40 °C y hemoglobinuria marcada. El hecho de que solo un animal haya muerto podría indicar que el desafío no fue tan adecuado como se hubiese querido; sin embargo, al unir todos los datos obtenidos se aprecia que el inmunógeno producido en los animales multiplicadores es capaz de proteger a los bovinos vacunados, contra el desafío homólogo de poblaciones de campo.

TÍTULOS DE ANTICUERPOS

Se observó que la inmunización indujo a la respuesta del sistema inmune. Durante el periodo de vacunación se observó una rápida respuesta, al utilizar el antígeno de *B.bovis*; en los grupos vacunados con el inmunógeno de origen bovino mixto o solo de *B. bovis*. Con respecto a los anticuerpos anti-*B. bigemina* se observó que los grupos vacunados con el inmunógeno mixto de origen bovino y origen *in vitro* así como el grupo vacunado con el inmunógeno de *B.bigemina*, montaron una respuesta inmune parecida, contrario a lo observado en el grupo vacunado con *B. bovis* el cual tuvo una respuesta mínima.

Al desafío se observa una buena respuesta en contra de los dos antígenos por parte de todos los grupos, con excepción nuevamente del grupo vacunado solo con *B.bovis* contra el antígeno de *B. bigemina*. (Gráficas 5,6).

CUADRO 1

B. bigemina

Bovino 1.

Inoculación 1×10^9 eritrocitos infectados.

	Hto	Temp.	Parasitemia
Día 1 PI	30	38.5	-----
Día 2	30	38.8	-----
Día 3	27	38.9	-----
Día 4	26	38.8	+ Sangre periférica
Día 5	26	39.1	0.02%
Día 6	25	39.2	1.14%

Total de células rojas/microlitro 5,040,000

Obteniendo 4 litros de sangre = 22,857 dosis de 1×10^7

CUADRO 2

B.bovis.

Bovino 1

Inoculación 1×10^9 eritrocitos infectados.

	Hto	Temp.	Parasitemia
Día 1 PI	31	38.6	-----
Día 2	30	38.7	-----
Día 3	26	40.5	+ Sangre capilar
Día 4	27	41	+ Sangre periférica
Día 5	23	41	<0.001
Día 6	17	41.5	<0.001

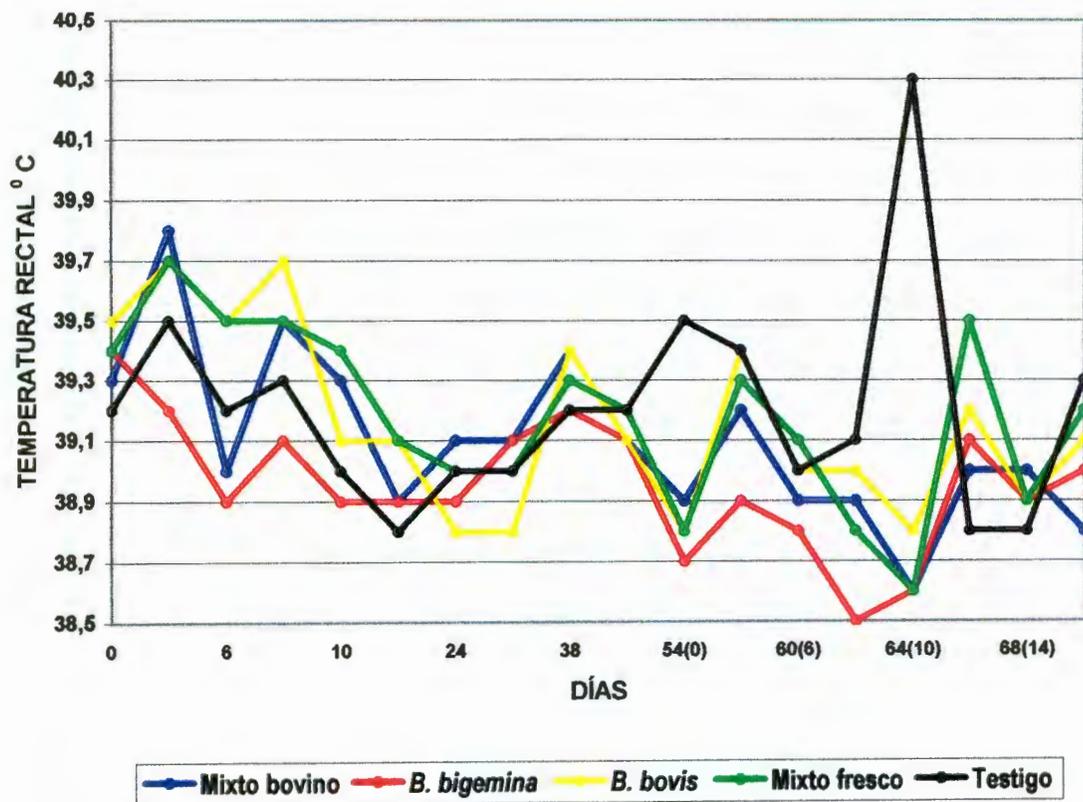
Bovino 2

Inoculación de 250 ml de sangre proveniente del bovino 1.

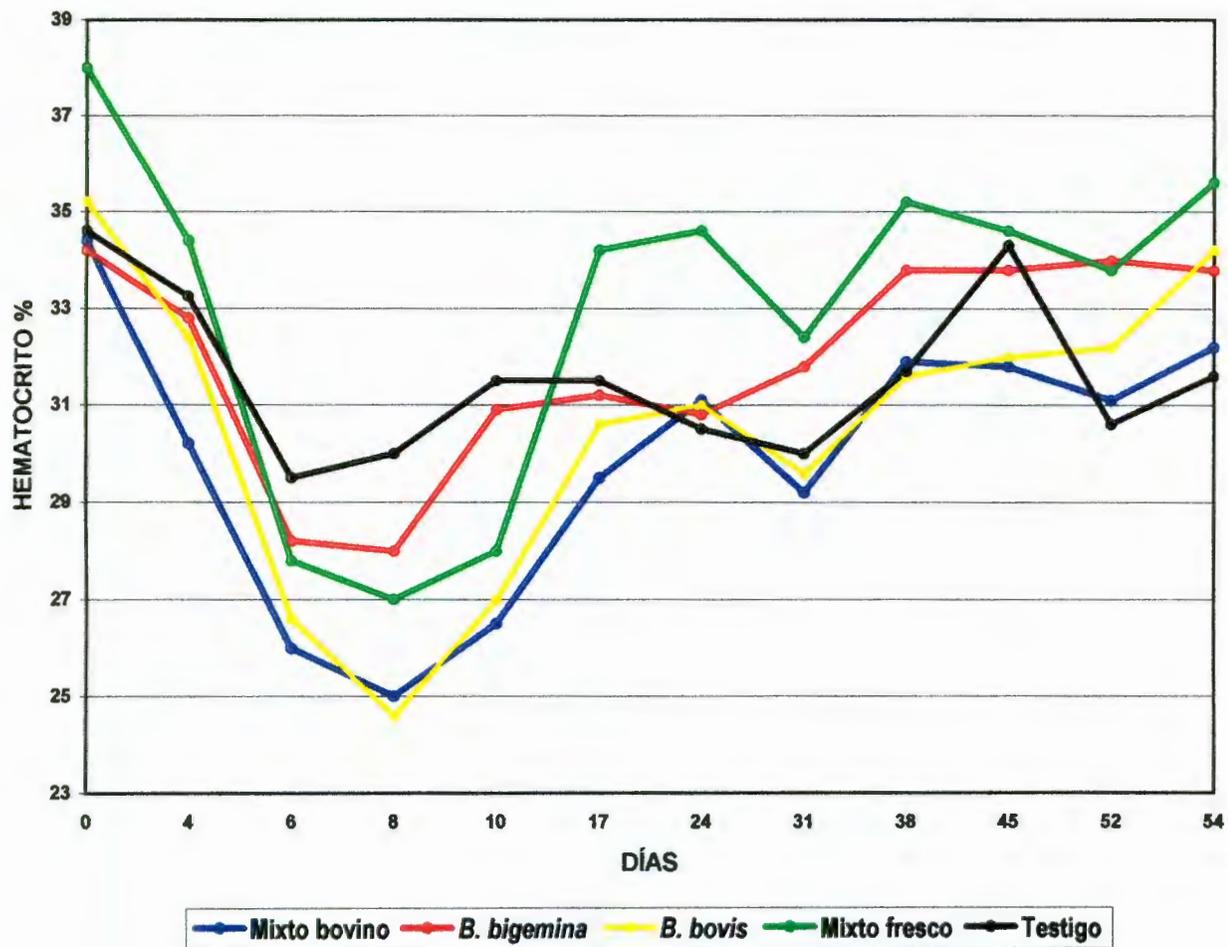
	Hto	Temp.	Parasitemia
Día 1 PI	29	39	-----
Día 2	28	39	-----
Día 3	27	39.2	+Sangre periférica
Día 4	27	39.8	+Sangre periférica.
Día 5	24	41.5	0.5%

