

Transmisión de cepas atenuadas de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* por garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Transmissibility of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* attenuated strains by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks

Edmundo E. Rojas Ramírez^a, Juan J. Mosqueda Gualito^b, Jesús A. Álvarez Martínez^a, Rubén Hernández Ortíz^a, Juan A. Ramos Aragón^a, Carmen Rojas Martínez^a, Germinal J. Cantó Alarcón^b, Carlos A. Vega y Murguía^a, Julio V. Figueroa Millán^a

RESUMEN

Para evaluar la transmisión por garrapatas *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) de una clona atenuada de *Babesia bovis* (BOR) y una cepa atenuada de *Babesia bigemina* (BIS), doce bovinos se dividieron en cuatro grupos e infestados de forma escalonada con larvas de *R. microplus* libres de *Babesia* spp. Un becerro de cada grupo se inoculó con 1×10^8 eritrocitos infectados (EI) con BIS, BOR, y cepas virulentas de *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente. Se realizaron dos inoculaciones seriadas adicionales (pases/jeringa) y se colectaron hembras *R. microplus* cuya repleción coincidió con presencia de EI en los bovinos inoculados, y cuya progenie fue utilizada para infestar un grupo de bovinos receptores (pases/garrapata). Los tres pases sucesivos por jeringa evidenciaron EI en los bovinos que recibieron las cepas atenuadas y virulentas de *B. bigemina* y *B. bovis*. Se identificaron quinetos de *Babesia* en garrapatas alimentadas sobre bovinos infectados con cepas virulentas de *B. bigemina* y *B. bovis*. No se identificaron quinetos en garrapatas alimentadas sobre bovinos inoculados con cepas atenuadas. Todos los receptores infestados con progenie de garrapatas alimentadas sobre bovinos infectados con cepas virulentas, resultaron positivos a *Babesia*. Contrariamente, los receptores de garrapatas derivadas de bovinos inoculados con cepas atenuadas resultaron negativos, excepto por los infestados con garrapatas derivadas del tercer pase realizado con BIS y BOR. Las cepas atenuadas podrían conferir un margen de seguridad mayor como inmunógenos, al no ser transmitidas por *R. microplus* y no revertir a la virulencia al menos después de dos pases sucesivos en bovinos.

PALABRAS CLAVE: *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Transmisión, Virulencia.

ABSTRACT

To assess transmissibility of attenuated *Babesia bigemina* (BIS) and *Babesia bovis* (BOR) strains by *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*), 12 steers from a tick-free area were divided in four groups and infested at different intervals with *R. microplus* larvae. One animal from each group was inoculated with 1×10^8 infected erythrocytes (IE) of attenuated BIS, BOR, virulent *B. bigemina*, or *B. bovis* field strains. Two additional serial passages were performed (syringe passages), and engorged female ticks were collected coincident with presence of IE in blood of infected steers. The offspring larvae were utilized to feed upon an additional group of recipient steers (tick passages). All needle passages were successful for inducing infection in steers that received both, the attenuated and field strains. Kinetes were detected in hemolymph of engorged female ticks fed on steers infected with virulent *B. bigemina* and *B. bovis* field strains. However, kinetes were not detected in hemolymph samples from ticks collected from the steers inoculated with the attenuated strains. All recipient steers infested with larvae from ticks that fed on steers infected with virulent strains became *Babesia* positive. By contrast, steers infested with larvae from ticks that fed on animals inoculated with attenuated strains were negative, except for the recipient steer receiving larvae from the third syringe passage of BIS and BOR. These strains could be safer to use as live immunogens in animals, as their virulence and ability to be transmitted by the tick is impaired at least after two blood passages in cattle.

KEYWORDS: *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Transmissibility, Virulence.

Recibido el 3 de diciembre de 2009. Aceptado el 25 de enero de 2011.

^a Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP. Jiutepec, Mor., Apartado Postal 206 CIVAC, Morelos, 62500. Tel: 777/3192850 ext. 139. figueroa.julio@inifap.gob.mx. Correspondencia al último autor.

^b Universidad Autónoma de Querétaro. Campus juriquilla.

INTRODUCCION

La babesiosis bovina causada por *B. bovis* y *B. bigemina* se encuentra distribuida en áreas tropicales y subtropicales del mundo, y es considerada como una de las enfermedades más importantes transmitidas por garrapatas *R. microplus* y *R. annulatus*⁽¹⁾. Para el control de la babesiosis, se han recomendado diferentes procedimientos que incluyen: inmunización, quimioterapia, control de desplazamiento del ganado de áreas infectadas y control del vector⁽²⁾. Se han descrito diferentes métodos para disminuir la virulencia de las especies patógenas en bovinos, tales como la realización de pases rápidos por inoculación parenteral en becerros esplenectomizados⁽³⁾, pases lentos por inoculación parenteral en becerros intactos⁽⁴⁾, la irradiación del parásito^(5,6) y la atenuación del parásito por mantenimiento continuo en cultivo *in vitro*^(7,8).

Trabajos previos de investigación en México han permitido demostrar que se cuenta con una cepa de *B. bigemina* (denominada "BIS") atenuada por pases en cultivo continuo en condiciones *in vitro*⁽⁹⁾, que se ha comportado como población atenuada al no afectar en forma importante los valores hematológicos en animales inoculados⁽⁸⁾. Al ser utilizada como vacuna ha inducido protección al desafío heterólogo con sangre infectada, así como por garrapatas infectadas en condiciones controladas y en condiciones de campo^(10,11,12). Por otro lado, la irradiación reduce la virulencia sin afectar la capacidad inmunogénica de las cepas vacunales por la eliminación de la mayoría de la población de patógenos; de este modo se selecciona por parásitos de baja virulencia pero con una alta capacidad inmunogénica^(6,13). De igual forma, una clona de *Babesia bovis* irradiada (denominada "BOR") y cultivada *in vitro*⁽¹⁴⁾ se ha utilizado como componente de una vacuna viva en ganado susceptible, y ha demostrado capacidad protectora cuando los animales son desafiados con cepas virulentas^(15,16), contando además con la gran ventaja conferida por su producción *in vitro*: un bajo riesgo de contaminación con otros agentes infecciosos⁽¹⁷⁾; es una suspensión de glóbulos rojos altamente parasitada, y ofrece la posibilidad de producción de la vacuna de *B. bovis* en países que

INTRODUCTION

Bovine babesiosis caused by *B. bovis* and *B. bigemina* is distributed in tropical and subtropical areas of the world, and it is considered as one of the most important diseases transmitted by *R. microplus* and *R. annulatus*⁽¹⁾. Different procedures have been recommended for the control of babesiosis that include: immunization, chemotherapy, cattle movement control from infected areas and vector control⁽²⁾. Different methods have been described to decrease virulence of pathogenic species in bovines, such as: rapid passage by parenteral inoculation in splenectomized calves⁽³⁾, slow passage by parenteral inoculation in intact calves⁽⁴⁾ parasite irradiation^(5,6) and parasite attenuation by continuous maintenance in *in vitro* culture^(7,8).

Previous research studies in Mexico have allowed to demonstrate that there is a *B. bigemina* strain (called "BIS") attenuated by continuous *in vitro* culture passage conditions, which has behaved as attenuated population not affecting, in an important way, hematological values in inoculated animals⁽⁸⁾. Being used as a vaccine, it has induced protection to heterologous challenge with infected blood, as well as by infected ticks under controlled and field conditions⁽¹⁰⁻¹²⁾. On the other hand, irradiation decreases virulence without affecting the immunogenic capacity of the vaccinal strains by eliminating the majority of the pathogenic population; in this way, low virulence parasites but with high immunogenic capacity are selected^(6,13). Likewise, an irradiated *Babesia bovis* clone (called "BOR") cultivated *in vitro* has been used as live vaccine component in susceptible cattle, and it has demonstrated protective capacity when the animals are challenged with virulent strains^(15,16), also having great conferred advantage for its *in vitro* production: a low contamination risk with other infectious agents⁽¹⁷⁾, it is a suspension of highly parasitized erythrocytes, and offers the possibility of producing *B. bovis* vaccine in countries with adequate laboratory infrastructure^(1,17). However, up to date, it is unknown if continuous passages from cattle to cattle revert the irradiated clone to be once again transmitted by ticks.

disponen con una adecuada infraestructura de laboratorio^(1,17). Sin embargo, a la fecha se desconoce si el continuo paso de ganado a ganado revierte la clona irradiada para ser transmitida de nuevo por garrapatas.

