

## ENSAYOS DE VACUNACION CONTRA *Babesia bovis* UTILIZANDO ANTIGENOS PROCEDENTES DE CULTIVO *in vitro*

GERMINAL CANTÓ ALARCÓN<sup>1</sup>  
CARLOS A. VEGA Y MURCUÍA<sup>1</sup>  
RONALD SMITH<sup>2</sup>

### Resumen

Antígenos de *B. bovis* obtenidos a partir de cultivos *in vitro* y tratados mediante las técnicas de pervaporación y precipitación fueron utilizados para conocer su respuesta inmunológica en bovinos.

El método de pervaporación consistió en la evaporación a 4C de un 75% del antígeno soluble depositado en un tubo de diálisis, mientras que el método de precipitación se realizó añadiendo una solución saturada de sulfato de amonio al antígeno soluble hasta alcanzar una concentración del 80%.

Se utilizaron 12 bovinos Holstein adultos que se dividieron al azar en tres grupos de cuatro animales cada uno. El primer grupo (A) se inoculó con el antígeno pervaporado, el segundo grupo (B) se inoculó con el antígeno precipitado y al tercer grupo o testigo se le inoculó con solución amortiguadora de fosfatos.

Se obtuvieron datos de temperatura rectal, microhematocrito, parasitemia, respuesta serológica, la cual fue obtenida por la prueba de IFI y supervivencia.

Los tres grupos fueron desafiados con garrapatas infectadas artificialmente. Las respuestas de IFI y el porcentaje de supervivencia obtenidos fueron: en el grupo A, 1:10240 y 75%; en el grupo B, 1:2560 y 50%, y el grupo C, menos de 1:80 y 0%.

Recibido para su publicación el 29 de julio de 1982.

<sup>1</sup> Inst. Nal. de Invest. Pecu., Depto. de Hemoprotozoarios. Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, D.F. México. C.P. 05110.

<sup>2</sup> University of Illinois at Urbana-Champaign. College of Veterinary Medicine. 1101 West Peabody Drive. Urbana, Illinois 61801.

### Introducción

La babesiosis bovina es quizá una de las enfermedades de más interés para la medicina veterinaria, ya que junto con la anaplasmosis causa el mayor número de bajas en el ganado de zonas tropicales y subtropicales.

Los miembros de género *Babesia* no muestran una patogenicidad uniforme, *Babesia bovis* tiene predilección por los capilares del cerebro y riñón, produciendo signos clínicos atribuidos a daños selectivos en estos órganos; en cambio, *Babesia bigemina* está distribuida a través de todos los vasos capilares del organismo del hospedador y los signos clínicos son más consistentes, pues presenta una anemia hemolítica y marcada hemoglobinuria.

Una vez que el ganado ha sido infectado con *Babesia bovis* y se mantiene libre de garrapatas, los organismos son detectables en las células sanguíneas a intervalos entre 3 y 8 semanas. Se afirma que estas recaídas son causadas por fluctuaciones en el nivel de parasitemia, porque en ocasiones la concentración de parásitos en la sangre periférica baja tanto que la infección no puede ser demostrada ni siquiera por la inoculación de 500-1,000 ml de esta sangre a animales esplenectomizados no infectados (Mahoney, 1969).

Existen varios factores no específicos que influyen en el curso de la infección con *Babesia*, pero debido a que sus mecanismos son desconocidos no es posible clasificarlos en categorías definidas tales como resistencia congénita o inmunidad natural. Anderson, Cassaday y Healy (1974) sugieren que los factores concernientes a la inmunidad natural pueden ser importantes

en la resistencia de los hospedadores no naturales. A pesar de la falta de especificidad de la babesia por un hospedador, los intentos por establecer cultivos de parásitos económicamente importantes en animales de laboratorio no han dado resultado.

Se ha encontrado que la inmunización de animales de laboratorio con vacunas inactivadas de merozoitos de *Plasmodium* protegen contra la malaria, y la protección está relacionada con la producción de anticuerpos que impiden la penetración del parásito en los eritrocitos mediante su reacción con el complejo apical (Hamburger y Kreier, 1975; Miller, 1975 y Mitchell, Butcher y Cohen, 1975). De acuerdo con el método para cultivar *Babesia bovis in vitro*, descrito por Exp *et al.* (1978) se han logrado obtener antígenos del sobrenadante que consisten en una gran proporción de formas extracelulares de *Babesia bovis* (Merozoito) y porciones de éstos. Esta forma de *Babesia* se distingue del trofozoito intracelular por tener un complejo apical que facilita la penetración a eritrocitos (Kreier *et al.*, 1975; Grobel y Denning, 1976; Langreth y Rudzinska, 1976). El objetivo de este trabajo fue averiguar si existía una respuesta de tipo humoral ocasionada por antígenos solubles obtenidos a partir de formas de *Babesia* provenientes de cultivos, así como observar el nivel de protección brindada por el uso de antígenos frente al desafío con garrapatas infectadas.