Total de células rojas / microlitro 5,150,000

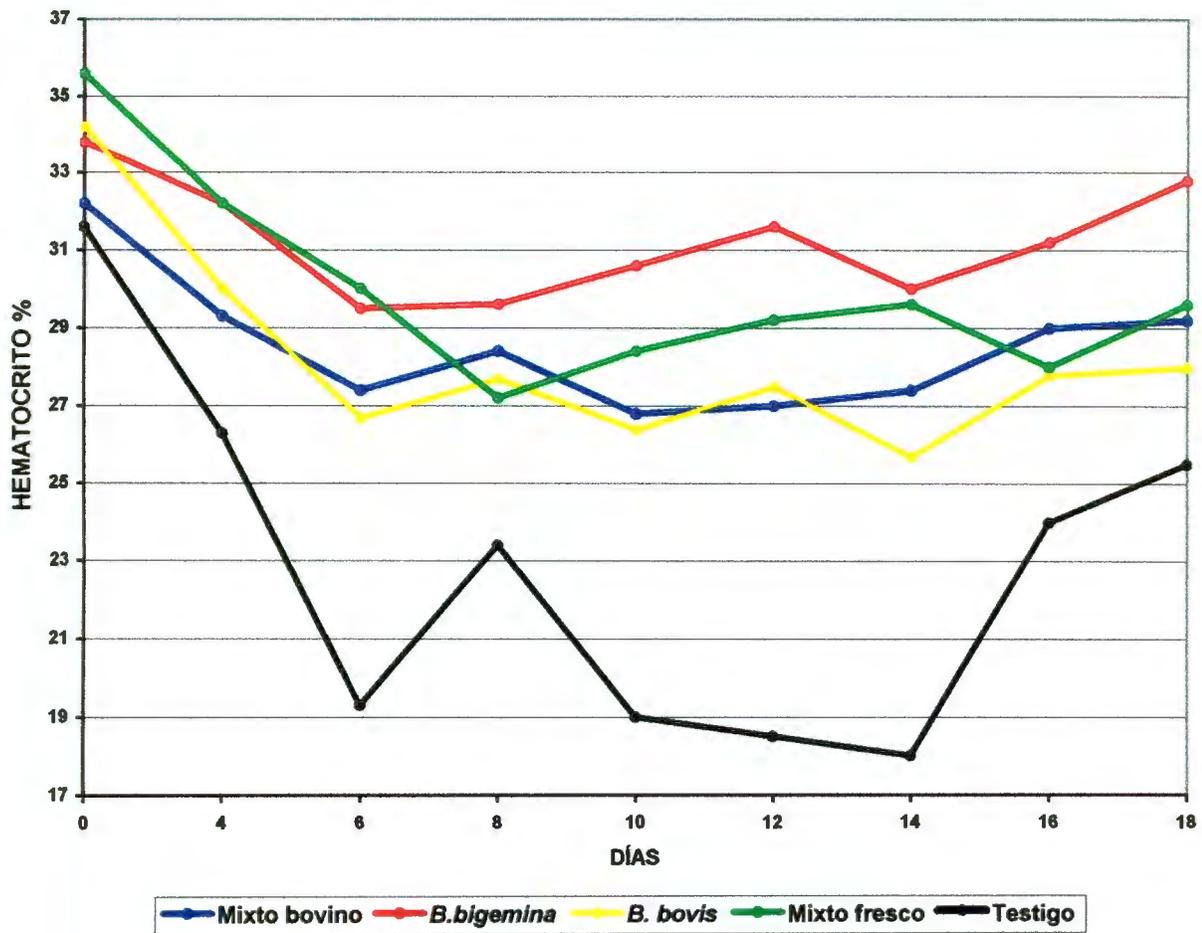
Obteniendo 4 litros de sangre = $10,309$ dosis de 1×10^7 .



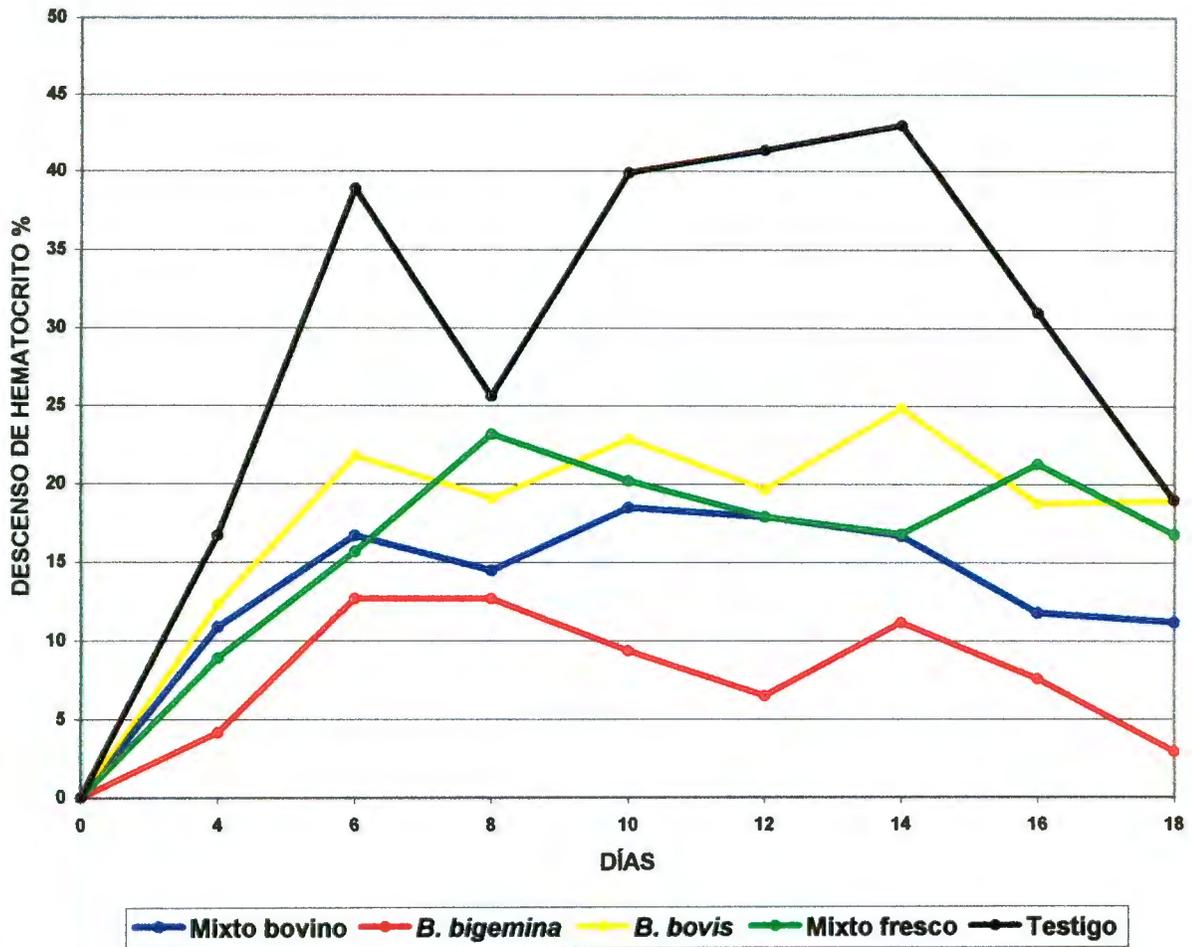
Gráfica 1. Comportamiento de la temperatura en los periodos de posvacunación (día 0 a 54) y posdesafío (día 54 a 71), de los diferentes grupos de animales experimentales.