Se ha descrito que los animales vacunados con organismos vivos permanecen como portadores, lo que conduce a la aparición de casos clínicos, debido a la reversión a la virulencia de las cepas cuando ellas son pasadas a través de animales intactos o cuando son transmitidos por garrapatas⁽¹⁸⁾. Las cepas vacunales han sido desarrolladas para conferir una adecuada protección sin ser transmitidas por garrapatas, un rasgo considerado ecológicamente deseable, ya que previene la aparición de casos clínicos debido a la transmisión de la cepa vacunal por garrapatas⁽¹⁹⁾. Sin embargo, esta capacidad solamente ha sido demostrada después de un pase en ganado susceptible^(8,18-20).

El objetivo de este estudio fue evaluar si las cepas vacunales BIS y BOR son transmitidas por garrapatas después de tres pases en bovinos susceptibles, y determinar si existe reversión a la virulencia de estas cepas después de los pases sucesivos por bovinos sin su regreso al cultivo *in vitro* de donde se originaron.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1

La cepa inmunizante de *B. bigemina* denominada BIS es originaria de México, fue obtenida de un caso clínico mediante aislamiento, adaptación y propagación continua en cultivo *in vitro*⁽⁹⁾. Desde entonces, se ha mantenido alternadamente, ya sea en cultivo *in vitro* o en nitrógeno líquido como estabilizado criopreservado^(16,21). Esta cepa ha sido evaluada como vacuna viva atenuada en estudios previos^(10,11,12) y presentó un comportamiento semejante al descrito para cepas atenuadas. La cepa virulenta de *B. bigemina* (C) fue donada por el Dr. Lucious Chieves (USD-APHIS-NVSL, Ames, Iowa, EE.UU.). Inicialmente fue aislada de un caso clínico y ha sido mantenida por pases a través de ganado susceptible, garrapatas y nitrógeno líquido^(10,11). Se utilizó una colonia de garrapatas

It has been reported that animals vaccinated with live organisms stay as carriers, which leads to the appearance of clinical cases, due to virulence reversion of the strains when they are passage through intact animals or transmitted by ticks⁽¹⁸⁾. Vaccinal strains have been developed to confer adequate protection without being transmitted by ticks, a trait considered ecologically desirable, since it prevents the appearance of clinical cases due to the vaccinal strain transmission by ticks⁽¹⁹⁾. Nevertheless, this capacity has only been demonstrated after one passage in susceptible cattle^(8,18-20).

The aim of this study was to evaluate if BIS and BOR vaccinal strains are transmitted by ticks after third passage in susceptible bovines, and determine if there is reversion to virulence of these strains after successive passages by bovines without its return to *in vitro* culture where they originated from.

MATERIALS AND METHODS

Experiment 1

The *B. bigemina* immunized strain called BIS, is originated from Mexico, it was obtained from a clinical case by isolation, adaptation and continuous *in vitro* propagation culture⁽⁹⁾. Since then, it has alternatively kept, either by *in vitro* culture or as a cryopreserved stabilate in liquid nitrogen^(16,21). On previous studies, this strain has been evaluated as attenuated live vaccine⁽¹⁰⁻¹²⁾ and showed a behavior similar to the described for attenuated strains. The *B. bigemina* (C) virulent strain was donated by Dr. Lucious Chieves (USD-APHIS-NVSL, Ames, Iowa, EE.UU.). It was initially isolated from a clinical case and it has been kept by passages through susceptible cattle, ticks and liquid nitrogen^(10,11). A colony of *Babesia* spp-free *R. microplus* ticks was used, kept *in vitro* and animals under controlled conditions⁽⁸⁾.

Eleven, one year old, *Bos taurus* cattle coming from a tick-free zone and without immunological response against *Babesia* spp by the Indirect Fluorescent Antibody test (IFAT) were used as followed: one animal was used for the reactivation of *B. bigemina* virulent field strain, the other animals were randomly divided in two groups, one

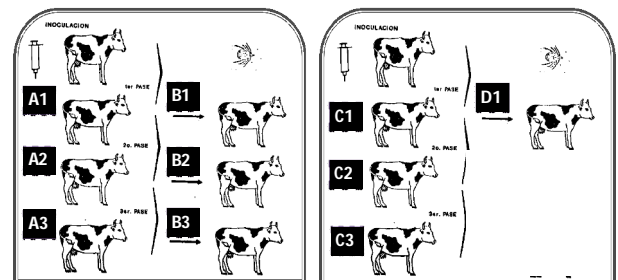
R. microplus libre de *Babesia spp.*, mantenida *in vitro* y en animales en condiciones controladas⁽⁸⁾.

Once bovinos *Bos taurus* de 1 año de edad, procedentes de una zona libre de garrapatas y sin respuesta inmunológica contra *Babesia spp* por la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), se utilizaron como sigue: un animal se usó para la reactivación de la cepa virulenta de campo de *B. bigemina*, los otros animales se dividieron al azar en dos grupos, un grupo de seis bovinos para el experimento con la cepa BIS y los restantes para el experimento con la cepa de *B. bigemina* de campo virulenta (Grupo testigo). Los animales que recibieron la inoculación de la cepa BIS fueron designados A1, A2 y A3 (tres pases consecutivos por sub-inoculación vía intramuscular con jeringa); mientras que los bovinos B1, B2 y B3 recibieron las larvas de *R. microplus* procedentes de hembras repletas alimentadas en los bovinos A1, A2 y A3, respectivamente. Los bovinos del grupo testigo (C1, C2 y C3) se inocularon por vía intramuscular con jeringa con eritrocitos infectados (EI) con cepa de campo de *B. bigemina*, mientras que el bovino D1 recibió las larvas de *R. microplus* procedentes de hembras repletas alimentadas en el bovino C1 (Figura 1). El bovino A1 se inoculó con 1×10^8 EI infectados con cepa BIS, y una vez que resultó positivo a *B. bigemina* mediante examen microscópico de frotis teñido con colorante de Giemsa, se tomó sangre de éste y se realizó el segundo pase inoculando al bovino A2. El tercer pase se realizó cuando el bovino A2 resultó positivo a la infección mediante sub-inoculación del bovino A3 (Figura 1). Todos los pases se realizaron durante la fase de parasitemia y a una dosis equivalente a 1×10^8 EI. Los bovinos A1, A2, A3 y C1 fueron infestados, en cinco ocasiones, con 4,000 larvas de *R. microplus* libres de infección por *Babesia spp* los días -14, -12, -10, -8 y -6 (con respecto a la inoculación con EI, considerado como día 0). Una vez transcurrido el período de alimentación en el bovino (21 días), las garrapatas hembra repletas se limpiaron y colocaron en cajas individuales y se incubaron en una estufa a 27 °C con 85 % de humedad relativa. Diariamente y durante ocho días se realizó la prueba de hemolinfa y se procedió a realizar la observación de quinetos por microscopía.