### Material y métodos

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron 12 bovinos de la raza Holstein libres de anticuerpos contra *A. marginale* y *Babesia* spp. de 15 meses de edad. Los animales fueron divididos al azar en tres lotes de cuatro animales cada uno. Se tomó temperatura diariamente de todos los animales durante el experimento y se obtuvieron muestras de sangre para microhematocrito. Se hicieron frotis que fueron teñidos con colorante de Giemsa, para determinar la parasitemia una vez que los animales

reaccionaron con fiebre. Se tomaron muestras de suero para su estudio en la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), la cual fue realizada siguiendo la técnica descrita por Ponce (1979).

El antígeno se obtuvo a partir del cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* descrito por Exp *et al.* (1978). Se recolectó sangre infectada con 1% de parasitemia de un bovino esplenectomizado empleando perlas de vidrio para remover la fibrina. Una vez eliminado el suero, los eritrocitos infectados fueron centrifugados a 1,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se tomó el paquete de eritrocitos y se hizo una suspensión al 50%, en medio de cultivo. *B. bovis* fue cultivada por incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada. Las células en cultivo fueron mantenidas en suspensión por agitación lenta en matraces de movimiento continuo. El medio de cultivo fue reemplazado con intervalos de 24 hs y se realizaron frotis de cultivo cada 24 hs para observar la infección.

Es importante aclarar que siendo éste el primer estudio con antígeno soluble de *B. bovis*, el interés principal era conocer si tenía alguna utilidad práctica, por lo que no se realizó ninguna prueba de laboratorio que nos indicara su composición.

El sobrenadante constituido por el medio de cultivo reemplazado y que contiene las fracciones solubles del parásito fue utilizado como fuente de antígeno. Este sobrenadante se recuperó después de centrifugar la suspensión del cultivo a 1,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente fue centrifugado por segunda vez a 700 g por 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar eritrocitos y células contaminantes, manteniéndose en congelación a -70°C hasta su procesamiento, el cual se hizo por dos métodos diferentes.

Método de Pervaporación. El sobrenadante que contenía el antígeno soluble fue depositado en un tubo de diálisis, el cual fue cerrado herméticamente y se sumergió una cuarta parte del tubo en solución salina fisiológica. Posteriormente se hizo pasar una corriente de aire provocando así

la evaporación a través de pequeñas perforaciones realizadas en la parte superior del tubo de diálisis; se mantuvo todo el sistema en refrigeración a 4C y cuando el volumen se redujo en un 75% se tomó la muestra y se mezcló en volúmenes iguales con el adyuvante incompleto de Freund, inmediatamente antes de utilizarse en la inoculación de los animales.

**Método de Precipitación.** Al sobrenadante se le añadió lentamente una solución saturada de sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración de 80%; este precipitado se centrifugó a 850 g, se desechó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en agua destilada y se hizo la mezcla en volúmenes iguales con el adyuvante incompleto de Freund, inmediatamente antes de utilizarse en la inoculación de los animales. Las inoculaciones se hicieron en dos ocasiones con intervalos de 15 días cada una.

El primer grupo de bovinos fue inoculado subcutáneamente con antígeno obtenido por concentración mediante métodos de pervaporación. El segundo grupo fue inoculado subcutáneamente con antígeno obtenido por precipitación con sulfato de amonio. El tercer grupo, que fungió como testigo, fue inoculado con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) subcutáneamente.

Los animales fueron inoculados por primera vez el día 0, reinoculado el día 14, y 16 días después desafiados con 1,000 larvas de garrapatas *Boophilus microptus* infectadas con *Babesia bovis* (Smith *et al.*, 1978).

## Resultados

En el grupo de animales inoculados con antígeno obtenido por concentración mediante métodos de pervaporación, se observó que se comienza a elevar la temperatura alrededor del día 35 o sea 5 días después del desafío, y el hematocrito comienza a declinar al elevarse la temperatura. En un bovino la temperatura más alta fue de 42C y el hematocrito más bajo fue de 13%,

siendo éste el único animal que murió. La parasitemia apareció en tres animales el día 40 y desapareció en dos el día 44, o sea 15 días después del desafío; aquí la temperatura de estos animales comenzó a descender al límite normal (Gráfica 1), la hemoglobinuria desapareció paulatinamente y los animales volvieron a tener apetito; para el día 49 ya se encontraban en condiciones normales.

En el grupo de animales inoculados con el precipitado del sobrenadante, la temperatura comenzó a elevarse el día 39, llegando a ser mayor de 41C. El hematocrito más bajo que se observó fue de 13% el día 44, el mismo día en que murió el animal. Otro bovino de este grupo murió 2 días más tarde. La parasitemia apareció el día 41 en los cuatro bovinos y desapareció en dos animales el día 45 (Gráfica 2).

