

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 una área endémica

Protection against bovine babesiosis with a mixed *in vitro* culture derived *B. bovis* and *B. bigemina* vaccine under a field challenge. II Immunization in an endemic area

Germinal Jorge Cantó Alarcón^{ab}, Edmundo Enrique Rojas Ramírez^c, Jesús Antonio Álvarez Martínez^c, Juan Alberto Ramos Aragón^c, Juan Joel Mosqueda Gualito^c, Carlos Agustín Vega y Murguía^c, Julio Vicente Figueroa Millán^c

RESUMEN

Se evaluó la protección de un inmunógeno bivalente de *B. bovis* y *B. bigemina* derivado de cultivo *in vitro*. Se utilizaron 20 toretes *Bos taurus* mayores de 18 meses provenientes de una área libre de garrapatas *Boophilus*, y se trasladaron a una zona endémica, formándose en forma aleatoria dos grupos de 10 animales. Una semana posterior a su llegada, 10 de los animales se vacunaron por vía intramuscular a una dosis de 1×10^7 eritrocitos infectados de cada especie del parásito; los 10 restantes (testigo) recibieron una dosis similar de eritrocitos no infectados. Los bovinos permanecieron desde el día de su llegada hasta el día 21 posvacunación, en un corral libre de garrapatas. Doce días posteriores a la introducción al potrero (PIP), nueve de los animales del grupo testigo presentaron muy mala condición corporal y severos signos de babesiosis, como temperatura rectal (TR) superior a los 41 °C, caída del volumen celular aglomerado (VCA) del 46 % y presencia de ambas especies del parásito en frotis sanguíneos, por lo que tuvieron que ser tratados para evitar su muerte. En contraste, y a pesar de presentar una TR de 40.4 °C y un decremento en el VCA de 40.7 %, la condición corporal de los animales vacunados fue satisfactoria, con excepción de tres bovinos, que tuvieron que recibir tratamiento el día 22 PIP para evitar que muriesen. Se concluye que la vacuna mixta de *B. bovis* y *B. bigemina* produjo un 70 % de protección a bovinos recién introducidos en una zona endémica.

PALABRAS CLAVE: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, Inmunización, Zona endémica.

ABSTRACT

The protection conferred by a combined *in vitro* culture-derived *Babesia bovis* and *B. bigemina* vaccine to susceptible *Bos taurus* bulls in a babesiosis endemic area was evaluated. Participating animals were over 18 months of age coming from a tick free area. Twenty animals were allocated at random into two groups of 10 animals each and taken to a tick endemic area. One week after arrival, 10 of them were vaccinated i.m. with an experimental *Babesia* spp. immunogen at a dose of 1×10^7 infected erythrocytes of each species. The 10 control animals were inoculated with uninfected red blood cells. All the animals were kept from the day of arrival until d 21 post vaccination in a pen free of *Boophilus* ticks and then released to a tick infested paddock where they remained until study's completion. Twelve days after the start of the tick challenge, nine of the control animals presented poor physical condition, and also severe signs of babesiosis *i.e.* rectal temperature (RT) of more than 41 °C, a packed cell volume (PCV) drop of 46 % and presence of both species of *Babesia* in blood stained smears and had to be treated in order to avert their death. On the other hand, although the vaccinated animals presented a RT of 40.4 °C and a PCV drop of 40.7 %, only three animals showed poor physical condition and had to be treated on d 22 post introduction to the infected paddock. It can be concluded that a combined *B. bovis* and *B. bigemina* vaccine is able to confer a 70 % protection to bovines introduced to *Babesia* infected areas.

KEY WORDS: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, Immunization, Endemic area.

Recibido el 5 de marzo de 2003 y aceptado para su publicación el 10 de abril de 2003.

a Centro Nacional de Investigaciones en Fisiología y Mejoramiento Animal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Km 1 Carretera a Colón, Ajuchitlán, Querétaro, México. gcanto99@prodigy.net-mx. Correspondencia y solicitud de separatas.

b Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Querétaro.

c Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

Un componente importante en el mejoramiento del ganado en los países en desarrollo, aunado a una buena nutrición y manejo adecuado, es el control de las enfermedades de los animales⁽¹⁾. La babesiosis bovina es una de las mayores restricciones para lograr la producción de ganado eficiente en los países menos desarrollados, localizados en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Las pérdidas directas producidas anualmente por el complejo garrapata-babesia-anaplasma, se han estimado en dos mil millones de dólares⁽²⁾; además de las pérdidas indirectas de un buen número de productores de zonas libres de la enfermedad, al no poder comercializar ganado a zonas endémicas de babesiosis⁽³⁾.