group of six bovinos for BIS strain trial and the rest for the trials with *B. bigemina* virulent field strain (control group). The animals that received BIS strain inoculation were assigned as A1, A2, and A3 (three consecutive passages by subinoculation via intramuscular injection); while B1, B2 and B3 received *R. microplus* larvae from fully engorged female ticks from bovinos A1, A2 and A3, respectively. Bovinos from control group (C1, C2 and C3) were intramuscularly inoculated by syringe with infected erythrocytes (IE) with *B. bigemina* field strain, while bovine D1 received *R. microplus* larvae from fully engorged females from bovine C1 (Figure 1). Bovine A1 was inoculated with 1×10^8 IE with BIS strain, and once it was positive to *B. bigemina* by microscopic examination of Giemsa-stained smears, a sample of blood was taken and the second passage was carried out by inoculating bovine A2. The third passage was done when bovine A2 was positive to infection by sub inoculation of bovine A3 (Figure 1). All passages were carried out during the parasitemic phase at a dose equivalent to 1×10^8 IE. Bovinos A1, A2, A3 and C1 were infested, in five occasions, with 4,000 *Babesia spp*-free *R. microplus* larvae at d -14, -12, -10, -8 and -6 (in regard to IE inoculation, considered as day zero). Once the feeding period on bovine had taken place (21 d), the engorged female ticks were cleaned and placed on individual dishes and were incubated in a stove at 27 °C with

Figura 1. Inoculación de bovinos con cepas atenuada y virulenta de *B. bigemina* e infestación con *R. microplus*. Experimento 1

Figure 1. Bovine inoculation with *B. bigemina* attenuated or virulent strains and *R. microplus* infestation. Experiment 1



Drawings, figure 1 and 2: Inoculation, 1st passage, 2nd passage, 3rd passage

Se seleccionaron las hembras repletas de *R. microplus* colectadas de los bovinos A1, A2, A3 y C1 que resultaron positivas a quinetos de *Babesia* en la prueba de hemolinfa⁽²²⁾. Cuando no se pudieron detectar como positivas por esta prueba, se seleccionaron las que se desprendieron naturalmente de los animales en días coincidentes con la presencia de EI con *B. bigemina* detectables en el bovino. Los animales B1, B2, B3 y D1 fueron infestados en una sola ocasión con 20,000 larvas, progenie de las garrapatas hembras seleccionadas de los animales A1, A2, A3 y C1, respectivamente.

El monitoreo de infección en los bovinos inoculados con EI o infestados con larvas de *R. microplus* se realizó mediante la determinación de temperatura rectal (TR), y la colección de sangre para elaboración de frotis sanguíneos a teñirse con colorante de Giemsa y observación al microscopio compuesto, así como para la determinación del volumen celular aglomerado (VCA). Muestras de sangre procedentes de los animales utilizados en el experimento de transmisión de la cepa atenuada de *B. bigemina* se criopreservaron en nitrógeno líquido a -196 °C⁽²¹⁾ y procesadas posteriormente mediante la amplificación de ADN por la prueba de PCR anidada, procedimiento que permite obtener un amplicón de 172 pares de bases, esencialmente como se describió previamente⁽²³⁾, utilizando los oligonucleótidos específicos para *B. bigemina*⁽²⁴⁾, y los cuales alinean con secuencias de un gen ortólogo de VESA-1 (Antígeno Variable de la Superficie del Eritrocito, por sus siglas en inglés) de *B. bovis* (datos no publicados).

Experimento 2

La clona irradiada de *B. bovis* (BOR) fue obtenida de la cepa KBb⁽²¹⁾. La cepa original es nativa de México, aislada de un caso clínico y adaptada al cultivo *in vitro*⁽⁷⁾. Fue clonada por dilución crítica e irradiada en una fuente de Co⁶⁰ a 187 Grays⁽¹⁴⁾. Desde entonces, se ha mantenido alternadamente ya sea en cultivo *in vitro* o en nitrógeno líquido como estabilizado criopreservado⁽¹⁵⁾. La cepa virulenta (V) fue igualmente donada por el Dr. Lucious Chieves; inicialmente fue aislada de un

85 % of relative humidity. Daily and during 8 d, the hemolymph test was carried out and kinetes observed by microscopy. *R. microplus* engorged females collected from bovinos A1, A2, A3 and C1 that were positive to *Babesia* in the hemolymph test were selected⁽²²⁾. When they could not be detected as positive by this test, the ones that naturally detached from the animals in coincident days with the presence of *B. bigemina*-IE detectable in the bovine were selected. Animals B1, B2, B3 and D1 were infested in only one occasion with 20,000 larvae, progeny of female ticks selected from animals A1, A2, A3 and C1, respectively.

The monitoring of infection in inoculated bovinos with IE or infested with *R. microplus* larvae was carried out by rectal temperature determination (RT), and blood collection for elaboration of blood smears stained with Giemsa and observed in a compound microscope, as well as for determination of the Packed Cell Volume (PCV). Blood samples from animals used in the experiment of *B. bigemina* attenuated strain transmission were cryopreserved in liquid nitrogen at -196 °C⁽²¹⁾ and processed by DNA amplification by nested-PCR, procedure which allows to obtain an amplicon of 172 base pairs; basically, as previously described⁽²³⁾, and using specific oligonucleotides for *B. bigemina*⁽²⁴⁾, which align with sequences of the VESA-1 (variant erythrocyte surface antigen 1) ortholog gen of *B. bovis* (unpublished data).

Experiment 2

B. bovis irradiated clone (BOR) was obtained from KBb strain⁽²¹⁾. The original strain comes from Mexico, isolated from a clinical case and adapted to *in vitro* culture⁽⁷⁾. It was cloned by critical dilution and irradiated in a Co-60 source at 187 Grays⁽¹⁴⁾. Since then, it has been alternately kept either in *in vitro* culture or as cryopreserved stabilize in liquid nitrogen⁽¹⁵⁾. The virulent strain (V) was also donated by Dr. Lucious Chieves; it was initially isolated from a clinical case and it has been kept by passages through susceptible cattle, ticks and liquid nitrogen⁽¹⁵⁾. A colony of *Babesia* spp-free *R. microplus* ticks was used. The colony is continuously reproduced in the laboratory according

caso clínico y ha sido mantenida por pases a través de ganado susceptible, garrapatas y nitrógeno líquido⁽¹⁵⁾. Se utilizó una colonia de garrapatas *R. microplus* libres de *Babesia* spp. La colonia se reproduce continuamente en el laboratorio de acuerdo a metodología previamente descrita⁽⁸⁾. Se emplearon 12 bovinos *B. taurus* de 18 meses de edad procedentes de una zona libre de garrapatas y libres de anticuerpos contra *Babesia* spp mediante la prueba de IFI, los cuales fueron alojados en corrales en confinamiento y fueron alimentados *ad libitum*. Se formaron dos grupos de seis animales. Los seis bovinos de cada grupo fueron denominados con números del uno al seis precedido por la letra mayúscula de la cepa usada.

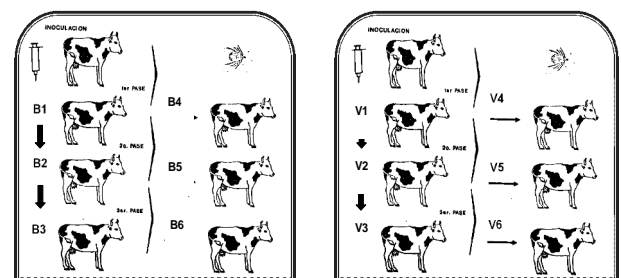
Los animales B1 y V1 fueron inoculados al día cero con 1×10^8 EI con una de las dos poblaciones de parásitos; el bovino B1 fue inoculado con la clona BOR, mientras que el bovino V1 fue inoculado con sangre infectada con la cepa virulenta de *B. bovis*. Estas inoculaciones correspondieron al primer pase a través de bovino susceptible intacto. Una vez que los bovinos B1 y V1 se detectaron positivos a *B. bovis* por la observación de laminillas de frotis sanguíneos teñidos con colorante Giemsa, los animales se sangraron y el segundo pase se realizó mediante la inoculación de sangre a los animales B2 y V2. El tercer pase se llevó a cabo cuando la sangre de estos bovinos mostró EI y se inoculó a los bovinos B3 y V3, respectivamente. Todos los pases fueron realizados durante el pico de parasitemia a una dosis equivalente a 1×10^8 EI (Figura 2). Los animales (pase 1) B1, y V1, se infestaron en cinco ocasiones, con 4,000 larvas *R. microplus* libres de *Babesia* spp los días -7, -5, -3, -1 y 3; los animales B2 y V2 se infestaron los días 0, 2, 4, 6, 8 y 10; mientras que los B3 y V3 se infestaron los días 7, 9, 11, 13, 15 y 17; considerando el día cero como el día en el cual los novillos B1 y V1 fueron primeramente inoculados. Se seleccionaron hembras repletas de *R. microplus* alimentadas en los animales 1, 2 y 3 (pases 1 al 3, respectivamente) que resultaron positivos al microscopio a la prueba de hemolinfa⁽²²⁾, o que se desprendieron naturalmente de los animales en días coincidentes con parasitemia detectables en el bovino. Las hembras repletas se limpiaron y se