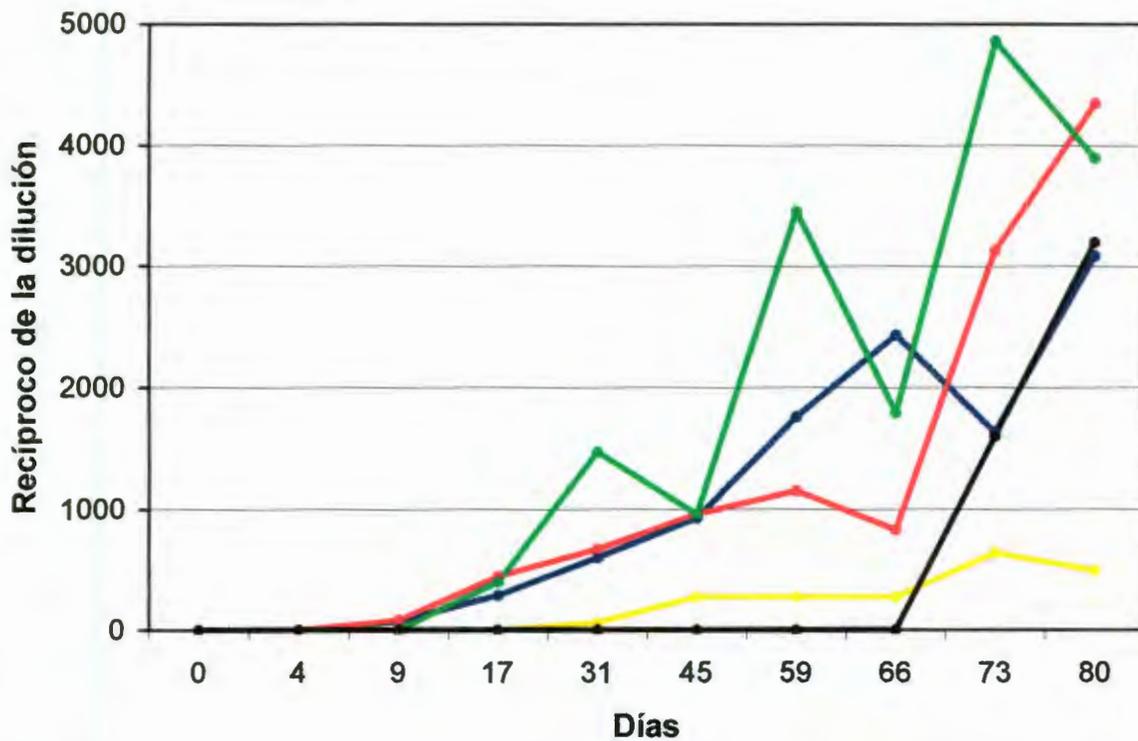
Gráfica 2. Comportamiento del porcentaje promedio de hematocrito de los diferentes grupos de animales experimentales a partir del día 0 hasta el día 54 posvacunación.



Gráfica 3. Comportamiento del porcentaje promedio de hematocrito de los diferentes grupos de animales experimentales a partir del día 0 hasta el día 18 posdesafío.

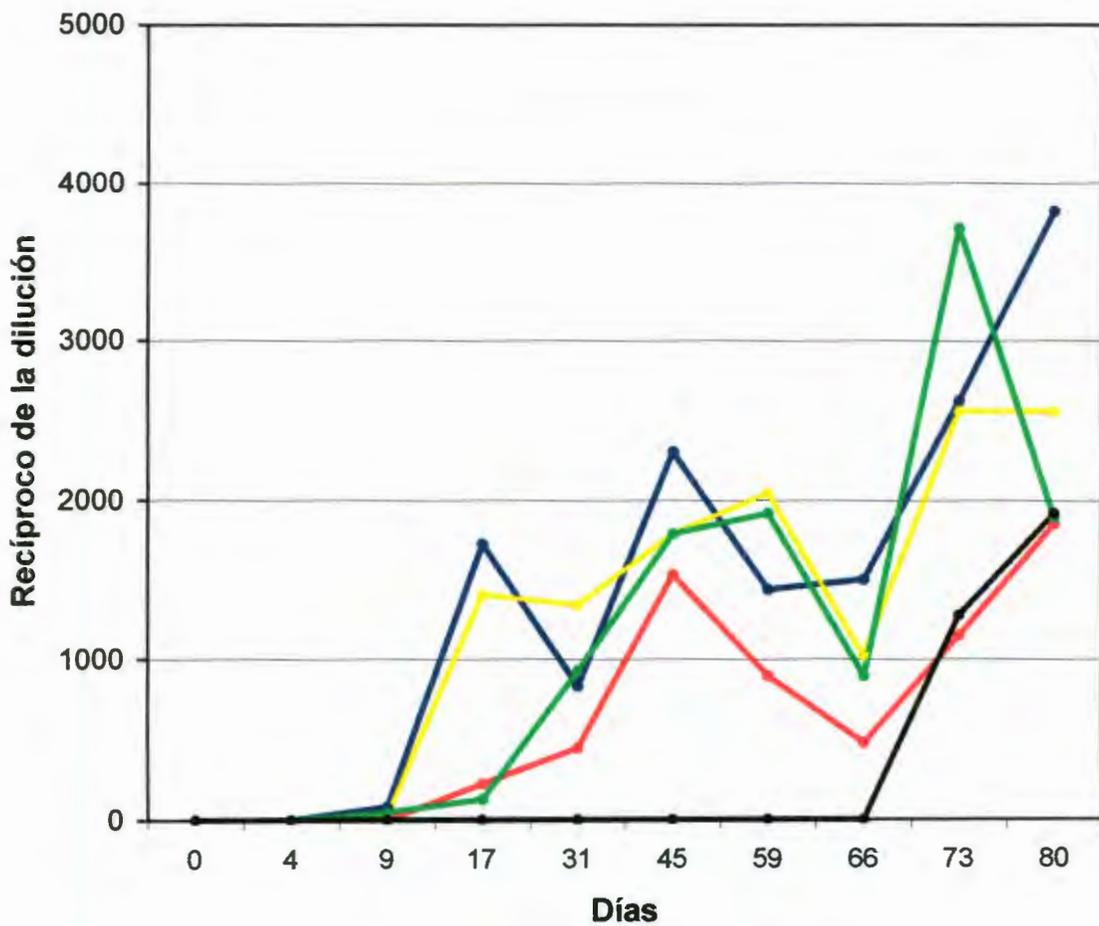


Gráfica 4. Comportamiento del porcentaje de descenso del hematocrito, de los diferentes grupos de animales experimentales a partir del día 0 hasta el día 18 posdesafío.