Dadas las características de aparición, en la mayoría de los casos aguda, se han redoblado esfuerzos para desarrollar métodos o productos que permitan prevenir la enfermedad. Aplicando la tecnología de cultivo *in vitro* del parásito, incluyendo la clonación del mismo^(4,5), se obtuvieron poblaciones homogéneas que han sido identificadas como atenuadas, y que han permitido su uso como vacuna, al presentar una reducida virulencia, así como una buena capacidad para inducir una respuesta inmune capaz de resistir la confrontación heteróloga en condiciones controladas o de campo^(6,7,8,9).

Los resultados obtenidos en estos estudios presentaron en común que la vacunación se realizó en una zona templada, libre de la enfermedad, y que la confrontación se produjo por lo menos dos meses después de que los bovinos fueron inmunizados. Esto creó la inquietud de probar la efectividad del inmunógeno bajo condiciones más propicias para el productor y que sin embargo, son de mayor estrés para los animales. El presente estudio tuvo como objetivo, el conocer la posibilidad de realizar la vacunación de animales provenientes de una zona libre al llegar estos a la zona endémica; además de realizar la confrontación en un lapso menor de tiempo, con el fin de producir un ahorro importante al introductor de ganado especializado.

El estudio se realizó en el Campo Experimental "La Posta", localizado en el municipio de Paso del Toro, en Veracruz, área endémica de la enfermedad.

An important component in cattle improvement in developing countries is, besides good nutrition and adequate management, disease control⁽¹⁾. Bovine babesiosis is one of the major constraints to obtain an efficient livestock production in less developed countries, which are mainly located in the tropics and subtropics. Annual direct losses due to the babesiosis - anaplasmosis - tick complex are estimated at \$US 2 bn⁽²⁾ to which can be added indirect losses caused to producers from tick free areas who are unable to sell cattle to the endemic area⁽³⁾.

Owing to the special characteristics of this disease's onset, very acute in most cases, intense efforts have been made to develop methods or products able to control it. Homogenous populations identified as attenuated have been obtained through the *in vitro* culture technique, including clonation of the parasite^(4,5), which can be used as vaccines due to their reduced virulence and to their capacity to induce an immune response capable of resisting an heterologous confrontation in controlled and field conditions^(6,7,8,9).

Results obtained in these studies showed that vaccination was carried out in temperate tick free areas, and that confrontation took place at least two months after immunization. This fact gave rise to an interest to test the immunogen's effectiveness under other conditions of higher stress for animals and more favorable to producers in tick endemic areas. The present study was carried out with the object of inquire into the possibility of vaccinating animals coming from tick free areas at their arrival to a endemic tick area and besides to perform a confrontation in a shorter time frame, to furnish savings to producers who introduce improved cattle.

This study was carried out at INIFAP's "La Posta" Experimental Station, located in the Paso del Toro municipality in the State of Veracruz, Mexico, in a endemic tick area. Twenty Charolais bulls coming from a *Boophilus* spp. tick free area in the State of Sonora, Mexico, were used. These animals tested negative to *Babesia* spp and *Anaplasma marginale* antibodies through indirect immunofluorescence (IFI) and immunoenzymatic assay (ELISA) and

Se utilizaron 20 toretes Charolais, mayores de 18 meses, provenientes de una región libre de garrapatas *Boophilus* spp. en el estado de Sonora, México. Se comprobó mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI)⁽¹⁰⁾ y ensayo inmunoenzimático (ELISA)⁽¹¹⁾, que los animales se encontraban libres de anticuerpos contra *Babesia* spp. y *Anaplasma marginale* y fueron certificados como libres de *Brucella abortus* y *Mycobacterium bovis*. Como agente inmunizante se utilizó una mezcla de la clona BIS de *Babesia bigemina*⁽⁴⁾ y de la cepa BOR de *Babesia bovis*⁽⁵⁾.