to the aforementioned methodology⁽⁸⁾. Twelve, 18 mo old, *B. taurus* cattle were used, coming from a tick-free area and free from antibodies against *Babesia* spp by the IFA test, were housed in confinement pens and were fed *ad libitum*. Two groups of six animals were formed. The six bovines from each group were identified with numbers from one to six preceded by the capital letter of the strain used.

Animals B1 and V1 were inoculated at day zero with 1×10^8 IE with each one of two parasite populations; bovine B1 was inoculated with BOR clone, while bovine V1 was inoculated with infected blood from *B. bovis* virulent strain. These inoculations corresponded to the first passage through intact susceptible bovine. Once bovines B1 and V1 were detected positive to *B. bovis* by Giemsa-stained blood smear observation, the animals were bled and the second passage was done by blood inoculation to animals B2 and V2. Third passage was carried out when blood from these bovines showed IE and it was inoculated to bovines B3 and V3, respectively. All passages were done during parasitemia peak at an equivalent dose of 1×10^8 IE (Figure 2). The animals (first passage) B1 and V1 were infested in five occasions with 4,000 *Babesia* spp-free *R. microplus* larvae at d -7, -5, -3, -1 and 3; animals B2 and V2 were infested on d 0, 2, 4, 6, 8 and 10; while B3 and V3 were

Figura 2. Inoculación de bovinos con cepas atenuada y virulenta de *B. bovis* e infestación con *R. microplus*. Experimento 2

Figure 2. Bovine inoculation with *B. bovis* attenuated and virulent strains and *R. microplus* infestation. Experiment 2



Drawings, figure 1 and 2: Inoculation, 1st passage, 2nd passage, 3rd passage

colocaron en cajas individuales y se incubaron en una estufa a 27 °C, 30 % de humedad relativa para permitir su ovoposición. Después de la incubación, la progenie procedente de cada hembra se utilizó para infestar a los bovinos 4, 5 y 6 en el orden siguiente: la progenie de garrapatas desprendidas de los animales B1 y V1, se colocaron en los novillos B4 y V4, respectivamente; Las larvas provenientes de las garrapatas desprendidas de los bovinos B2 y V2, se depositaron en los animales B5 y V5, respectivamente, y aquéllas provenientes de los bovinos B3 y V3, se utilizaron para infestar a los novillos B6 y V6. Las infestaciones se realizaron, en una ocasión, utilizando 20,000 larvas por animal. Diariamente durante ocho días se les realizó la prueba de hemolinfa y se procedió a realizar la observación de quinetos por microscopía. Diariamente se llevaron registros de TR, VCA y también se registró la presencia de *B. bovis* en los EI en todos los animales experimentales. Muestras de sangre procedentes de los animales utilizados en el experimento de transmisión de la clona irradiada de *B. bovis* se criopreservaron en nitrógeno líquido a -196 °C⁽²¹⁾ y procesadas posteriormente mediante la amplificación de ADN por la prueba de PCR anidada, procedimiento que permite obtener un amplicón de 280 pares de bases, esencialmente como se ha descrito previamente⁽²³⁾, y utilizando los oligonucleótidos específicos para *B. bovis*⁽²⁴⁾, los cuales se alinean con secuencias internas del gen RAP-1 de *B. bovis*⁽²⁵⁾.

RESULTADOS

Experimento 1

Los resultados obtenidos después de realizar tres pases a través de bovinos susceptibles mediante la inoculación de *B. bigemina* cepa BIS se presentan en el Cuadro 1. El bovino A1 presentó parasitemia, aunque con porcentaje de EI bajó (< 0.01 %) en los días 2 y 3 post-inoculación (PI), la TR se incrementó ligeramente (39.3 °C), y el porcentaje de caída del VCA fue del 25 %, sin requerir tratamiento específico contra babesiosis bovina. El bovino A2 mostró parasitemia (< 0.001 %) durante los días 10 y 11 PI, con TR elevada (40.4 °C) el día 3 PI y descenso en el valor de VCA del 25 %.

infested on d 7, 9, 11, 13, 15 and 17; considering day zero as the day in which calves B1 and V1 were firstly inoculated. Fully engorged *R. microplus* females from animals 1, 2 and 3 (first to third passages, respectively) that were microscopically positive to the hemolymph test⁽²²⁾ or were naturally detached from the animals in coinciding days with detectable bovine parasitemia were selected. Engorged females were cleaned, placed in individual dishes and incubated in a stove at 27 °C, at a relative humidity of 85 %, in order to allow their oviposition. After incubation, progeny originating from each female was used to infest bovines 4, 5 and 6 in the following order: progeny of detached ticks from animals B1 and V1 were placed in calves B4 and V4, respectively; larvae from detached ticks of bovines B2 and V2 were deposited on animals B5 and V5, respectively; and those from bovines B3 and V3 were used to infest calves B6 and V6. Infestations were carried out, in one occasion, using 20,000 larvae per animal. Daily, for 8 d, hemolymph test was carried out and observation of kinetes by microscopy was done. RT and PCV records were daily performed, and also presence of *B. bovis*-IE in all experimental animals was recorded. Blood samples from animals used in the experiment of *B. bovis* irradiated clone transmission were cryopreserved in liquid nitrogen at -196 °C⁽²¹⁾ and later processed by nested PCR for DNA amplification, process that allows to obtain an amplicon of 280 base pairs, basically as it has been previously described⁽²³⁾, and using the specific oligonucleotides for *B. bovis*⁽²⁴⁾ that align to internal sequences of the *B. bovis* RAP-1 gene⁽²⁵⁾.

RESULTS

Experiment 1

The obtained results after three passages through susceptible bovines by *B. bigemina* BIS strain inoculation are shown in Table 1. Bovine A1 showed parasitemia, although with low IE percentage (< 0.01 %) at d 2 and 3 post-inoculation (PI), RT slightly increased (39.3 °C), and PCV percentage drop was 25 %, without specific treatment against bovine babesiosis. Bovine A2 showed parasitemia (< 0.001 %) during d 10 and 11 PI, with high RT (40.4 °C) on d 3 PI and

Cuadro 1. Monitoreo de bovinos inoculados con la cepa Seed de *B. bigemina*Table 1. Monitoring of inoculated bovines with *B. bigemina* Seed strain

	A1	A2	A3	B1	B2	B3
Maximum RT, °C	39.3	40.4	39.7	39.6	39.7	38.5
Days with RT >39.5 °C	0	1	1	1	1	0
Prepatent period*	2	10	11	—	—	6
PCV maximum reduction, %	25	25	20	24	38.5	15.6
Parasitemia (days)	2	2	0	0	0	2

* Post-inoculation day in which parasites were observed in smear or amplified DNA by PCR.

RT= rectal temperature; PCV= packed cell volume (hematocrit).