El tercer grupo, que fue el testigo, se inoculó con PBS. La temperatura comenzó a elevarse 9 días después del desafío por encima de 41C y el hematocrito disminuyó por debajo del 20%. En este grupo los animales murieron: dos de ellos el día 44 y los otros el día 45 (Gráfica 3).

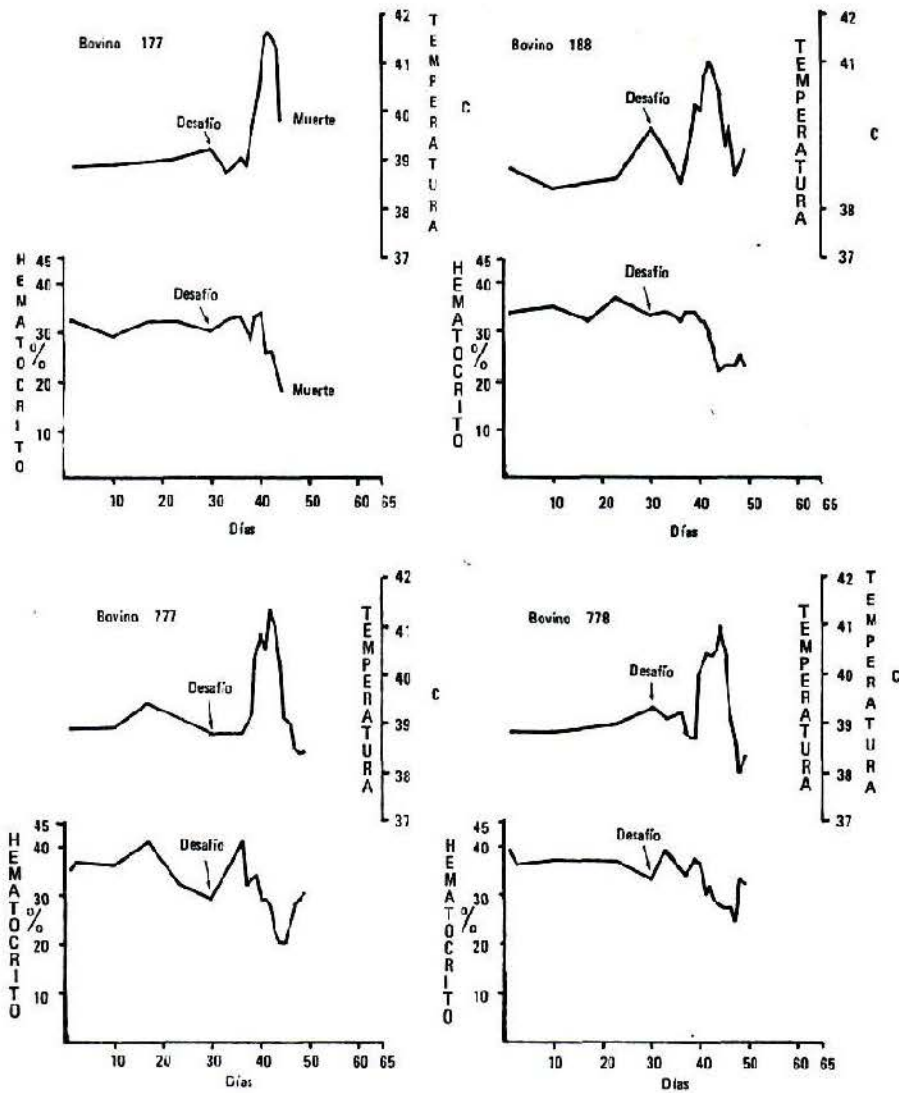
La parasitemia en los tres grupos fue baja, siendo menor del 1% en los grupos inoculados y del 2 al 3% en el grupo testigo. Todos los animales murieron con los signos clásicos de la enfermedad como fue hemoglobinuria muy marcada, postración, salivación excesiva y espumosa, anomalías nerviosas y, por supuesto, un bajo nivel de hematocrito; la temperatura bajó al nivel normal o inferior a él.

Los resultados a la prueba de IFI se pueden observar en la Gráfica 7, donde se muestra que los animales inoculados con el antígeno obtenido por concentración obtuvieron los mayores títulos de anticuerpos (1:10240). En el grupo de animales inoculados con el antígeno obtenido por precipitación se observaron títulos de 1:2560; y en cambio, en los animales que fueron inoculados con PBS se observó que éstos no alcanzaron títulos de 1:80.