El estudio se diseñó de tal forma que fuera posible evaluar la capacidad inmunoprotectora de la vacuna mixta, una vez que los animales experimentales fuesen vacunados en la zona endémica en condiciones de corral *i.e.*, sin tener acceso a potreros infestados con *Boophilus* spp., y liberados a dichos potreros 21 días posteriores a la vacunación. En forma aleatoria se formaron dos grupos de 10 bovinos cada uno; el primer grupo recibió el inmunógeno mixto por vía intramuscular, a una dosis de 1×10^7 eritrocitos infectados de cada especie del parásito proveniente del cultivo *in vitro*, y el segundo grupo permaneció como testigo, recibiendo una dosis de 2×10^7 eritrocitos normales. Los animales permanecieron en los potreros infestados por un lapso de 35 días, sin recibir tratamiento acaricida.

Diariamente y durante los 35 días en los que los animales permanecieron en pastoreo, se registraron las variables de temperatura rectal (TR), volumen celular aglomerado (VCA) mediante la técnica de microhematocrito y porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) a partir de frotis delgados teñidos con colorante de Giemsa^(6,7). Así mismo, semanalmente se obtuvieron muestras de sangre en tubos sin anticoagulante, y con el suero resultante se determinó la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito mediante la técnica de IFI.

La decisión para tratar a un animal con objeto de evitar su muerte se basó en el cumplimiento de varios criterios, tanto de laboratorio como subjetivos: disminución del VCA por arriba del 40 %, temperatura superior a los 40 °C por tres días

were certified free of *Brucella abortus* and *Mycobacterium bovis*. As immunizing agent a mixture of a *Babesia bigemina* BIS strain⁽⁴⁾ and of a *Babesia bovis* BOR clone was used⁽⁵⁾.

This study's design was such that it was possible to assess immunoprotection conferred by this combined vaccine, once the experimental animals were inoculated in tick free pens in an endemic area and released to tick infected paddocks 21 days later. The 20 bulls were allocated at random into two groups of 10 animals each. The first group was inoculated i.m. with 1×10^7 infected erythrocytes of each parasite species coming from *in vitro* cultures. The second group acted as control and was inoculated i.m. with 2×10^7 normal erythrocytes. All animals grazed infected paddocks for 35 d and no anti tick treatment was provided.

Daily during the 35 d grazing period, rectal temperature (RT), packed cell volume (PCV) through the microhematocrit technique and parasitized erythrocyte percentage (PEP) in blood smears stained with Giemsa^(6,7), were taken. Besides, blood samples in tubes without anticoagulants were obtained and presence of specific antibodies against the parasites was determined in blood serum through IFI.

The decision when to give treatment to an animal so as to prevent its death was based on several criteria, subjective as well as on laboratory data, *e.g.* PCV drop of more than 40 %, RT of more than 40 °C on three consecutive days, and other babesiosis signs as apathy, anorexia, dehydration, pallid mucous membranes and lack of coordination.

After inoculation, a 7.5 d incubation period was taken into account. RT maximum average in the vaccinated group was 40.5 °C, being 39.5 °C for 2 d, while RT maximum average was 39.8 °C only on inoculation day in the control group. Regarding PCV, an average 32.3 % drop in the vaccinated group was observed *vs* 17.7 % for the control group (Table 1). All immunized animals showed *B. bigemina* in blood smears, but *B. bovis* in only five of them. Parasitemias were in all cases less than 1.0 % and lasted an average 3.4 d

Cuadro 1. Valores obtenidos en las diferentes variables registradas de los dos grupos experimentales durante la inmunización y confrontación en zona endémica de babesiosis (Medias±DE)

Table 1. Values obtained in different variables recorded in both experimental groups during immunization and confrontation in a babesiosis endemic area (Means±SD)

	Immunized	Control	Immunized Confronted	Control Confronted
Animals per group	10	10	10	10
Incubation period, days	7.5± 2.5	-	11 ± 3.8	9.7± 1.4
Maximum temperature, °C	40.5 ± 0.7	39.8 ± 0.2	40.4 ± 0.8	41.1± 0.6
Temperature > 40.5 °C, days	0	0	1.5 ± 2.1	3.0± 1.5
PCV, Maximum reduction, %	32.3 ± 8.8	17.7 ± 4.9	40.7 ± 7.5	46.1± 7.7
Animals positive to <i>B. bigemina</i> *	10	0	10	10
Animals positive to <i>B. bovis</i> *	5	0	10	10
Parasithemia <i>B. bigemina</i> , days	3.4 ± 0.5	0	5.3 ± 3.5	1.0 ± 1.1
Parasithemia <i>B. bovis</i> , days	1.2 ± 0.5	0	2.1 ± 2.7	3.2 ± 1.7
Chemotherapy, No. animals	0	0	3	10

PCV= packed cell volume

* Blood smears

consecutivos, signos de babesiosis tales como apatía, recumbencia prolongada, anorexia, deshidratación, mucosas pálidas e incoordinación.