En el tercer pase (Bovino A3) y a pesar de que no se encontró evidencia clara de parásitos en frotis sanguíneo, se observó aumento en TR (39.7 °C) y disminución del VCA (20 %) el día 12 PI. Con respecto a los animales B1 y B2, infestados con la progenie de garrapatas obtenidas de los bovinos A1 y A2, respectivamente, durante el periodo prepatente todos los frotis revisados resultaron negativos a *B. bigemina*. De forma similar, al revisar la hemolinfa de las garrapatas alimentadas en los bovinos A1, A2 y A3, ninguna muestra resultó positiva; en contraste, el bovino receptor B3 mostró un eritrocito con forma sugestiva del estadio de trofozoito de *B. bigemina* durante los días 6 y 7 PI. Sin embargo, tanto la TR como el valor de VCA no presentaron cambios relevantes.

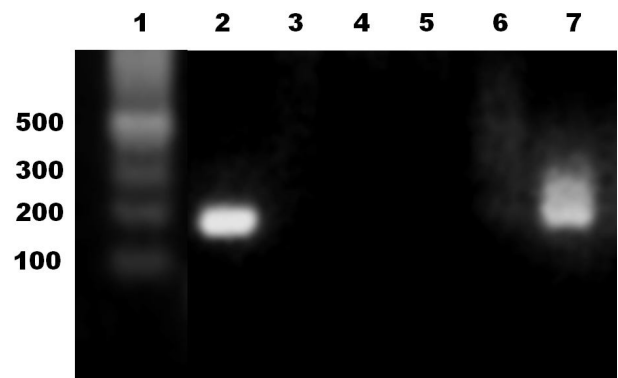
Sangre colectada del bovino B3 y procesada mediante la prueba de PCR-anidada confirmó la presencia de material genético de *B. bigemina*, al detectarse un fragmento del tamaño esperado de 172 pb específico para *B. bigemina* (ver resultado representativo en Figura 3).

Al evaluar el comportamiento de la cepa de campo de *B. bigemina* (Cuadro 2) se encontró que el bovino C1 se detectó positivo al frotis sanguíneo el día 6 PI (<0.01 %), manteniéndose positivo durante cinco días, con TR elevada (hasta 40 °C) y con ligero descenso del VCA (16 %). El bovino que recibió el segundo pase (bovino C2) mostró parasitemia desde el día 2 PI con porcentajes de EI de 0.13, 0.01, 0.08 y 0.13 % los días 2, 3, 4 y 5 PI, respectivamente; con fiebre de más de 41 °C

reduction in -PCV value of 25 %. In third passage (bovine A3), although there was no clear evidence of parasites in blood smear, increase in RT (39.7 °C) and reduction in PCV (20 %) on d 12 PI was observed. In regard to animals B1 and B2, infested with tick progeny obtained from bovines A1 and A2, respectively, all examined smears resulted negative to *B. bigemina* during the prepatent period. Likewise, by hemolymph test of ticks fed on bovines

Figura 3. Análisis en gel de agarosa de productos amplificados por PCR anidado (*B. bigemina*) a partir de ADN purificado de sangre colectada de bovinos

Figure 3. Agarose gel analysis of amplified products by nested-PCR (*B. bigemina*) from purified blood DNA collected from bovines



Lanes: 1) Size marker, 100 bp ladder; 2) Positive control, infected erythrocytes ; 3) PCR control (water); 4) Negative control, non-infected erythrocytes; 5) Bovine B1; 6) Bovine B2; 7) Bovine B3 .

posterior al inicio de la parasitemia y con una elevada disminución del VCA (45 %) el día 5 PI, por lo que fue necesario tratarlo con babesicida el día 6 PI. En el bovino que recibió el tercer pase por jeringa (C3) se presentó parasitemia del día 3 hasta el día 12 PI (<0.01 %), la temperatura solamente tuvo un ligero incremento el día 5 PI (39.7 °C), pero el VCA disminuyó los días 5, 6 y 7 PI (29 %) por lo que tuvo que ser tratado con babesicida el día 12 PI. Con respecto al experimento con la cepa de campo *B. bigemina*, todas las garrapatas que se alimentaron del bovino C1 y analizadas por la prueba de hemolinfa resultaron positivas mostrando la presencia de quinetos de *Babesia*. El bovino D1, infestado con la progenie de garrapatas hemolinfa-positivas del bovino C1 (Cuadro 2), manifestó la babesiosis clínica en forma severa, ya que se encontró positivo al frotis del día 4 al 9 PI (0.04 %) presentando fiebre (> 40 °C) al día 6 PI y una caída drástica del VCA (66 %) del día 5 al 8 PI. Dado que el bovino D1 se detectó positivo al frotis desde el primer pase por garrapatas, esto confirma la transmisión de la cepa de campo de *B. bigemina* virulenta.

Experimento 2.

Los resultados obtenidos después de realizar tres pases a través de bovinos susceptibles mediante la inoculación por jeringa de la clona BOR de *B. bovis* se presentan en el Cuadro 3. Los novillos B1, B2 y B3 mostraron signos clínicos de moderados a ligeros a medida que el pase fue realizado: el período de incubación incrementó; el número de días con fiebre disminuyó; el período prepatente aumentó y la reducción en el VCA que decreció solamente 5 % en el tercer pase. No hubo presencia de signos clínicos en los novillos B4, B5 y B6 infestados con la progenie de las garrapatas *R. microplus* provenientes de los bovinos B1, B2 y B3, respectivamente. Por otra parte, no se logró encontrar parásitos por la lectura de laminillas teñidas con Giemsa durante el experimento en los animales receptores B4 y B5; sin embargo, se observaron EI en el bovino B6 (receptor de la progenie de garrapatas *R. microplus* alimentadas sobre el animal inoculado con el tercer pase), el cual apareció positivo el día 13 post-infestación.

A1, A2 and A3, no sample resulted positive; in contrast, the receptor bovine B3 showed an erythrocyte with suggestive form of a *B. bigemina* trophozoite stage during d 6 and 7 PI. However, RT as well as PCV value did not show relevant changes.

Blood collected from bovine B3 and processed by nested-PCR test, confirmed the presence of *B. bigemina* genetic material, when a fragment of the expected size of 172 bp specific for *B. bigemina* was detected (see representative result in Figure 3).

When *B. bigemina* field strain behavior was evaluated (Table 2), it was found that bovine C1 was positive to blood smear on d 6 PI (< 0.01 %), being positive for 5 d, with high RT (up to 40 °C) and with slight reduction of PCV (16 %). The bovine that received the second passage (bovine C2) showed parasitemia since d 21 PI with IE percentages of 0.13, 0.01, 0.08 and 0.13 on d 2, 3, 4 and 5 PI, respectively; with fever higher than 41 °C after parasitemia onset and high reduction of PCV (45 %) on d 5 PI, and therefore it was necessary to treat it with babesiacide on d 6 PI. The bovine that received third passage by syringe (C3) showed parasitemia from d 3 up to 12 PI (< 0.01 %), temperature was slightly increased on d 5 PI (39.7 °C), but PCV reduced on d 5, 6 and 7 PI (29 %), and therefore had to be treated with babesiacide on d 12 PI. In regard to the experiment with *B. bigemina* field strain, all ticks fed on bovine

Cuadro 2. Monitoreo de bovinos inoculados con la cepa virulenta de *B. bigemina*

Table 2. Monitoring of inoculated bovines with *B. bigemina* virulent strain

	C1	C2	C3	D1
Maximum RT, °C	40	41	39.7	40.3
Days with RT >39.5 °C	2	4	1	1
Prepatent period*	6	2	3	4
PCV maximum reduction, %	16	45	29	66
Parasitemia, days	5	4	10	6
Required treatment	NO	Yes	Yes	Yes

* Post-inoculation day in which presence of parasites are observed in smear. RT= rectal temperature; PCV= packed cell volume (hematocrit).