—●— Mixto bovino
 —●— *B. bigemina*
 —●— *B. bovis*
 —●— Mixto fresco
 —●— Testigo

Gráfica 5. Comportamiento de los títulos de anticuerpos anti *Babesia bigemina* mediante Inmunofluorescencia indirecta de los diferentes grupos de animales experimentales durante los periodos de posvacunación (días 0 a 54) y de posconfrontación (días 54 a 80).



—●— Mixto bovino
 —●— *B. bigemina*
 —●— *B. bovis*
 —●— Mixto cultivo
 —●— Testigo

Gráfica 6. Comportamiento de los títulos de anticuerpos anti *Babesia bovis* mediante Inmunofluorescencia indirecta, de los diferentes grupos de animales experimentales durante los periodos de posvacunación (días 0 a 54) y de posconfrontación (días 54 a 80).

VI. DISCUSIÓN

La variación de los efectos causados y medidos en el huésped, posterior a una infección con organismos virulentos o atenuados por *Babesia* spp. en bovinos, es producida en gran parte, por las características de virulencia y patogenicidad de las poblaciones de parásitos utilizados para inducir tal infección (Callow, 1976, Echaide *et al.* , 1993; Salas *et al.* ,1988; Hernández *et al.* , 1990). Además otros factores de consideración son los relacionados con el huésped bovino; tales como edad, sexo, estado nutricional, estado fisiológico, estado inmune, susceptibilidad del huésped, etc. y los relacionados con los métodos de preparación y rutas de administración del inóculo conteniendo los parásitos del estudio (Alvarez y Cantó, 1985; REDLAB, 1994; Dalglish, 1993; Timms *et al.* 1984; Loh, 1973).

El curso de la infección observada en los animales multiplicadores, después de la aplicación de 100 veces las dosis normal de vacunación al utilizar parásitos frescos (Cantó *et al.* 1996; Figueroa *et al.* 1998), nos demuestra en forma inequívoca que se trata de dos poblaciones de parásitos con un alto nivel de atenuación, ya que aún a esas dosis no produjeron la muerte de los bovinos, no obstante estos habían sido esplenectomizados e inmunodeprimidos. Cantó *et al.* (1999) utilizando las mismas poblaciones de parásitos de las cepas BIS y BOR a dosis de 1×10^9 y 1×10^8 respectivamente, en bovinos sin esplenectomizar ni inmunodeprimir indican que el uso de estas dosis de vacunación nunca comprometieron la salud de los animales durante el periodo de vacunación.

Por otro lado, la rapidez y la cantidad de dosis que podrían haber sido producidas, nos dan una herramienta más, para la protección contra la babesiosis, en el caso de que se realizara una importación de miles de cabezas de ganado a zonas tropicales.

La vacunación de los diferentes grupos de bovinos experimentales con las poblaciones de parásitos provenientes de los animales multiplicadores, indicó que estos mantuvieron la atenuación original ya que no produjeron cambios drásticos en las variables estudiadas. Se pudo observar que el grupo vacunado con el inmunógeno de origen bovino causó un menor descenso en el VCA (27.3%) que el producido en el grupo inmunizado con el inmunógeno de origen *in vitro* (28.9%), indicando la similitud de ambos agentes.

A la confrontación con 1×10^8 eritrocitos infectados con cepas de campo de cada una de las especies del hemoparásito, se pudo observar que ambos grupos presentaron temperaturas por arriba de $39.5 \text{ }^\circ\text{C}$, siendo las máximas observadas de $39.2 \text{ }^\circ\text{C}$ para el grupo mixto de origen bovino y de $39.5 \text{ }^\circ\text{C}$ para el grupo mixto de origen *in vitro*. A este respecto Cantó *et al.* (1996) y Figueroa *et al.* (1998) informan de incrementos de temperatura promedio a $40.2 \text{ }^\circ\text{C}$ para *B. bigemina* y de $39.7 \text{ }^\circ\text{C}$ para *B. bovis* respectivamente. Asimismo Cantó *et al.* (1999) indican en un estudio con una vacunación mixta incrementos de $39.7 \text{ }^\circ\text{C}$. Comparando estos resultados, al utilizar una sola especie o ambas, con los obtenidos en el presente estudio, se podía pensar que el inmunógeno mixto de origen bovino incrementó de alguna forma el desarrollo de inmunidad, ya que por lo menos en esta variable la respuesta fue menos severa.

La reacción producida por las cepas de campo en los animales testigo inoculados en el estudio, puede clasificarse de moderada con base a los parámetros evaluados *ie*, fiebre ($> 39.5 \text{ }^\circ\text{C}$) con un solo día de duración promedio y un decremento máximo del hematocrito del 43%, causando hemoglobinuria y la muerte de un bovino. En contraste, y aún con la poca patogenicidad de las cepas de desafío, los animales vacunados con los organismos procedentes de los bovinos multiplicadores sufrieron un descenso promedio de solo el 16.1% en el VCA que al compararlo con el observado en los bovinos inmunizados con el inmunógeno de origen *in vitro* que fue del 23.5% y a los encontrados por Cantó *et al.* (1996); Figueroa *et al.* (1998) que fueron de 18.5% para *B. bigemina* y del 19% para *B. bovis* respectivamente, indican un decremento comparativamente menor en esta variable, que nos permite asegurar que el inmunógeno proveniente de los bovinos multiplicadores fue capaz de inducir una respuesta inmune adecuada contra el desafío de poblaciones de campo de *B. bovis* y *B. bigemina*.

Los resultados observados en relación a la respuesta inmune contra los antígenos de *B. bovis* y *B. bigemina*, nos hacen pensar que *B. bigemina* presentó una buena cantidad de antígenos comunes con *B. bovis*, dado que la respuesta detectada fue elevada; no así con *B. bovis*, que por la respuesta observada presenta una escasa antigenicidad cruzada con *B. bigemina*.

Trabajos realizados con anterioridad sugieren que la inmunidad cruzada con estas especies de *Babesia* tienen variaciones, indicando que la protección contra *B. bovis*, podría conseguirse inoculando fracciones semipurificadas de *B. bigemina* o la infección controlada del protozoario. (Wright *et al.*, 1987). Si consideramos que la producción de anticuerpos es de alguna forma indicativo de inmunidad adquirida, el presente estudio apoyaría los resultados mencionados anteriormente.

Es conocido el riesgo que se presenta al utilizar vacunas que derivan de sangre. En Australia, el uso de inmunógenos contra *Babesia* producidos en becerros, llevó a la infección de cientos de bovinos con leucosis (Rogers *et al.*, 1988), casos como éste no es difícil que se repitan, ya que no es posible garantizar que los animales donadores se encuentren libres de la enfermedad. Sin embargo, es de conocimiento público que administraciones anteriores en nuestro país, han realizado importaciones masivas de bovinos lecheros procedentes de los Estados Unidos de América y Canadá hacia regiones tropicales del país con consecuencias desastrosas por causa de las enfermedades hemotrópicas. Por lo tanto, el presente estudio buscó y logró, el poder contar con una herramienta más para el control de parte del problema, que resultara rápida de implementar, se produjera en grandes cantidades y fuera más económica que la única opción actual.

VII. CONCLUSIONES

Es posible multiplicar las cepas vacunales de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en bovinos esplenectomizados e inmunodeprimidos, permaneciendo atenuadas y mostrando ser inocuas tanto para los animales multiplicadores como para los animales vacunados.

Al multiplicar las cepas vacunales fue posible obtener una cantidad suficiente de dosis vacunales, que pueden ser usadas para vacunaciones masivas si se requiere.

El inmunógeno producido en los animales multiplicadores es capaz de proteger a los bovinos vacunados contra el desafío homólogo controlado de aislados patógenos. Con esto tenemos una herramienta más para la protección contra la babesiosis.