Posterior a la inmunización, se observó un periodo de incubación de 7.5 días. La TR máxima promedio en los animales del grupo vacunado fue de 40.5 °C, persistiendo por arriba de los 39.5 °C por un periodo de dos días; mientras que en el grupo testigo, la TR máxima promedio fue de 39.8 °C sólo el día de la inoculación. En cuanto al VCA, se observó un decremento promedio de 32.3 % para los animales del grupo inmunizado, contra un 17.7 % para los bovinos del grupo testigo (Cuadro 1). Todos los animales inmunizados presentaron *B. bigemina* en los frotis sanguíneos; sin embargo, *B. bovis* sólo se pudo apreciar en cinco de los bovinos inoculados. Las parasitemias fueron en todos los casos menores al 1.0 %, y tuvieron una duración promedio de 3.4 días para *B. bigemina* y de 1.2 días para *B. bovis*. En los frotis de los animales testigo no se observó ningún parásito.

A la confrontación, 21 días posteriores a la inmunización, se observó que todos los animales, incluyendo a los del grupo testigo que no recibieron

for *B. bigemina* and 1.2 for *B. bovis*. No parasites were seen in control animal's blood smears.

On confrontation, 21 d after inoculation, all animals were seen to be infected with both parasite species through *Boophilus* spp. ticks and average incubation periods being 11 and 9.7 d for animals in the immunized and control groups respectively. Average amounts of adult ticks recovered from surviving animals, having been treated against hemoparasites or not were 195 for vaccinated animals and 155 for those in the control group. Average maximum RT was 40 °C in the immunized and 41.1 °C in the control groups respectively, significant differences ($P < 0.05$) were observed from d 8 to d 12 post introduction to paddock PIP on which treatment was provided to animals in the control group (Figure 1).

Relative to PCV, significant differences ($P < 0.05$) from d 8 to d 12 PIP were also observed, average maximum drop per group recorded in vaccinated animals was 39 %, while 43.6 % was recorded in the control group, from d 12 to d 20 PIP (Figure 2). Parasitemias found were always less than 1.0 % for both protozoan species and lasted 5.3 d and

el protozooario a la vacunación, fueron infectados con las dos especies del parásito a través de garrapatas del género *Boophilus*, registrándose periodos de incubación promedio de 11 y 9.7 días para los animales de los grupos inmunizado y testigo respectivamente. El número promedio de garrapatas adultas recuperadas de los animales que sobrevivieron, fuesen estos tratados o no contra los hemoparásitos, fue de 195 para los animales vacunados y 155 para los animales testigo. Las temperaturas máximas promedio registradas fueron de 40.5 °C para el grupo inmunizado y de 41.1 °C para el grupo testigo, observándose diferencias ($P < 0.05$) a partir del día 8 hasta el día 12 posintroducción al potrero (PIP) en que se realizó el tratamiento de los animales del grupo testigo (Figura 1).

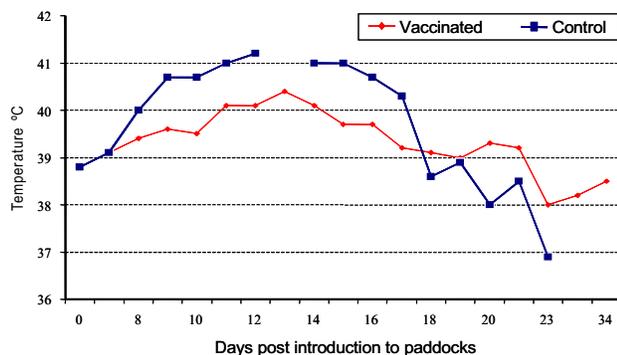
En relación a VCA, también se observaron diferencias ($P < 0.05$) a partir del día 8 y hasta el 12 PIP; la reducción máxima promedio por grupo registrada en los animales vacunados fue de 39.5 %, mientras que en el grupo testigo, esta fue de 43.6 %, observándose éstas los días 12 y 20 PIP respectivamente (Figura 2). Las parasitemias

1.0 d for *B. bigemina* and 2.1 d and 3.2 d for *B. bovis* in the immunized and control groups, respectively (Table 1).