Cuadro 3. Monitoreo de bovinos inoculados con clona BOR de *B. bovis*Table 3. Monitoring of inoculated bovines with *B. bovis* BOR clone

	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Incubation period*, days	3	6	8	-	-	-
Maximum RT, °C	40.0	40.4	39.7	39.1	39.2	39.4
RT >39.5 °C, days	5	5	4	-	-	-
Prepatent period**, days	3	10	13	-	-	13
PCV maximum reduction, %	33	26	5	13	14	10
Parasitemia, days	3	2	1	-	-	1
Required treatment	No	No	No	No	No	No

* Post-inoculation day with RT >39.5 °C.

** Post-inoculation day with parasite presence.

RT= rectal temperature; PCV= packed cell volume.

Los novillos no mostraron signos clínicos y la parasitemia fue demasiado baja para ser cuantificada. Este experimento demostró la falta de transmisión a través de garrapatas de la clona BOR después de uno y dos pases en ganado susceptible. La población fue transmitida después del tercer pase en animales intactos. Sin embargo, no existe riesgo aparente de que la enfermedad se presente, debido a que los parásitos no revirtieron a la virulencia por lo menos después de tres pases en bovinos. Ninguno de los animales de este grupo requirió ser tratado con medicamentos babesicidas. Todas las garrapatas colectadas de los animales inoculados con la clona BOR fueron negativas a la prueba de hemolinfa, incluyendo aquéllas que transmitieron el parásito a su progenie después del tercer pase.

En contraste, y como se muestra en el Cuadro 4, el monitoreo de los animales inoculados con el aislado de campo de *B. bovis* mostró novillos con valores de temperatura rectal de 40 °C o superior en cada uno de los tres pases (animales V1, V2 y V3). También, los valores del VCA se vieron dramáticamente afectados, alcanzando decrementos de 42 a 50 % en los animales en que se realizaron los tres pases. En forma similar, los animales receptores infestados con larvas derivadas de garrapatas alimentadas sobre los bovinos antes mencionados, mostraron signos clínicos severos tales como TR mayor a 40 °C y una reducción del

C1 and analyzed by hemolymph test resulted positive showing presence of *Babesia* kinetics. Bovine D1, infested with hemolymph-positive tick progeny from bovine C1 (Table 2), showed severe clinical babesiosis, since it was positive to the smear from d 4 to 9 PI (0.04 %), showing fever (> 40 °C) on d 6 PI and a drastic drop of PCV (66 %) from d 5 to 8 PI. Taking into consideration that bovine D1 was detected positive to smear since the first passage by ticks, it confirms the transmission of *B. bigemina* virulent field strain.

Experiment 2

The obtained results after the third passage through susceptible bovines by syringe inoculation of *B. bovis* BOR clone are shown in Table 3. Calves B1, B2 and B3 showed moderate to mild clinical signs as passage was performed: incubation period increased; fever days decreased; prepatent period increased and PCV reduction only decreased 5 % in the third passage. There was no presence of clinical signs in calves B4, B5 and B6 infested with *R. microplus* tick progeny from bovines B1, B2 and B3, respectively. On the other hand, parasites were not found in Giemsa-stained slides during the experiment on receptor animals B4 and B5; however, IE in bovine B6 (receptor of the *R. microplus* tick progeny fed on the inoculated animal with third passage) were observed, which showed positive on d 13 PI. Calves did not show clinical

Cuadro 4. Monitoreo de bovinos inoculados con cepa virulenta de *B. bovis*

Table 4. Monitoring of inoculated bovines with *B. bovis* virulent strain

	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Incubation period*, days	3	6	3	5	7	7
Maximum RT, °C	40.0	41.0	41.2	40.2	40.4	40.7
RT >39.5 °C, days	6	4	5	6	5	2
Prepatent period**, days	5	6	5	10	7	6
PCV maximum reduction, %	50	42	44	43	53	53
Parasitemia, days	5	3	5	3	6	4
Required treatment	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

* Post-inoculation day with RT >39.5 °C.

** Post-inoculation day with parasite presence.

RT= rectal temperature; PCV= packed cell volume.

VCA del 43 al 53 %. Todos los animales presentaron El los días 3-6,7-9, 5-8,10-12, 7-10 y 6-8 PI para los animales V1 al V6, respectivamente. Fue necesario administrar medicamentos babesicida a los seis bovinos. Las garrapatas ingurgitadas colectadas de los seis animales inoculados o infestados con progenie larval infectada con el aislado de *B. bovis* de campo resultaron todas positivas a la prueba de hemolinfa. Los resultados aquí obtenidos probaron que la clona BOR no es transmitida por garrapatas en el primer y segundo pase en ganado susceptible, pero sí al tercer pase, como fue determinado por microscopia óptica. Sin embargo, sangre colectada del bovino B6 y procesada mediante la prueba de PCR-anidada no logró confirmar la presencia de material genético de *B. bovis*, al no detectarse un fragmento de tamaño esperado de 280 pb específico para *B. bovis* (ver resultado representativo en Figura 4).

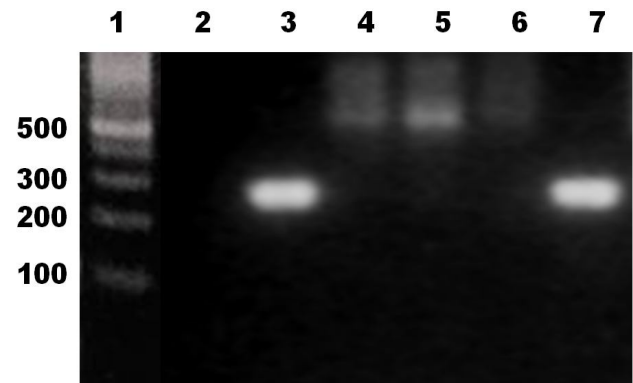
DISCUSION

Los resultados encontrados en este estudio respecto a la transmisión por garrapatas y virulencia de una cepa de campo coinciden con los hallazgos reportados previamente, en donde se utiliza una cepa de procedencia distinta (Texcoco) como cepa de campo de *B. bigemina*, pero se demuestra la capacidad de multiplicarse en el vector, lo cual se confirma por la presencia de quinetos en hemolinfa de las hembras repletas, la transmisión trans-ovárica

signs and parasitemia was too low to be quantified. This experiment showed lack of transmission through ticks after the first and second BOR clone passage in susceptible cattle. The population was transmitted after the third passage in intact animals. However, there is no evident risk of disease, since parasites did not revert to virulence at least after the third passage in bovines. No animal from this

Figura 4. Análisis en gel de agarosa de productos amplificados por PCR anidado (*B. bovis*) a partir de ADN purificado de sangre colectada de bovinos

Figure 4. Agarose gel analysis of amplified products by nested-PCR (*B. bovis*) from purified blood DNA collected from bovines



Lanes: 1) Size marker, 100 bp ladder; 2); PCR control (water); 3) Positive control, infected erythrocytes; 4) Bovine B4; 5) Bovine B5; 6) Bovine B6; 7) Bovine V4.

y la virulencia de la cepa en los animales receptores. De forma similar, se confirma que la cepa BIS no es transmitida por *R. microplus* después de un pase, como ha sido reportado previamente⁽⁸⁾.