Se debe de aclarar que éste inmunógeno es extraído de la sangre del animal multiplicador por lo que se debe de tomar en cuenta el riesgo que puede haber en cuanto al contagio de infecciones vía sanguínea; y solo debería de utilizarse como una opción cuando se realicen importaciones masivas de ganado a zonas tropicales.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Alvarez M.J.A., Cantó A.G.J. 1985. Epidemiología de la babesiasis. En: Soc. Mex. Parasitol. (eds) Parasitología, Volumen conmemorativo. México D.F. 55-72.

Babes V. 1888. Sur L'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. C.R. Hebd. Seanc. Acad. Sci, Paris 107:692-694.

Barnet S.F. 1974. Economical aspects of protozoan tick-borne diseases of livestock in parts of the world other than Britain. Bull. Off. Int. Epiz. 84:183-196.

Benjamin M.M. 1991. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. Editorial Noriega Limusa. 33-39, 87-89.

Blood D.C., Radostits O.M., Arundel J.H., y Gay C.C. 1992. Medicina Veterinaria 7ª. Ed. En español. Vol. II. Edit. Interamericana-McGraw-Hill, México, 1059-1067.

Bock R.E., de Vos A.J., Kingston T.G., Shields I.A., Dalgliesh R.J. 1992. Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. Vet. Parasitol. 43:45.

Callow L.L. and Hoyte H.M.D. 1961. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp and the cattle tick *Boophilus microplus*. Aust. Vet. J. 37:381-390.

Callow L.L. and McGavin M.D. 1963. Cerebral babesiosis due to *Babesia argentina*. Aust. Vet. J. 39:15-21.

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

Callow L.L. 1968. A note on homologous strain immunity in *Babesia argentina* infections. Aust. Vet. J. 44:268-269.

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

Callow L.L. 1976. Métodos australianos de vacunación contra la anaplasmosis y babesiosis. Rev. Mundial Zootec. 18:9

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

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

Cantó G.J.; Figueroa J.V.; Ramos J.A.; Alvarez J.A.; Mosqueda J.J.; 1999. Evaluación de la patogenicidad y Capacidad protectora de un inmunógeno fresco combinado de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. Vet. Mex. 30 (3): 215-219.

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

Dalgliesh R.J., Callow L.L., Mellors L.T. and McGregor W. 1981. Development of a highly infective *Babesia bigemina* vaccine of reduced virulence. Aust. Vet. J. 57:8-11.

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

Dalgliesh R.J. 1993. Babesiosis. En: K S Warren (ed) Immunology and Molecular biology of Parasitic Infections. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London. pp 352:383.

Echaide I.E., de Echaide S.T., Guglielmone A.A. 1993. Live and soluble antigens for cattle protection to *Babesia bigemina*. Vet. Parasitol. 51:35

FAO ,1975 Report of the FAO Expert Consultation on Research on Tick borne Diseases and their vectors. Rom, Italy, 6-8 may.

FAO. 1978. Report on the second FAO. Export consultation of Research on tick-borne disease and their vectors.

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

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

Friedhoff K.T. and Buscher G. 1976. Rediscovery of Koch's Strahlenkorper of *Babesia bigemina*. Z. Parasitenk. 50:345-347.

Friedhoff K.T. 1981 Morphologic aspects of *Babesia* in the tick. In Ristic M. and Krier J.P. (eds), Babesiosis. Academic Press, New York, pp.143-169.

Friedhoff K.T., and Smith R.D. 1981. Transmission of *Babesia* by ticks. In Ristic, M. and Krier J.P. (eds), Babesiosis. Academic Press, New York, pp.267-321.

Hall W.T.K., Tammemagi L. and Jonhston L.A.Y. 1968 Bovine babesiosis: The immunity of calves to *Babesia bigemina* infection. Aust. Vet. J. 44:259-268.

Hernández R., Alvarez J.A., Buening G, M., Cantó G.J., Monroy M., Ramos J.A., y Vega C.A. 1990. Diferencias en la virulencia y en la inducción de resistencia de aislamientos de *Babesia bigemina* obtenidos de cultivo *in vitro*. Tec.Pecu.Mex. 28:51-61.

Hildebrandt P.K. 1981.The organ and vascular pathology of Babesiosis. En Babesiosis. ED. Miodrag Ristic and Julius P.Krier. Academic Press Inc. New York, U.S.A. 459-473.

Hoyte H.M.D. 1971. Differential diagnosis of *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in cattle using thin blood smears and brain smears. . Aust. Vet J. 47:248-250.

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

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

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 Wallace F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. J.. Protozool.27(1):37-58.

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

Lohr K.F.1973. Susceptibility of non.splenectomized and splenectomized Sahiwal cattle to experimental *Babesia bigemina* infection. Zbl. Vet. Med. B. 20:52.

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

Mahoney D.F., 1972.Immune response to hemoprotozoa. II. *Babesia* spp. In soulsby, E:J:L. (ed), Immunity to animal Parasites. Academic Press, New York,pp.301-341.

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

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

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

Mehlhorn H. and Schein E. 1984. The piroplasms: Life cycle and sexual stages. In Baker J.R. and Muller R. (eds), *Advances in Parasitology*, Vol.23. Academic Press, New York, pp. 37-103.

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

Morel P.C. 1989. Tick-borne Diseases of livestock in Africa. En: *Manual of Tropical Veterinary Parasitology*. Edited by Institute d' Elevage et d Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux Technical Centre for Agricultural and Rural Co-operation. Published by: CAV International . English edition. 353-390.

Monilla A.G. 1978. Inmunología de la babesiosis bovina. En *Memorias del Curso de Actualización de las Enfermedades Parasitarias del Ganado Bovino*. UNAM. 41-56.

Monilla G.A.;1981. Inmunología de la babesiosis. en *Ciencia Veterinaria*. Editor Moreno Chan R.; 3:240-275.

Monilla G.A., Bautista G.C., 1986. *Manual de Inmunología*. Editorial Diana. 124,125.

Morzania S.P., Brocklesby D.W., and Harradine D.L.1977. Experimental transmission of *Babesia major* by *Hemaphysalis punctata*. *Res. Vet. Sci*23:261-262.

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

Palmer D.A.; Buening G.M.; Carson C.A., 1982. Cryopreservation of *Babesia bovis* for *in vitro* cultivation. *Parasitology*. 84:567.

Pérez Soria M.M.E. 1992. Determinación de una dosis premunizante contra *Babesia bovis* en bovinos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro.

Phillips R.S, 1971. Immunity of rats and mice following injection with Co^{60} irradiated *Babesia rodhoni* infected red cell. *Parasitol.*62:221.

Potgieter F.T. and Els H.J.,1977. Light and electron macroscopic observation on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymph and noreplet females of *Boophilus decoloratus*. Ondersteport J. *Vet. Res.* 44:213-232. En: Alvarez, M. y Cantó G.J., 1985. *Epidemiología de la Babesiosis*. En: *Parasitología*, vol. Comemorativo del 25 Aniv. de la Soc. Mex. *Parasitol.* 1:54-72.

Quiroz H. 1988. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales domésticos*. 2da edición. Limusa. México. 187-201.

REDLAB/Programa de hemoparásitos.1994. Protocolo para evaluar la seguridad y eficacia de los inmunógenos contra la anaplasmosis y babesiosis bovina. FAO, Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile pp. 7-10.

Riek R.F. 1964. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust. J. Agric. Res. 15:802-821.

Ristic M. 1980. Protozoal diseases bovine medicine and surgery; American Veterinary Publication Inc. California; 335-369.

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

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

Rogers R.J., 1971. An evaluation of tick fever outbreaks in northern Queensland in recent years. Aust. Vet. J. 47:415-417. Citado por Alvarez M., y Cantó G.J., 1985. Epidemiología de la Babesiosis. En: Parasitología, vol. Conmemorativo del 25 Aniv. de la Soc. Mex. Parasitol. 1:54-72.