Para poder evaluar la infección por *Ba-*

GRAFICA #1

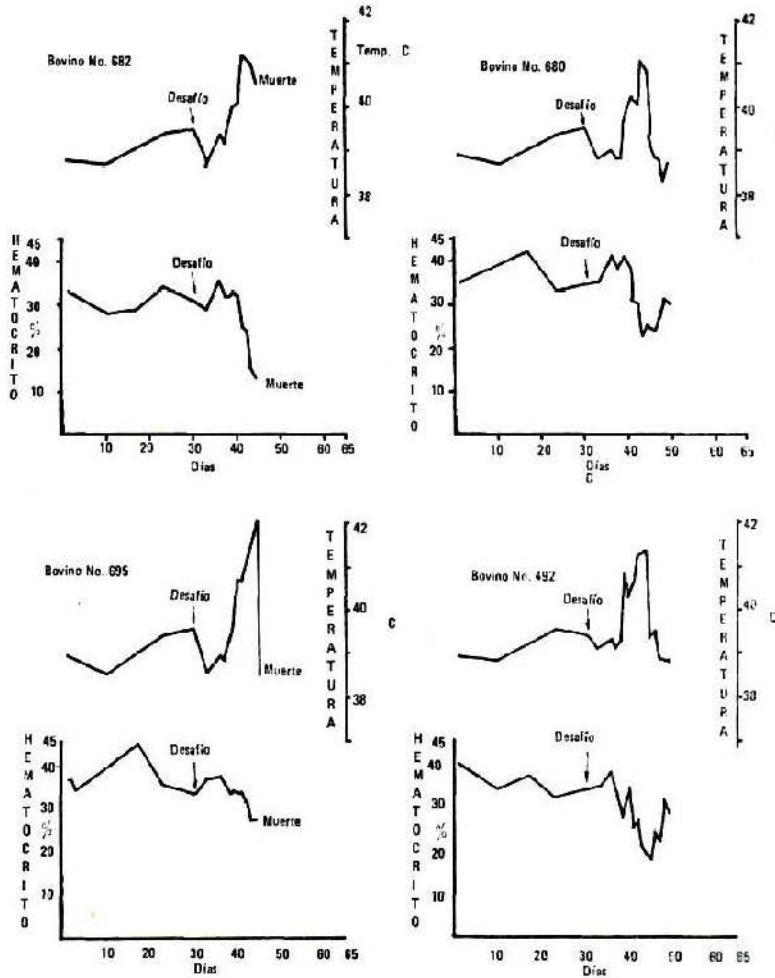
Valores de Temperatura y Hematocrito del grupo de animales inoculados con el concentrado del sobrenadante



El día 45 murió el bovino 177. Estos animales fueron inoculados el día 0 y reinoculados el día 14 con antígeno obtenido por concentración mediante métodos de pervaporación más Adyuvante Incompleto de Freund. El desafío con larvas de garrapatas infectadas con *Babesia bovis* se hizo el día 30.

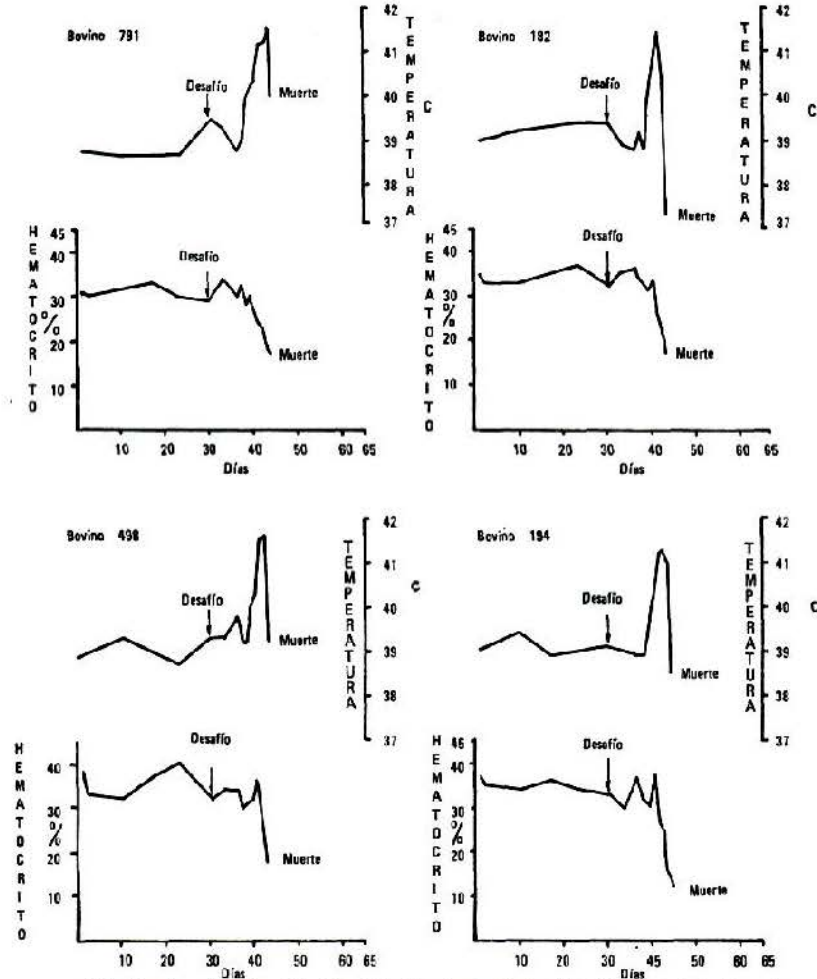
GRAFICA #2

Valores de Temperatura y Hematocrito del grupo de animales inoculados con el precipitado del sulfato amónico