En este estudio se confirma que los parásitos mantenidos en cultivo *in vitro* perdieron la capacidad para multiplicarse en la garrapata vector durante un segundo pase por sub-inoculación en bovinos susceptibles. Esto, evidenciado por la ausencia de quinetos en la hemolinfa de garrapatas alimentadas en bovinos con parasitemia patente. Además, se demuestra que aún cuando sujeta a tres pases sucesivos en bovinos altamente susceptibles, la población de parásitos mantiene su característica biológica de reducida virulencia manifestada por los valores de TR y VCA determinados en los bovinos sub-inoculados, los cuales no mostraron cambios relevantes. Sin embargo, y aún cuando las garrapatas alimentadas en el bovino que recibió el tercer pase de la cepa BIS resultaron negativas en la prueba de hemolinfa, la progenie derivada de estas garrapatas tuvo la capacidad de transmitirla al bovino receptor. Si bien este bovino no manifestó signología clásica de babesiosis bovina por *B. bigemina*, el frotis sanguíneo de este bovino mostró formas intra-eritrocíticas sugestivas de *B. bigemina*, las que indicaban que el bovino receptor estaba realmente infectado, lo que se demostró mediante el análisis por PCR anidado, en el que se detectó un fragmento específico de *B. bigemina* del tamaño esperado. Dado que se requiere de una fase sexual de *Babesia* para que se lleve a cabo la infección de las células epiteliales del intestino de la garrapata vector, y consecuentemente llevarse a cabo la transmisión trans-ovárica^(22,26), es probable que la población de parásitos de la cepa Seed requieren de por lo menos tres pases en bovinos infestados con *R. microplus* para que se induzca la formación de formas infectantes para la garrapata vector. Sin embargo se requiere de estudios adicionales para probar esta hipótesis.

Para el estudio con la clona BOR de *B. bovis*, los resultados encontrados coinciden con otros hallazgos reportados, los cuales demuestran la falta de transmisión por *R. microplus* de una cepa atenuada de *B. bovis* a través del primer pase en ganado

group needed treatment with babesiacide. All ticks collected from inoculated animals with BOR clone were negative to hemolymph test, including those which transmitted the parasite to its progeny after the third passage.

In contrast, and as it is shown in Table 4, the monitoring of inoculated animals with *B. bovis* field isolate showed calves with RT of 40 °C or higher in first, second and third passage (animals V1, V2 and V3). Also, PCV values were dramatically affected, reaching a drop of 42 to 50 % in animals gone through the third passage. Likewise, the infested receptor animals with larvae from ticks fed on bovines aforementioned, showed severe clinical signs, such as: RT higher than 40 °C and a PCV reduction of 43 to 53 %. All animals showed IE on d 3-6, 7-9, 5-8, 10-12, 7-10 and 6-8 PI for animals V1 to V6, respectively. It was necessary to administer babesiacide to the six bovines. The engorged ticks collected from the six inoculated animals or infested with infected larval progeny of the *B. bovis* field isolate resulted positive to the hemolymph test. The results here obtained proved that BOR clone is not transmitted by ticks on first and second passage in susceptible cattle, but indeed at third passage, as was determined by optical microscopy. Nevertheless, collected blood from bovine B6 and processed by nested-PCR test did not confirm the presence of *B. bovis* genetic material, given that a fragment of the expected size of 280 bp specific for *B. bovis* was not detected (see representative result in Figure 4).

DISCUSSION

Results found in this study in regard to tick transmission and field strain virulence, correspond to the findings previously reported, where a different field strain (Texcoco) of *B. bigemina* is used, but the propagation capacity in the vector is demonstrated, which is confirmed by the presence of kinetes in engorged female hemolymph, the trans-ovarian transmission and strain virulence in receptor animals. Likewise, it is confirmed that BIS strain is not transmitted by *R. microplus* after the first passage, as it has been previously reported⁽⁸⁾.

susceptible^(16,19,20). Una explicación a esto podría ser la pérdida de enzimas proteolíticas, las cuales tienen una función en los mecanismos de invasión de las células intestinales por los parásitos⁽¹⁶⁾, una condición probablemente causada por irradiación, la cual provoca la ruptura de la cadena fosfodiéster del ácido desoxirribonucleico (ADN), inactivando los genes en su totalidad⁽¹⁴⁾. No obstante de que éstas son características altamente consistentes, el pase de esta clona irradiada a través de más de dos animales intactos podría volver al parásito infeccioso para las garrapatas, como se observó en este trabajo durante el tercer pase. Es importante hacer notar que, si bien los parásitos se transmitieron en el tercer pase, solamente se encontró un parásito en el frotis sanguíneo después de dos horas de observación por un microscopista experto, y la prueba de PCR anidado no logró detectar material genético alguno. Esto puede ser resultado del umbral de sensibilidad analítica de la prueba de PCR anidado, dado que se requiere de la presencia de al menos 30 EI en una muestra de 200 μ l de paquete celular, para que se logre extraer la cantidad de molde suficiente que pueda dar un resultado positivo en la prueba de PCR^(24,25). No obstante, el bovino receptor de la progenie larval derivada de garrapatas colectadas del bovino tercer pase nunca mostró signos clínicos de babesiosis bovina. Se ha reportado que una cepa atenuada de *B. bovis* fue transmitida por garrapatas después de 26 pases en vacas esplenectomizadas⁽²⁷⁾. Otros experimentos han demostrado la falta de transmisión después del primer pase por garrapatas *R. microplus* de una cepa vacunal de *B. bovis*^(16,19,20).

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Las cepas atenuadas BIS de *B. bigemina* y BOR de *B. bovis* no fueron transmitidas de forma trans-ovárica por garrapatas después de dos pases en bovinos, y no revirtieron a virulentas en pases subsiguientes de animales inoculados a animales susceptibles. La transmisión por garrapatas de las cepas atenuadas hasta un tercer pase por bovinos, una práctica no realizada comúnmente en las explotaciones ganaderas, reduce el riesgo de diseminación de los parásitos cuando estos se utilicen como vacuna viva contra la babesiosis

This study confirms that parasites kept in *in vitro* cultures lost their capacity to multiply in the vector tick during a second passage by subinoculation in susceptible bovines. This, evidenced by the absence of kinetes in hemolymph of ticks fed on bovines with patent parasitemia. Also, it is demonstrated that even if it is subject to a third successive passage in highly susceptible bovines, parasite population keeps its biological characteristics of virulence reduction manifested by RT and PCV values determined in sub-inoculated bovines, which did not show relevant changes. However and even when ticks fed on bovine that received BIS strain third passage resulted negative to hemolymph test, progeny originating from these ticks had the capacity to transmit it to the receptor bovine. Even if this bovine did not show classic symptoms of bovine babesiosis by *B. bigemina*, its blood smear showed intra-erythrocytic forms suggestive of *B. bigemina*, which indicated that the receptor bovine was really infected, and was demonstrated by nested-PCR analysis, where a *B. bigemina* specific fragment of the expected size was detected. Given that a *Babesia* sexual phase is required for epithelial cell infection of vector tick intestine, and consequently trans-ovarian transmission^(22,26). It is probable that Seed strain parasite population requires at least third passage in infested bovines with *R. microplus*, so that infected forms are induced for the tick vector. However, further studies are required to prove this hypothesis.

For *B. bovis* BOR clone study, the obtained results coincide with other reported findings, which demonstrate the lack of *R. microplus* transmission of a *B. bovis* attenuated strain through first passage in susceptible cattle^(16,19,20). An explanation for this could be the loss of proteolytic enzymes, which have a function in invasion mechanisms of intestinal cells by parasites⁽¹⁶⁾, a condition probably caused by irradiation, which causes deoxyribonucleic acid (DNA) rupture, totally inactivating genes⁽¹⁴⁾. In spite of these being highly consistent characteristics, the irradiated clone passage through more than two intact animals could revert parasite infectiousness to ticks, as it was observed in this study during the third passage. It is important to highlight that even though parasites were transmitted in the third passage, there was only one parasite found in blood smear after two hours of observation by an expert

bovina, amén de mantener las características deseables que debe reunir un inmunógeno vivo, que sea inocuo. No obstante, se requiere de estudios con un mayor número de pases sucesivos en animales susceptibles, para determinar los mecanismos genético-moleculares involucrados en el desarrollo del parásito dentro del eritrocito -en un bovino inoculado-, o en el intestino de *R. microplus* -formas sexuales-, que permiten al parásito adquirir nuevamente la capacidad patogénica hacia el bovino y la infectiva hacia la garrapata vector, para consecuentemente ser transmitidos de forma trans-ovárica. Estudios del genoma y transcriptoma de las poblaciones atenuadas de Babesia, permitirán identificar los cambios genéticos ocurridos en el genoma y cómo se manifiestan en el transcriptoma de las cepas atenuadas derivadas de cultivo *in vitro*, que se ven reflejadas en un fenotipo atenuado y con capacidad disminuida de ser transmitidas por la garrapata vector.