In the course of the experiment, 13 animals received specific treatment against babesiosis to prevent their death, three from the immunized group and all 10 in the control group. Even with treatment, one animal from the immunized group and two from the control group died from babesiosis. Treatment started on d 12 PIP in nine animals from the control group when they showed very poor physical conditions and clear signs of the disease, *i.e.* more than 40.6 °C average RT, 16 % PCV, anorexia and prostration. One animal in this group showed atypical behavior, and even with presence of both parasite species from d 10 PIP on and a RT of over 40.0 °C from d 8 PIP on, it was not until d 18 PIP that PCV started to drop, reaching 23 % on d 24 PIP (Figure 2), when he died, even though being treated specifically. The three bovines from the immunized group who deserved treatment, were treated on d 22 PIP. Starting on d 14 PIP, presence of *Anaplasma marginale* was detected in blood

Figura 1. Valores promedio de temperatura rectal en animales previamente inmunizados con *Babesia* spp. y testigo confrontados en forma natural

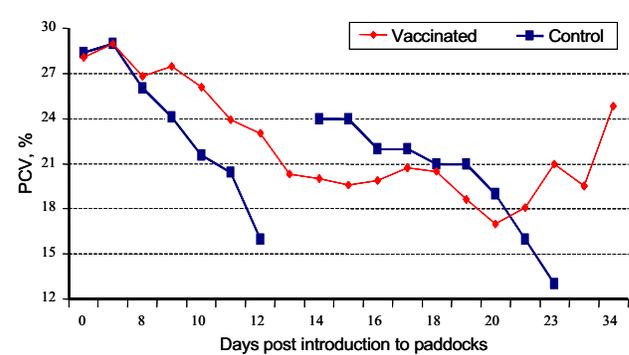
Figure 1. Average rectal temperature readings in animals previously immunized with *Babesia* spp. and control confronted in natural conditions



On d 12, nine animals from the control group were treated for babesiosis; values from d 14 on, come from the one surviving animal. Three animals in the vaccinated group were treated on d 21, values from d 23 on, come from the 7 surviving animals.

Figura 2. Valores promedio del porcentaje del volumen celular aglomerado en animales previamente inmunizados con *Babesia* spp. y testigo confrontados en forma natural

Figure 2. Packed cell volume percentage average values in animals previously immunized with *Babesia* spp. and control confronted in natural conditions



On d 12, nine animals from the control group were treated for babesiosis; values from d 14 on, come from the one surviving animal. Three animals in the vaccinated group were treated on d 21, values from d 23 on, come from the 7 surviving animals.

encontradas fueron siempre menores del 1.0 % para ambas especies del protozooario y tuvieron una duración de 5.3 días y 1.0 días para *B. bigemina* y de 2.1 y 3.2 días para *B. bovis* en los bovinos inmunizados y testigo respectivamente (Cuadro 1).

Durante el experimento, 13 animales recibieron tratamiento específico contra babesiosis para tratar de evitar su muerte, tres del grupo inmunizado y los 10 bovinos del grupo testigo. No obstante la medicación, un animal del grupo vacunado y dos del grupo testigo murieron de babesiosis. El tratamiento se efectuó el día 12 PIP en nueve de los animales testigo cuando presentaban una muy mala condición corporal y signos claros de la enfermedad *ie.* un valor promedio de TR de 40.6 °C, VCA de 16 %, anorexia y postración. Un animal de este grupo mostró un comportamiento atípico y aún con la presencia de ambas especies del parásito desde el día 10 PIP y TR superior a los 40.0 °C a partir del día 8 PIP, no fue sino hasta el día 18 PIP en que el VCA comenzó a decrecer, llegando al 13 % el día 24 PIP (Figura 2), día en el que murió a pesar del tratamiento específico. Los tres bovinos del grupo testigo que ameritaron tratamiento, lo recibieron el día 22 PIP. A partir del día 14 PIP, se comenzó a detectar la presencia de *Anaplasma marginale* en los frotis sanguíneos, por lo que cuatro animales del grupo vacunado y uno del grupo testigo recibieron tratamiento con tetraciclinas.