El día 45 murió el bovino 682 y el día 46 murió el bovino 695. Estos animales fueron inoculados el día 0 y reinoculados el día 14 con antígeno obtenido por precipitación con Sulfato de Amonio al 80 más Adyuvante Incompleto de Freund. El desafío con larvas de garrapatas infectadas con *Babesia bovis* se hizo el día 30.

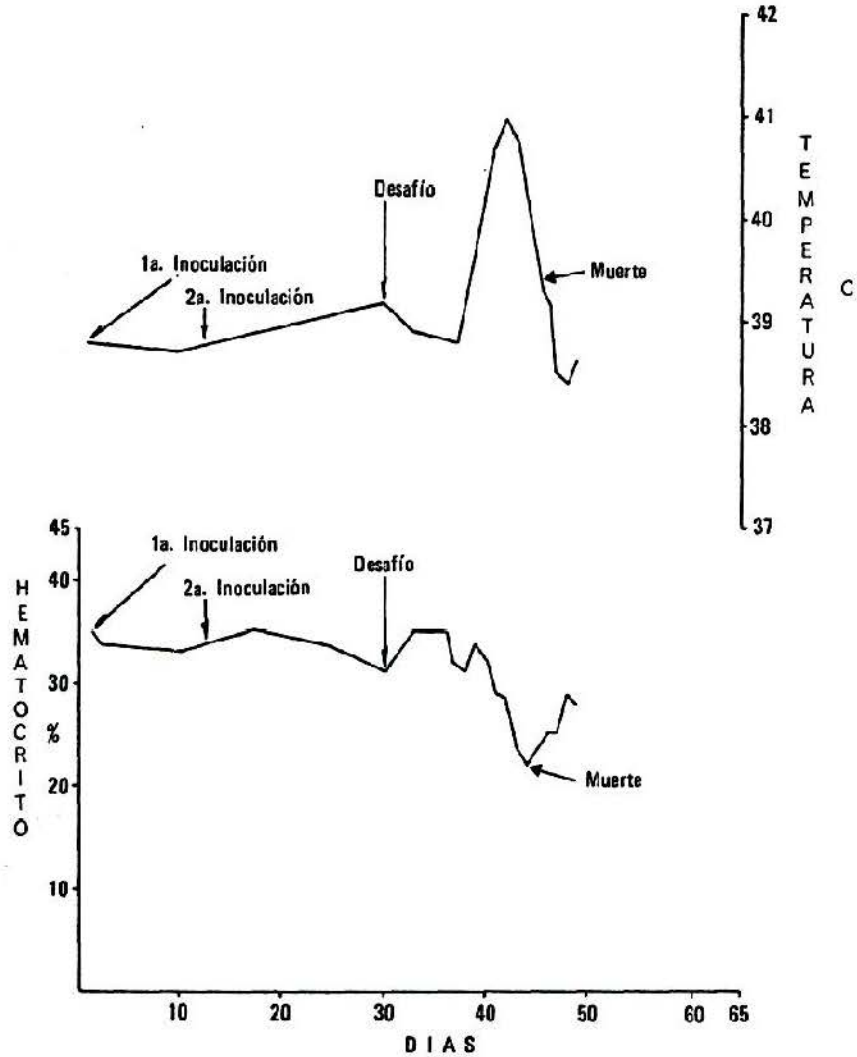
Valores de Temperatura y Hematocrito del grupo de animales teste



El día 44 murieron los bovinos 182 y 498 y el día 45 murieron los bovinos 791 y 194. Estos animales fueron desafiados con larvas de garrapatas infectadas con *Babesia bovis* el día 30.