LITERATURA CITADA

1. Rolls PJ, Bock RE, de Vos AJ, Waldron SJ, Echaide IE. Bovine babesiosis. In: World Organization for Animal Health editor. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2010. Vol 2, [on line]. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.02_bovine_babesiosis.pdf. Accessed Jun 30, 2010.
2. de Vos AJ. Distribution, economic importance and control measures for *Babesia* and *Anaplasma*. En: Dolan TT editor. Recent developments in the control of Anaplasmosis, Babesiosis and Cowdriosis: Proc Workshop, ILRAD, Nairobi, Kenya, 1991:3-12.
3. Callow LL, Mellors LT, McGregor W. Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. *Int J Parasitol* 1979;9(4):333-338.
4. Dalgliesh RJ, Callow LL, Mellors LT, McGregor W. Development of a highly infective *Babesia bigemina* vaccine of reduced virulence. *Aust Vet J* 1981;57:8-11.
5. Bishop JP, Adams LG. *Babesia bigemina*: Immune response of cattle inoculated with irradiated parasites. *Exp Parasitol* 1974;35(1):35-43.
6. Wright IG, Goodger BV, Mahoney DF. The irradiation of *Babesia bovis*. The difference in pathogenicity between irradiated and non-irradiated populations. *Z Parasitenkd* 1980;63:47-57.
7. Yunker CE, Kuttler KL, Johnson LW. Attenuation of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Vet Parasitol* 1987;24:7-13.
8. Hernández OR, Álvarez MJA, Buening GM, Cantó AGJ, Monroy BM, Ramos AJA, *et al.* Diferencias en la virulencia y en la inducción de protección de aislamientos de *Babesia* microscopist, and the nested-PCR test did not detect any genetic material. This can be the result of analytical sensitivity threshold of nested-PCR test, since the presence of at least 30 IE, in a sample of 200 μ l of packed cells, are required, so that sufficient template DNA quantity can be extracted to give a positive result in PCR test^(24,25). Nevertheless, the receptor bovine of larval progeny derived from collected ticks from third passage in bovines, never showed overt bovine babesiosis clinical signs. It has been reported that one *B. bovis* attenuated strain was transmitted by ticks after the 26th passage in splenectomized cows⁽²⁷⁾. Other experiments have demonstrated lack of transmission of a *B. bovis* vaccinal strain after the first passage by *R. microplus* ticks^(16,19,20).

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

B. bigemina BIS and *B. bovis* BOR attenuated strains were not trans-ovarially transmitted by ticks after the second passage in bovines, and did not revert to virulence in subsequent passages from inoculated to susceptible animals. Transmission of attenuated strains by ticks up to a third passage by bovines, an infrequent practice performed in cattle units, decreases risk of parasite dissemination when these are used as live vaccine against bovine babesiosis, besides keeping the desirable characteristics that a live innocuous immunogen must have. Nevertheless, further studies are required with greater number of successive passages in susceptible animals, to determine the molecular-genetic mechanisms involved in parasite development within the erythrocyte -in an inoculated bovine-, and/or *R. microplus* intestine -sexual *Babesia* stage- that allow the parasite to newly acquire pathogenic capacity for the bovine and the infective one for the tick vector, to consequently be trans-ovarially transmitted. Genome and transcriptome studies on *Babesia* attenuated populations will allow identifying genetic changes in the genome and how they manifest in the transcriptome of attenuated strains derived from *in vitro* culture, reflected in an attenuated phenotype and with decreased capacity to be transmitted by the tick vector.

End of english version

TRANSMISIÓN DE CEPAS ATENUADAS DE *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*

- bigemina* derivados de cultivo *in vitro*. *Téc Pecu Méx* 1990;28(2):51-62.
9. Vega CA, Buening GM, Green TJ, Carson CA. *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am J Vet Res* 1985;46(2):416-420.
 10. 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):95-104.
 11. Cantó AGJ, Figueroa MJV, Ramos AJA, Álvarez MJA, Mosqueda GJJ, Vega MCA. Evaluación de la patogenicidad y capacidad protectora de un inmunógeno fresco combinado de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. *Rev Vet Méx* 1999;30(3):215-220.
 12. Cantó AGJ, Álvarez MJA, Rojas REE, Ramos AJA, Mosqueda GJJ, Vega MCA, *et al*. Protección contra babesiosis bovina con una vacuna mixta de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro* bajo una confrontación de campo. Inmunización en un área libre de enfermedad. *Rev Vet Méx* 2003;34(4):323-332.
 13. Gil LA, Higuera B, Orrego J. Vacuna experimental contra *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* producida con atenuación de los parásitos por irradiación. *Rev Med Zoot* 1987;39(1-2):49-57.
 14. Rodríguez SD, Buening GM, Carson CA. Caracterización bioquímica preliminar de clones de *Babesia bovis* irradiadas con cobalto 60. *Téc Pecu Méx* 1993;31(1):16-24.
 15. Cantó AGJ, Figueroa MJV, Álvarez MJA, Ramos AJA, Vega MCA. Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de cultivo *in vitro*. *Téc Pecu Méx* 1996;34(3):127-135.
 16. Álvarez JA, Ramos JA, Rojas EE, Mosqueda JJ, Vega CA, Olvera AM, *et al*. Field Challenge of cattle vaccinated with a combined *Babesia bovis* and *B. bigemina* frozen immunogen. *Ann New York Acad Sci* 2004;1026:277-283.
 17. Shkap V, de Vos AJ, Zweygarth E, Jongejan F. Attenuated vaccines for tropical theileriosis, babesiosis and heartwater: The continuing necessity. *Trends Parasitol* 2007;23(9):420-426.
 18. Timms P, Stewart NP. Growth of *Babesia bovis* parasites in stationary and suspension cultures and their use in experimental vaccination of cattle. *Res Vet Sci* 1989;47:309-314.
 19. Mangold AJ, Aguirre DH, Cafrune MM, de Echaide ST, Guglielmone AA. Evaluation of the infectivity of a vaccinal and a pathogenic *Babesia bovis* strain from Argentina to *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 1993;51:143-148.
 20. O'Sullivan PJ, Callow LL. Loss of infectivity of a vaccine strain of *Babesia Argentina* for *Boophilus microplus*. *Aust Vet J* 1986;42:252-254.
 21. Palmer DA, Buening GM, Carson CA. Cryopreservation of *Babesia bovis* for *in vitro* cultivation. *Parasitol* 1982;84:567-572.
 22. Smith RD. Ciclo biológico de *Babesia* en la garrapata. En: Moreno ChR editor. *Ciencia Veterinaria Vol 2*, UNAM, México. 1978:233-264.
 23. Álvarez JA, Alpírez F, Rojas C, Figueroa JV. Probabilidad diaria de infección para *Babesia spp* mediante PCR anidado. Reunión Científica Tecnológica Forestal y Agropecuaria. Veracruz 2007:419-425.
 24. Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM. Multiplex polymerase chain reaction based assay the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasitol* 1993;50:69-81.
 25. Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Goff WL, Buening GM. Polymerase chain reaction-based diagnostic assay to detect cattle chronically infected with *Babesia bovis*. *Rev Lat Amer Microbiol* 1994;36:47-55.
 26. Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res* 2009;40(2):37-55.
 27. Mafra CL, Patarroyo JH, Silva SS. *Babesia bovis*: Infectivity of an attenuated strain of Brazilian origin for the tick vector *B. microplus*. *Vet Parasitol* 1994;52:139-143.