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

Rudzinska M.A. 1981. Morphologic aspects of host-cell-parasite relationship in babesiosis. In Ristic M., and Krier J.P. (eds), Babesiosis. Academic Press, New York, pp. 87-141.

Salas T.E., García G.J., Ramos J.A., Rodríguez R., Aboytes R., Buening G.M., Vega C.A. 1988. Patogenia de una clona irradiada de *Babesia bovis* obtenida de cultivo *in vitro*. Tec. Pecu. Mex. 26(1):36.

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

Smith T., and Kilborne F.L. 1893. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. Bull. Bur. Anim. Ind. U.S.. Dep. Agri. 1:1-301.

Smith R.D. 1978. Ciclo biológico de *Babesia* en la garrapata. En Ciencia veterinaria. Editor Moreno Chan R. 2:233-264. U.N.A.M., D.F. México.

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

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

Stewart N.P. 1978. Differences in the life cycles between a vaccine strain and an unmodified strain of *Babesia bovis* (Babes 1889) in the tick *Boophilus microplus* (Canestrini) J. Protozool. 25:497-501.

Stewart N.P., Dalgliesh R.J. and de Vos A.J. 1986. Effect of different methods of maintenance on the development and morphology of *Babesia bigemina* in the gut of *Boophilus microplus*. Res. Vet. Sci., 40:94-98.

Timms P., Dalgliesh R.J., Barry D.N., Dimmock C.K. and Rodwell B.J., 1983. *Babesia bovis*: Comparison of culture-derived parasites, non-living antigen and Conventional vaccine in the Protection of Cattle against Heterologous Challenge. Aust. Vet. J. 60: 75-78.

Timms P., Stewart N.P., Rodwell B.J., Barry D.N., 1984. Immune responses of cattle following vaccination with living and non-living *Babesia bovis* antigens. Vet. Parasitol.16:243.

Trueman K.F., and Blight G.W.1978. The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis* Aust. Vet. J. 54:301-305.

Vega C.A., Buening G.M., Green T.J., Carson C.A.,1985.*In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. Am J.Vet.Res.46:416-420.

Weber G. and Friedhoff K.T. 1977. Preliminary observations on the ultrastructure of supposed sexual stages of *Babesia bigemina* (Piroplasma). Z. Parasitenk. 53:83-92.

Wright I.G. 1972. Studies on pathogenesis of *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in splenectomized calves. Z. Parasitenk 39:85-102.

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

Wright I.G., Goodger B.V., Leatch G.,Aylward J.H, Rode-Bramanis K., Waltisbuhl D.J. 1987. Protection of *Babesia bigemina*-immune animals against challenge with virulent *Babesia bovis*. Infec.Immun. 55:364.

Young A.S. and Morzaria S.P. 1986. Biology of *Babesia* . Parasitol. Today 2(8):211-219.

APÉNDICE 1.

Técnicas de laboratorio utilizadas.

MICROHEMATOCRITO

- Se usan tubos capilares lisos (75mm x 1mm) y se llenan aproximadamente a 1 cm del borde.
- Se sostiene el tubo en 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 rpp o por 2 min. a 16,000 rpp.
- Se retiran los tubos y se lee el porcentaje del VCA (volumen celular aglomerado) utilizando cualquiera de las diferentes lecturas para tubo de hematocrito (Benjamín, 1991).

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

- Fijar el frotis de glóbulos rojos, infectados con *Babesia*, en metanol durante tres minutos y dejar secar a temperatura ambiente.
- Hacer tres círculos sobre el frotis con el lápiz marcador.
- Colocar el suero problema, el suero control positivo y el control negativo (Uno en cada círculo). Se recomienda diluir los sueros por lo menos 1: 20 en SSAF, pH 7.2 para evitar la fluorescencia inespecífica.
- Colocar los frotis en una cámara húmeda e incubar a 37° C durante 30 min.
- Lavar en SSAF pH 7.2 durante 10 min.
- Lavar en agua destilada durante 5 min.
- Dejar secar a temperatura ambiente.
- Colocar en cada círculo suero de conejo, antigamaglobulina de bovino conjugado. Debe haberse titulado previamente.
- Colocar las laminillas en una cámara húmeda e incubar a 37° C durante 30 min.
- Lavar en SSAF pH 7.2 durante 5 min.
- Lavar en agua destilada durante 5 min.
- Dejar secar a temperatura ambiente.
- Poner una gota de glicerina fosfatada en cada círculo y colocar un cubreobjetos.
- Observar con el microscopio de luz ultravioleta. (Morilla, 1986)

FROTIS SANGUINEO

- Debe 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 min. 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 de ser delgado.
- Fijar con alcohol metílico el cual es el de uso más común y dejar secar por dos minutos para solidificar las células y evitar su 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 8 ml de agua destilada o agua amortiguada de un pH de 6.8.
- Se vierte el colorante diluido en el frotis y se deja teñir durante cinco minutos.
- Se lava, se seca y se examina al microscopio (Benjamín, 1991)

APÉNDICE 2

REGISTRO DE LAS VARIABLES MEDIDAS POR ANIMAL

VACUNACIÓN
Grupo mixto bovino

TEMPERATURA RECTAL

Días posvacunación		0	4	6	8	10
Animal N°	147 V	39,9	39,8	39,1	39,7	39,9
	202 A	39	40	38,2	40	39
	150 N	39,3	39,6	39	39,7	39,3
	311 N	39	40,3	39	39,4	39
	257 A	38,9	40	39,3	39,3	38,9
	206 A	39,7	39,4	39,3	40	39,7
	3A	38,6	40,2	39	39,2	38,6
	259 A	40	39,2	39,5	39,5	40
	125 V	39,5	40,6	39,4	39,6	39,5
	123 V	39,2	39,2	39,1	39,3	39,2
Media		39,3	39,8	39,1	39,6	39,3
Desv.Std.		0,46	0,48	0,36	0,28	0,46
Grupo B.bigemina						
Animal N°	122v	40	39,2	39,8	39,6	39,5
	72v	39,5	39	38,4	39,3	39
	175a	39	39,3	39	39,8	38
	637v	39,4	38,8	38,5	38,9	38,5
	02v	39,5	40,1	39,1	39,1	39
Media		39,48	39,28	38,96	39,34	38,8
Desv.Std.		0,41	0,50	0,56	0,36	0,57
Grupo B.bovis						
Animal N°	4A	39,1	39,4	39,3	39,5	39,4
	181A	39,4	39,8	39,4	40	39,2
	2347A	39,3	40,5	39,2	39,6	39,4
	61V	39,6	39,3	40,2	39,7	39
	67V	40,3	39,8	39,5	39,9	38,8
Media		39,54	39,76	39,52	39,74	39,16
Desv.Std.		0,46	0,47	0,40	0,21	0,26
Grupo mixto fresco						
Animal N°	188A	39,5	40,2	40,3	40	40
	479A	40	39,3	39,4	39,8	39,5
	271A	39	39,4	39,5	39	39
	48A	39,4	39,8	39,5	39,6	39,4
	79V	39,5	40	38,8	39,4	39,5
Media		39,48	39,74	39,5	39,56	39,48
Desv.estandar		0,36	0,38	0,53	0,38	0,36
Grupo testigo						
Animal N°	27	39	39,1	39	39,5	39
	57	39,1	39,3	39,8	38,8	39
	475	39,3	39,4	38,7	39	39
	169	39,2	39,6	39,5	39,6	39,1
	71	39,2	40,3	39	39	39
Promedio		39,16	39,54	39,2	39,18	39,02
Desv.Est.		0,11	0,46	0,44	0,35	0,04