**GRAFICA 4**

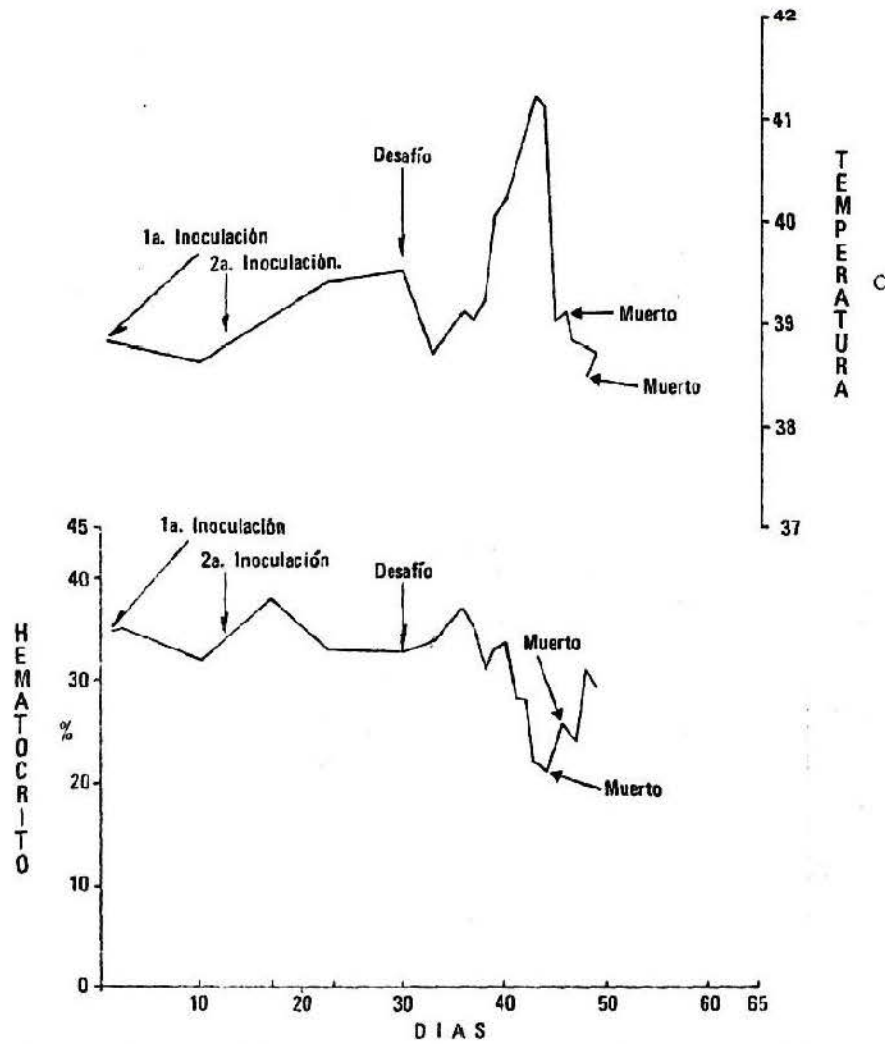
Promedio de Temperatura y Hematocrito del grupo de animales inoculados con el concentrado del sobrenadante



El día 45 murió el bovino 177. Estos animales fueron inoculados el día 0 y reinoculados el día 14 con antígeno obtenido por concentración mediante métodos de pervaporación más Adyuvante Incompleto de Freund. El desafío con larvas de garrapatas infectadas con *Babesia bovis* se hizo el día 30.

**GRAFICA 5**

Promedios de Temperatura y Hematocrito del grupo de animales inoculados con el precipitado del sobrenadante.