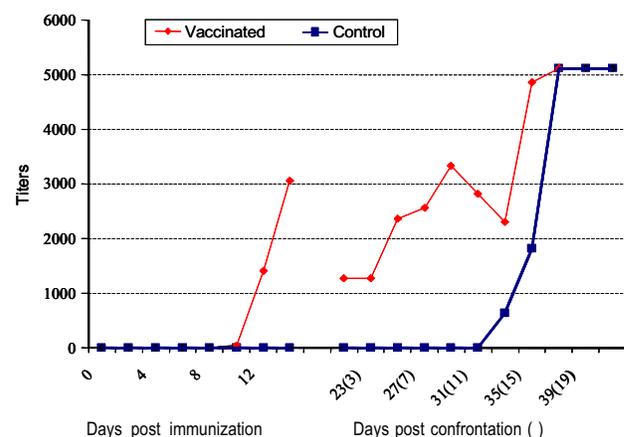
En relación al título de anticuerpos, se observó que para el día 14 posvacunación todos los animales inmunizados seroconvirtieron, presentando títulos promedio de 1:3050. Al inicio de la confrontación, el título promedio se encontraba en 1:1200; durante este periodo se detectó una respuesta secundaria por parte de los animales vacunados a partir del día 5 PIP, llegando a títulos de 1:5120 para el día 15 PIP, manteniéndose en ese nivel hasta el final del estudio. En los animales del grupo testigo, nueve de ellos tratados el día 12 PIP y uno sin tratamiento, se comenzaron a detectar títulos de anticuerpos específicos hasta el día 13 PIP, presentando títulos de 1:5120 para el día 15 PIP (Figura 3).

smears, and owing to this, four animals in the vaccinated group and one from control were treated with tetracyclines. Relative to antibodies, by d 14 post vaccination, all immunized animals seroconverted, showing 1:3050 average titers. At confrontation's beginning, average titer was 1:1200, and in this period a secondary response was detected in vaccinated animals from d 5 PIP on, reaching 1:5120 on d 15 PIP, and remaining at that level till study's completion. In the control group animals, nine of them treated on d 12 PIP and one without treatment, specific antibody titers were detected from d 13 PIP on, showing 1:5120 titers on d 15 PIP (Figure 3).

One of the main problems that can arise when using live hemoparasite vaccines to immunize bovines is that they can produce intensified reactions and cause disease, therefore needing to treat those animals to avert their death⁽¹²⁾. In the present study, however, no animals showed themselves clinically ill, nevertheless being taken from an arid to a

Figura 3. Títulos promedio por grupo de anticuerpos contra *Babesia* spp. mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta

Figure 3. Average *Babesia* spp. antibody titers obtained through indirect immunofluorescence



Animals immunized with *B. bovis* and *B. bigemina* (d 0) and control confronted naturally (d 21). Nine animals from the control group were treated on d 12 post confrontation, however, titers are the average for all 10 animals.

Uno de los principales problemas al utilizar vacunas hemoparasíticas vivas para inmunizar bovinos, es que ellas mismas pueden producir reacciones severas que causen enfermedad en los animales, requiriendo tratamiento específico para evitar la muerte⁽¹²⁾. En el presente estudio, no obstante los factores de estrés ocasionados por la introducción de animales provenientes de una zona árida a una zona tropical, ninguno de los animales se mostró clínicamente enfermo, además que los promedios en el incremento de la TR, decremento en el VCA y títulos de anticuerpos específicos contra el parásito durante el periodo de vacunación, fueron similares a lo observado anteriormente en estudios realizados en zonas templadas, bajo condiciones controladas, para animales de la región donde se realizó la inmunización⁽⁸⁾; así como para animales provenientes de otra zona geográfica⁽¹³⁾. Estos resultados indican la baja patogenicidad de las poblaciones de *Babesia* utilizadas como inmunógeno.

A la confrontación, 21 días PIP, se observó que la transmisión de los hemoparásitos fue casi inmediata, detectándose la presencia de ambas especies del protozoario en frotis sanguíneos a partir del día 10 PIP para *B. bovis* y a partir del día 14 en el caso de *B. bigemina*.