REGISTRO DE LAS VARIABLES MEDIDAS POR ANIMAL

VACUNACIÓN

Grupo mixto bovino

TEMPERATURA RECTAL

Días posvacunación		17	24	31	38	45
Animal N°	147 V	38,6	39	39	39,4	39,2
	202 A	38,4	39,6	39,6	39	38,9
	150 N	38,9	39,1	39,1	39,5	39,3
	311 N	39,4	39,2	39,2	40,1	39
	257 A	38,5	38,5	38,5	39,4	38,8
	206 A	39,5	39,5	39,5	39,7	39,1
	3A	38,5	39	39	39,3	39,2
	259 A	39,6	39,4	39,4	39,8	39,7
	125 V	39	39,2	39,2	39,1	39,4
	123 V	39	39,1	39,1	38,9	39,2
Media		38,9	39,2	39,2	39,4	39,2
Desv.Std.		0,44	0,31	0,31	0,37	0,26
Grupo B.bigemina						
Animal N°	122v	38,8	40	40	39,6	39,5
	72v	39,7	38,2	38,2	39,3	39,2
	175a	38,8	38,6	39,6	39	39
	637v	38,6	38,7	38,7	39,1	38,9
	02v	38,9	39,1	39,1	39,2	39,5
Media		38,96	38,92	39,12	39,24	39,22
Desv.Std.		0,43	0,68	0,71	0,23	0,28
Grupo B.bovis						
Animal N°	4A	39,7	38,5	38,5	39,9	39,2
	181A	39,3	38,6	38,6	39	39,1
	2347A	38,5	38,9	38,9	38,6	38,9
	61V	39	39,3	39,3	39,7	38,6
	67V	39	39,1	39,1	39,9	38,9
Media		39,1	38,88	38,88	39,42	38,94
Desv.Std.		0,44	0,33	0,33	0,59	0,23
Grupo mixto fresco						
Animal N°	188A	39,5	38,9	38,9	39,8	39,2
	479A	39,3	39,3	39,3	39,2	39,3
	271A	39,3	39,2	39,2	39,1	38,9
	48A	38,8	39,3	39,3	39,7	39,6
	79V	38,7	38,6	38,6	39,1	39,2
Media		39,12	39,06	39,06	39,38	39,24
Desv.estandar		0,35	0,30	0,30	0,34	0,25
Grupo testigo						
Animal N°	27	38,7	38,6	38,6	39,1	39,5
	57	38,4	38,5	38,5	39,3	39,5
	475	38,8	39,7	39,7	39,2	39,2
	169	39,2	39	39	39,4	39
	71	38,9	39,2	39,2	39	39
Promedio		38,8	39	39	39,2	39,24
Desv.Est.		0,29	0,48	0,48	0,16	0,25

REGISTRO DE LAS VARIABLES MEDIDAS POR ANIMAL

CONFRONTACIÓN
Grupo mixto bovino

TEMPERATURA RECTAL

	0	4	6	8	10
Días posdesafío					
Días posvacunación	54	57	59	61	63
Animal N°					
147 V	39,3	38,5	39	38,6	38,8
202 A	39	38,3	39	38,7	38,3
150 N	39,4	38,8	39,5	39,2	39,3
311 N	40	38,6	39,1	39	38,8
257 A	39,2	40	39,5	39	38,8
206 A	39,4	39,1	39,6	39,4	38,8
3A	39,2	38,9	39	39	38,2
259 A	39,8	38,9	39,4	39,2	38,9
125 V	39,2	38,7	39,3	39,4	40,5
123 V	39	39,2	38,8	38,3	38,7
Media	39,35	38,9	39,22	38,98	38,91
Desv.Std.	0,32	0,47	0,27	0,36	0,64
Grupo B.bigemina					
Animal N°					
122v	39,4	38,9	39,4	39	39
72v	39,2	38,6	39	38,6	38,5
175a	39	39,1	38,8	39	38,7
637v	39	38,4	38,4	38,7	38,1
02v	39,3	38,8	38,9	38,9	38,5
Media	39,18	38,76	38,9	38,84	38,56
Desv.Std.	0,18	0,27	0,36	0,18	0,33
Grupo B.bovis					
Animal N°					
4A	39,6	38,8	39,3	39,4	38,9
181A	39	38,5	39,4	38,6	40,3
2347A	38,7	39,1	39,7	39,2	38,9
61V	38,7	39,2	39,5	39,2	38,6
67V	39,4	38,5	39,4	39	38,6
Media	39,08	38,82	39,46	39,08	39,06
Desv.Std.	0,41	0,33	0,15	0,30	0,71
Grupo mixto fresco					
Animal N°					
188A	39,5	38,9	39,5	39	38,8
479A	39,2	39,1	39,4	39,4	38,8
271A	39	38,5	39,3	39,5	38,8
48A	39,7	39	39	39,3	38,9
79V	39,1	38,6	39,3	38,7	38,7
Media	39,3	38,82	39,3	39,18	38,8
Desv. estandar	0,29	0,26	0,19	0,33	0,07
Grupo testigo					
Animal N°					
27	39,2	39	39	38,7	38,6
57	39,2	38,7	39,3	39	39,2
475	39	39,5	39,3	39	39,1
169	39	39,1	39,1	39,5	39,5
71	39,2	40,9	40	RIP	
Promedio	39,12	39,44	39,34	39,05	39,1
Desv.Est.	0,11	0,86	0,39	0,33	0,37

REGISTRO DE LAS VARIABLES MEDIDAS POR ANIMAL

CONFRONTACIÓN Grupo mixto bovino

TEMPERATURA RECTAL

		12	14	16	18
Días posdesafío		12	14	16	18
Días posvacunación		65	67	69	71
Animal N°	147 V	38,6	38,7	39,2	39
	202 A	38,7	39,1	39	38,5
	150 N	38,8	39,6	39,4	38,9
	311 N	38,5	39,2	38,7	38,7
	257 A	38,7	38,8	38,6	38,9
	206 A	38,7	39,4	39,2	39
	3A	38,5	39,1	39,8	38,5
	259 A	39	39	39,5	39
	125 V	38,4	38,6	38,8	39
	123 V	39	39,4	38,9	39,3
Media		38,69	39,09	39,11	38,88
Desv.Std.		0,20	0,32	0,38	0,25

Grupo *B.bigemina*

Animal N°	122v	39	39,8	39	39,2
	72v	38,7	39,1	39	39,1
	175a	38,2	38,7	39	39,2
	637v	38,5	38,7	38,7	38,7
	02v	38,8	39,3	39,2	39
Media		38,64	39,12	38,98	39,04
Desv.Std.		0,30	0,46	0,18	0,21

Grupo *B.bovis*

Animal N°	4A	38,5	39,5	39	39,4
	181A	38,6	38,8	38,5	39
	2347A	38,6	39,5	39	38,7
	61V	38,6	38,9	39	39,9
	67V	40	39,3	39,4	38,8
Media		38,86	39,2	38,98	39,16
Desv.Std.		0,64	0,33	0,32	0,49

Grupo mixto fresco

Animal N°	188A	38,5	39,6	39,2	39,2
	479A	38,8	39,7	39	39,4
	271A	38,7	39	39,2	39,1
	48A	38	40,5	39,5	39,6
	79V	39	38,8	38,8	39
Media		38,6	39,52	39,14	39,26
Desv.estandar		0,38	0,67	0,26	0,24

Grupo testigo

Animal N°	27	40,9	39,2	38,6	38,7
	57	39,7	38,5	39	39,8
	475	39,8	39,1	39	39,2
	169	39	39,7	39,4	39,1
	71				
Promedio		39,85	39,13	39	39,2
Desv.Est.		0,79	0,49	0,33	0,45

REGISTRO DE LAS VARIABLES MEDIDAS POR ANIMAL

VACUNACIÓN

Grupo mixto bovino

% DE HEMATOCRITO

Días posvacunación

Animal N°

	0	4	6	8	10
147 V	30	29	24	22	24
202 A	37	28	28	26	30
150 N	34	29	25	24	27
311 N	29	30	24	24	25
257 A	38	38	31	31	34
206 A	36	31	27	26	27
3A	34	30	27	26	30
259 A	32	39	25	24	23
125 V	32	30	25	22	20
123 V	28	28	24	24	25

Media

Desv.Est.