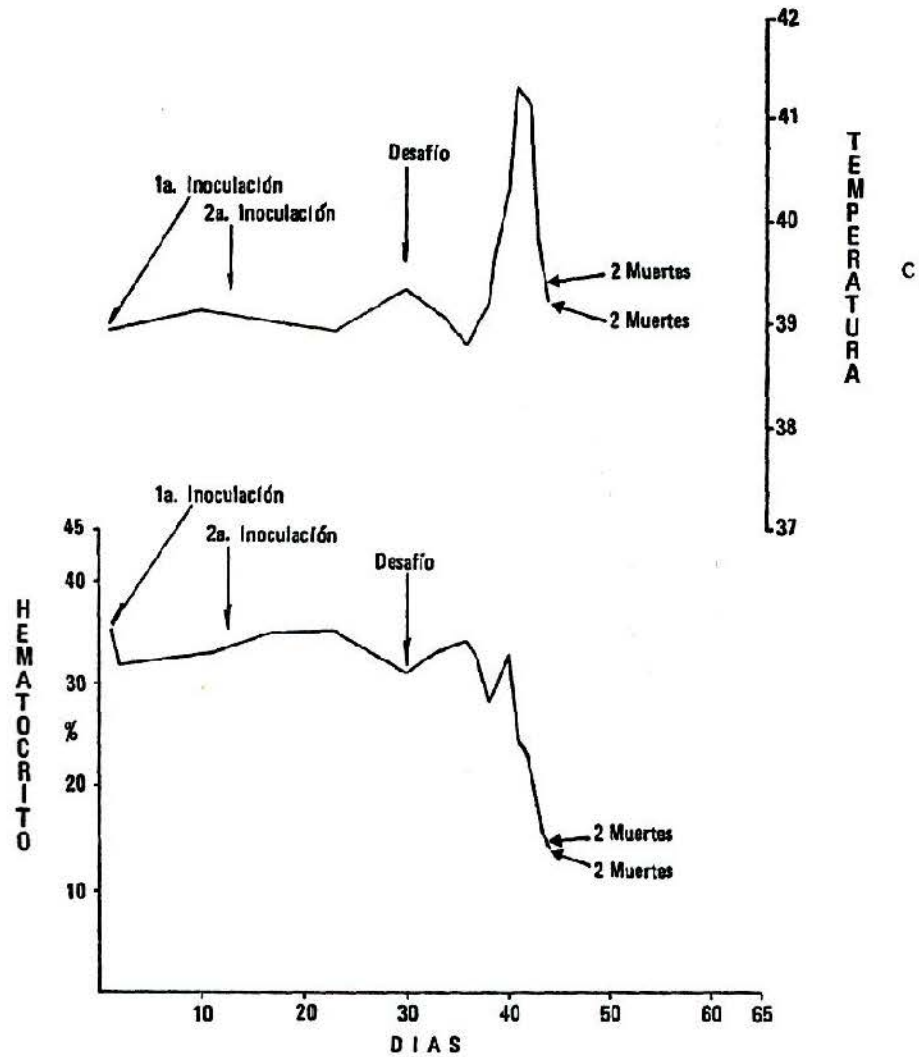


El día 45 murió el bovino 682 y el día 40 murió el bovino 695. Estos animales fueron inoculados el día 0 y reinoculados el día 14 con antígeno obtenido por precipitación con sulfato de amonio al 80 % más Adyuvante Incompleto de Freund. El desafío con larvas de garrapatas infectadas con *Babesia bovis* se hizo el día 30.



**GRAFICA 6**

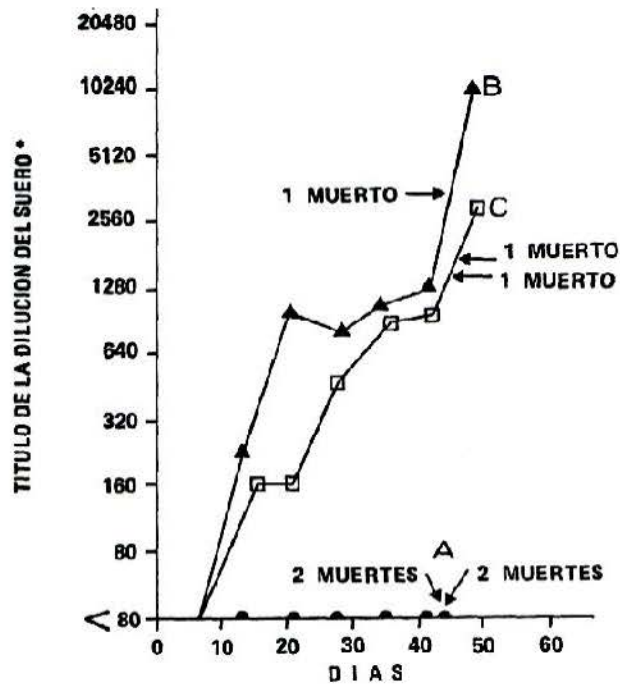
Promedios de Temperatura y Hematocrito del grupo de animales Testigo



El día 44 murieron los bovinos 182 y 498 y el día 45 murieron los bovinos 791 y 194. Estos animales fueron desafiados con larvas de garrapatas infectadas con *Babesia bovis* el día 30.

**GRAFICA 7**

**TITULOS PROMEDIO EN LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA *Babesia bovis* DE LOS 2 GRUPOS DE ANIMALES INOCULADOS Y EL GRUPO TESTIGO**



\* Valores Recíprocos

- A Animales del grupo testigo desafiados con larvas de garrapata infectadas con *Babesia bovis* el día 30. Para el día 44 murieron los bovinos 182 y 498 y para el día 45 murieron el 791 y 194.
- B Los animales de este grupo fueron inoculados los días 0 y 14 con antígeno obtenido por concentración mediante métodos de pervaporación más Adyuvante Incompleto de Freund. El desafío se hizo el día 30. El día 45 murió el bovino 177.
- C Los animales de este grupo fueron inoculados los días 0 y 14 con antígeno obtenido por Precipitación con Sulfato de Amonio al 80% más Adyuvante Incompleto de Freund. El desafío se hizo el día 30. El día 45 murió el bovino 682 y el día 46 murió el 695.