En relación al promedio de TR, se observó un rápido aumento por arriba de los 40.5 °C en los animales del grupo testigo a partir del día 8 PIP, incrementándose hasta los 41.1 °C para el día 12 PIP, día en que nueve animales de ese grupo tuvieron que recibir tratamiento para tratar de evitar su muerte; mientras que el promedio de TR en los animales del grupo vacunado nunca fue superior a los 40.4 °C. En cuanto a la reducción en el VCA, se observó un máximo decremento de 46.1 y 40.7 % para los animales testigo y vacunados respectivamente. Los resultados en el incremento de TR como en el descenso del VCA, son superiores a lo observado en un estudio realizado con el mismo inmunógeno en condiciones de altiplano y condiciones controladas⁽⁸⁾; así como en otro donde la vacunación se realizó en el altiplano y la confrontación en condiciones naturales a través de garrapatas⁽¹³⁾, lo que podría llevar a pensar que la

tropical area with all the stress factors associated to that event. Average RT increments, PCV drops and specific antibody titers in the vaccination period, were similar to those observed previously in studies carried out in temperate zones under controlled conditions, in animals from the area where immunization took place⁽⁸⁾, as well as for animals coming from other geographic areas⁽¹³⁾. These results indicate a low pathogenicity in *Babesia* populations used as immunogens.

On confrontation, 21 d post PIP, hemoparasite transmission was almost immediate in accordance with observations, as both protozoan species were detected in blood smears from d 10 PIP on for *B. bovis* and from d 14 on for *B. bigemina*.

Relative to RT averages, a rapid increase over 40.5 °C was observed in animals from the control group from d 8 PIP on, increasing to 41.1 °C on d 12 PIP, on which day nine animals in that group were treated to prevent their death, while the RT average for animals in the vaccinated group was never more than 40.4 °C. In relation to PCV drop, a maximum decrease of 46.1 % and 40.7 % for animals in the control and immunized groups respectively was recorded. Results in RT increase and PCV drop are greater than those observed in a study carried out with the same immunogen in the highlands under controlled conditions⁽⁸⁾, as well as in another in which vaccination was performed in natural conditions through ticks⁽¹³⁾, which could lead to suspect that confrontation in this case was greater due to the extreme stress to which animals were subject and to the a later fall in immune system response, or maybe to a combination of both.

Recent studies in which vaccination was carried out in controlled conditions in the highlands, and field confrontation was performed in the same paddock in Paso del Toro, Ver., Mexico, on d 74 post vaccination, showed a 100 % protection in vaccinated animals⁽¹³⁾, which could indicate that healthy carrier animals of the parasite, increase with time their capacity to produce an adequate immune response to the challenge.

As for the observed immune response, antibody production and titers in vaccination and confrontation,

confrontación en esta ocasión fue superior; que la gran condición de estrés a la que los animales fueron sometidos produjo una baja en la respuesta del sistema inmune, o bien una combinación de ambas.

Estudios recientes en los que la vacunación se llevó a cabo en condiciones controladas en el altiplano y la confrontación de campo se realizó en el mismo potrero en Paso del Toro, Ver., 74 días posteriores a la vacunación, indicaron una protección del 100 % en los animales vacunados⁽¹³⁾, lo que podría indicar también que los animales portadores sanos del parásito, incrementan con el tiempo su capacidad para producir una respuesta inmune adecuada contra el desafío.

En cuanto a la respuesta inmune observada, la producción de anticuerpos y las diferencias en los títulos observados durante la vacunación y la confrontación, no pueden considerarse determinantes en términos de protección, significando probablemente sólo el grado de exposición a *Babesia*; sin embargo, se conoce que animales a los que se les administró sueros inmunes contra el parásito, son capaces de resistir la confrontación con aislados homogéneos⁽¹⁴⁾. Brown y Palmer⁽¹⁵⁾, indican que únicamente los animales que sobrevivieron una infección aguda; o aquéllos que fueron inmunizados adecuadamente, van a poder resistir una confrontación posterior. Asimismo, se menciona que los anticuerpos producidos, principalmente del isotipo IgG2, podrían actuar como opsoninas para los macrófagos activados^(14,15). Lo anterior indica la necesidad de determinar, en posteriores estudios, la variación que existe en la afinidad o capacidad opsonizante, e isotipos de los anticuerpos producidos antes y después de los procesos de vacunación.