33	31,2	26	24,9	26,5
3,40	3,97	2,26	2,60	4,03

Grupo *B.bigemina*

Animal N°

122V	37	36	24	30	32
72V	32	32	30	28	32
175A	29	28	27	25	27
637V	37	32	30	28	30
02V	33	36	30	29	32

Media

Desv.Est

33,6	32,8	28,2	28	30,6
3,44	3,35	2,68	1,87	2,19

Grupo *B.bovis*

Animal N°

4A	32	34	27	27	26
181A	38	38	30	25	28
2347A	39	31	28	28	29
61V	29	31	23	20	26
67V	32	28	25	23	26

Media

Desv.est

34	32,4	26,6	24,6	27
4,30	3,78	2,70	3,21	1,41

Grupo mixto fresco

Animal N°

188A	36	33	27	24	25
479A	36	38	28	33	29
271Az	39	35	29	28	28
48A	40	35	30	30	29
79V	34	31	25	22	29

Media

Desv.Est

37	34,4	27,8	27,4	28
2,45	2,61	1,92	4,45	1,73

Grupo testigo

Animal N°

27	34	34	32	31	32
57	30	30	31	29	32
475	38	39	29	34	33
169	39	38	31	30	35
71	33	30	26	26	29

Media

Desv.Est.

34,8	34,2	29,8	30	32,2
3,70	4,27	2,39	2,92	2,17

REGISTRO DE LAS VARIABLES MEDIDAS POR ANIMAL

VACUNACIÓN

Grupo mixto bovino

% DE HEMATOCRITO

Días posvacunación		17	24	31	38	45
Animal N°	147 V	29	27	26	37	31
	202 A	30	30	30	31	32
	150 N	35	39	32	32	34
	311 N	28	29	26	27	29
	257 A	37	41	39	43	42
	206 A	27	30	30	30	28
	3A	27	32	32	35	33
	259 A	27	31	27	26	28
	125 V	28	27	26	30	30
	123 V	27	25	24	28	31
Media		29,5	31,1	29,2	31,9	31,8
Desv.Est.		3,60	5,15	4,42	5,17	4,10
Grupo B.bigemina						
Animal N°	122V	33	31	37	40	39
	72V	31	29	31	32	32
	175A	28	28	28	30	30
	637V	32	35	31	35	33
	02V	32	31	32	32	32
Media		31,2	30,8	31,8	33,8	33,2
Desv.Est		1,92	2,68	3,27	3,90	3,42
Grupo B.bovis						
Animal N°	4A	31	29	29	32	31
	181A	32	37	31	32	34
	2347A	30	31	32	32	33
	61V	30	28	27	30	34
	67V	30	30	29	32	28
Media		30,6	31	29,6	31,6	32
Desv.est		0,89	3,54	1,95	0,89	2,55
Grupo mixto fresco						
Animal N°	188A	33	33	33	33	33
	479A	38	36	32	38	37
	271Az	35	34	32	32	37
	48A	35	33	33	39	34
	79V	30	37	31	34	32
Media		34,2	34,6	32,2	35,2	34,6
Desv.Est		2,95	1,82	0,84	3,11	2,30
Grupo testigo						
Animal N°	27	31	32	32	34	41
	57	32	31	30	30	32
	475	32	31	29	35	39
	169	37	42	36	43	42
	71	31	28	29	28	30
Media		32,6	32,8	31,2	34	36,8
Desv.Est.		2,51	5,36	2,95	5,79	5,45

REGISTRO DE LAS VARIABLES MEDIDAS POR ANIMAL

CONFRONTACIÓN

Grupo mixto bovino

% DE HEMATOCRITO

		0	4	6	8	10
Días posdesafío		54	57	59	61	63
Días posvacunación		31	26	25	25	26
Animal N°	147 V	31	26	25	25	26
	202 A	35	33	25	29	28
	150 N	35	30	30	29	28
	311 N	31	27	27	26	24
	257 A	39	35	33	34	32
	206 A	31	30	29	27	26
	3A	32	29	27	29	29
	259 A	28	28	25	30	26
	125 V	30	27	28	28	25
	123 V	30	28	25	24	24
Media		32,2	29,3	27,4	28,1	26,8
Desv.Est.		3,22	2,83	2,67	2,85	2,49
Grupo B.bigemina						
Animal N°	122V	40	28	36	38	40
	72V	31	29	28	26	27
	175A	33	31	27	26	26
	637V	32	29	27	28	28
	02V	33	34	29	30	32
Media		33,8	30,2	29,4	29,6	30,6
Desv.Est.		3,56	2,39	3,78	4,98	5,73
Grupo B.bovis						
Animal N°	4A	32	29	28	27	27
	181A	39	29	26	30	27
	2347A	34	32	27	27	25
	61V	32	30	26	27	26
	67V	28	28	26	28	27
Media		33	29,6	26,6	27,8	26,4
Desv.est		4,00	1,52	0,89	1,30	0,89
Grupo mixto fresco						
Animal N°	188A	35	32	29	26	32
	479A	35	33	31	27	30
	271Az	40	35	30	27	29
	48A	37	32	30	30	27
	79V	31	29	30	26	24
Media		35,6	32,2	30	27,2	28,4
Desv.Est		3,29	2,17	0,71	1,64	3,05
Grupo testigo						
Animal N°	27	33	22	19	24	18
	57	30	30	25	23	20
	475	30	28	24	27	23
	169	36	32	22	25	21
	71	32	27	14	RIP	
Media		32,2	27,8	20,8	24,75	20,5
Desv.Est.		2,49	3,77	4,44	1,71	2,08

CONFRONTACIÓN
Grupo mixto bovino

% DE HEMATOCRITO

Días posdesafío		12	14	16	18
Días posvacunación		65	67	69	71
Animal N°	147 V	26	31	29	26
	202 A	30	35	33	31
	150 N	30	35	30	32
	311 N	27	31	26	26
	257 A	30	39	33	37
	206 A	27	31	28	29
	3A	27	32	27	27
	259 A	25	28	30	31
	125 V	23	30	28	27
	123 V	25	30	26	26
Media		27	32,2	29	29,2
Desv.Est.		2,40	3,22	2,54	3,58
Grupo B.bigemina					
Animal N°	122V	40	37	38	43
	72V	29	27	29	28
	175A	27	28	28	30
	637V	28	29	30	31
	02V	34	29	31	32
Media		31,6	30	31,2	32,8
Desv.Est.		5,41	4,00	3,96	5,89
Grupo B.bovis					
Animal N°	4A	28	27	30	29
	181A	27	26	28	30
	2347A	28	25	28	27
	61V	27	25	27	28
	67V	27	25	26	26
Media		27,4	25,6	27,8	28
Desv.est		0,55	0,89	1,48	1,58
Grupo mixto fresco					
Animal N°	188A	28	26	30	30
	479A	30	31	31	31
	271Az	32	31	28	30
	48A	30	31	26	30
	79V	26	29	25	27
Media		29,2	29,6	28	29,6
Desv.Est		2,28	2,19	2,55	1,52
Grupo testigo					
Animal N°	27	19	18	27	30
	57	18	18	21	21
	475	23	21	30	29
	169	21	21	31	27
	71				
Media		20,25	19,5	27,25	26,75
Desv.Est.		2,22	1,73	4,50	4,03