*Besia bovis* se utilizaron cuatro parámetros que son: temperatura, hematocrito, porcentaje de mortalidad y títulos de anticuerpos en la prueba de IFI, siendo éstos los únicos parámetros confiables para poder medir la respuesta de cada animal (Mahoney, 1962). En el presente estudio se observó que la diferencia entre los valores del porcentaje del hematocrito entre los grupos inmunizados y testigo, demuestra una respuesta menos severa a la infección por parte de los grupos inmunizados (Gráficas 4, 5 y 6). El 100% de mortalidad ocurrida en el grupo testigo se atribuye a la falta de defensa contra la infección, mientras que los animales inoculados, aun cuando no fueron protegidos en su totalidad, demostraron una mayor resistencia.

### Discusión

Hamburger y Krcier en 1975 utilizaron animales de laboratorio, los que fueron inmunizados con vacunas de merozoitos de *Plasmodium*. Al desafío encontraron que los animales estaban protegidos y que esta protección estaba relacionada directamente con la producción de anticuerpos.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que en los animales que fueron inoculados con los antígenos su efectividad se comprobó, ya que reaccionaron positivamente a la prueba de IFI, produciendo anticuerpos contra *Babesia bovis* antes de que fueran desafiados con garrapatas infectadas (Gráfica 7). Se ha tomado en cuenta que los antígenos solubles,

aun siendo específicos contra el parásito, no sean los importantes en cuanto a la neutralización del mismo; sin embargo, es posible que los anticuerpos producidos por estas sustancias contribuyan en alguna forma al control de la enfermedad.

### Summary

The bovine immunologic response and the protection induced by *in vitro* culture *B. bovis* antigens obtained through preevaporation and precipitation methods were investigated.

The preevaporation method consisted in the evaporation of the soluble antigen in a dialysis tube at 4 C until it was reduced in a 75% of the original volume. The precipitation method was performed by the addition of a saturated solution of Ammonium Sulphate to the soluble antigen until a concentration of 80% was achieved.

Twelve adult Holstein were divided at random in 3 groups of 4 animals: the first group (A) was inoculated with preevaporated antigen, the second group (B) with precipitated antigen and the last or control group (C) with PBS.

The parameters registered were: rectal temperature, microhematocrit, parasitemia, serologic response measured by IFA test and survival. All the groups were challenged with artificially infected ticks. The average postchallenge titers and survival percentage observed were: group A, 1:10240 and 75%; group B, 1:2560 and 50%; group C, less than 1:80 and 0%.

### Literatura citada

- ANDERSON, A.E., P.B. CASSADAY and G.R. HEALY, 1974, Babesiosis in man, Sixth documented case, *Am. J. Clin. Pathol.*, 62:612-618.
- ERP, E.E., S.M. GRAVELLY, R.D. SMITH, M. RISTIC, M.B. OSORNO and C.A. CARSON, 1978, Growth of *Babesia bovis* in bovine erythrocyte cultures, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27:1061-1064.
- HAMBURGER, J.P. and J.P. KREIER, 1975, Antibody-mediated elimination of malaria parasites (*Plasmodium berghei*) *in vivo*, *Infect. Immun.* 12:339-345.
- GROBEL, E. and H.K. DENNING, 1976, Disulstruktur der throphozoiten und merozoiten von *Babesia herpailuri* in erythrozyten der hauskatze nach behandlung mit imidocarb, *Z. Parasitenk.*, 29:97-112.
- KREIER, J.P., S.M. GRAVELLY, T.M. SEDD, R. SMUCHER and R.M. PFISTER, 1975, *Babesia* spp. the relationship of stage of development to structure of intra and extracellular parasite, *Trop. Med. Parasit.*, 26:9-13.

- LANCZOS, S.G. and L.M. RUDZINSKA, 1976, Feeding mechanisms in extracellular *Babesia microti* and *Plasmodium lephurae*, *J. Protozool.*, 23:215-223.
- MAHONEY, D.F., 1962, The epidemiology of babesiosis in cattle, *Aust. J. Sci.*, 24:310-313.
- MAHONEY, D.F., 1969, Bovine babesiosis: study of factor concerned in transmission, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 63:1-4.
- MILLER, L.H., 1975, Malaria *Plasmodium knowlesi* merozoite. Immunity and the surface coat, *J. Immunol.*, 114:1237-1242.
- MITCHELL, G.F., G.A. BUTCHER and S. COHEN, 1975, Merozoite vaccination, *Immunology*, 29:397-407.
- PONCE, L.I., 1979, Determinación de la probabilidad diaria de infección de *Babesia* spp. de un hato de bovinos en el Centro Experimental Pecuario de Tizimin, Yucatán. Tesis de Licenciatura, *Fac. de Med. Vet. Zoot.*, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- SMITH, R.D., B.M. OSORNO, J. BRENER, R. DE LA ROSA, 1978, Bovine Babesiosis: Severity and reproducibility of *Babesia bovis* infections induced by *Doophilus microplus* under laboratory conditions, *Res. Vet. Sci.*, 24:287-292.