Los resultados del presente estudio mostraron que la vacuna mixta de *B. bovis* y *B. bigemina* aplicada en condiciones enzoóticas de la enfermedad, produjo un 70 % de protección contra la muerte en animales recién introducidos. Estos resultados son satisfactorios al demostrar que el 100 % de los bovinos hubiesen muerto de no ser por la vacunación. Asimismo, proveen a los ganaderos

these should not be considered as determinant of protection, meaning probably only a degree of exposition to *Babesia*, however, it is a known fact that animals to which anti *Babesia* immune serum has been administered are able to offer resistance to a confrontation with homogenous isolates⁽¹⁴⁾. Brown and Palmer⁽¹⁵⁾ suggest that only animals who survived an acute infection, or those who were adequately immunized will be able to withstand a later confrontation. Besides, it has been mentioned that antibodies, especially those of isotype IgG2, could act as opsonins for activated macrophages^(14,15). All this shows the necessity to determine, in subsequent studies, variation in affinity or opsonizing capacity and isotypes of antibodies produced before and after vaccination.

Results obtained in the present study show that a combined *B. bovis* and *B. bigemina* vaccine administered in enzootic disease conditions, was able to produce a 70 % protection against death in animals recently introduced to tick endemic areas.

ACKNOWLEDGMENTS

We are greatly indebted to Bióloga Carmen Rojas Martínez who provided us with *in vitro* culture attenuated parasites.

End of english version

de las regiones tropicales, de una herramienta más para el control de la enfermedad, en situaciones donde no es posible vacunar y mantener a los animales por algunas semanas en una zona libre de garrapatas *Boophilus*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Bióloga Carmen Rojas Martínez por proveer los parásitos atenuados de cultivo *in vitro*.

LITERATURA CITADA

1. De Castro JJ. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet Parasitol* 1997;71(2,3):77-97.
2. Mullenax CH. Estimated production and dollar loses due to stable enzootic anaplasmosis and babesiosis in the Colombian Llanos. Proceed annual meeting of anaplasmosis research workers. Louisiana USA. 1986:81.
3. McCosker PJ. The global importance of babesiosis. In: Ristic M, Krier JP editors. *Babesiosis*. New York: Academic Press; 1981:1-24.
4. Vega CA, Buening GM, Green TJ, Carson CA. *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am J Vet Res* 1985;48:416-421.
5. Rodríguez SD, Buening GM, Carson CA. Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Infec Immun* 1983;42:15-19.
6. Cantó AGJ, Figueroa MJV, Álvarez MJA, Vega MCA. Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de cultivo *in vitro*. *Téc Pecu Méx* 1996;(3):127-135.
7. Figueroa MJV, Cantó AGJ, Álvarez MJA, Lona GR, Ramos AJA, Vega MCA. Capacidad protectora en bovinos de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro*. *Téc Pecu Méx* 1998;36(2):95-107.
8. Cantó AGJ, Figueroa MJV, Ramos AJA, Mosqueda GJJ, Vega MCA. Evaluación de la capacidad protectora de un inmunógeno fresco combinado de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. *Vet Méx* 1999;30(3):215-219.
9. Cantó AGJ, Ramos AJA, Rojas REE, Vega MCA, Oviedo GV, Figueroa MJV, Álvarez MJA. Evaluación de la inocuidad y protección de un inmunógeno derivado de cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* multiplicado en bovinos. *Téc Pecu Méx* 2002;40(2):127-138.
10. Goldman M, Pipano E, Rosemberg AS. Fluorescent antibody tests for *Babesia bigemina* and *Babesia berbera*. *Res Vet Sci* 1972;13:77-81.
11. Tello M, Álvarez JA, Ramos JA, Aboytes R, Cantó GJ. La prueba de ELISA en el diagnóstico de la anaplasmosis. *Téc Pecu Méx* 1986;52:45-52.
12. Brizuela CM, Ortellado CA, Sanabria E, Torres O, Ortigosa D. The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. *Vet Parasitol* 1998;76:27-41.
13. Cantó AGJ, Álvarez MJA, Rojas REE, Ramos AJA, Mosqueda GJJ, Vega MCA, Figueroa MJV. Protección contra babesiosis bovina con una vacuna mixta de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro*. I. Inmunización en un área libre de la enfermedad y confrontación de campo. *Vet Méx* [en prensa].
14. Mahoney DF. Immune response to babesiosis. In: Morrison WL editor. *The ruminant immune system in health and disease*. Cambridge: Cambridge University Press; 1986:539-545.
15. Brown WC, Palmer GH. Designing blood stage vaccines against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Parasitol Today* 1999;7:275-281.

