

PATOGENIA DE UNA CLONA IRRADIADA DE *Babesia bovis* OBTENIDA DE CULTIVO *in vitro*^a

ENRIQUE SALAS TELLEZ^b

JUAN GARCIA GARCIA^b

JUAN ALBERTO RAMOS ARAGON^b

EDUARDO RODRIGUEZ DEL ROSAL^b

RAMON ABOYTES TORRES^b

GERALD MATEW BUENING^c

CARLOS AGUSTIN VEGA Y MURGUIA^b

RESUMEN

Estudio realizado para observar los cambios en la hematología y respuesta inmunológica en bovinos inoculados en forma experimental con una clona irradiada de *B. bovis* cultivada *in vitro*. Se utilizaron 11 bovinos de 18 meses de edad, negativos a *Babesia spp.* El primoinóculo se aplicó por diferente vía a cada grupo de dos animales, endovenosa (EV), intramuscular (IM) y subcutánea (SC) con 1×10^8 eritrocitos infectados y 1×10^6 eritrocitos normales por vía IM a dos animales testigo. Se midieron las variables: temperatura corporal, concentración de eritrocitos, leucocitos, plaquetas y hemoglobina; hematocrito, título de anticuerpos y parasitemia. La fiebre y la hematología dependieron de la vía de inoculación utilizada. El grupo EV presentó cambios de temperatura más drásticos. En las variables hemáticas, los cambios no tuvieron significancia estadística aunque resultaron más marcados en el EV. La parasitemia por frotis sanguíneo fue negativa hasta el día 42. Se realizó un pase experimental a animales y al cultivo *in vitro* en ambos casos se demostró la

viabilidad del protozoario. La clona de *B. bovis* utilizada produce alteraciones hemáticas leves que no arriesgan la sobrevivencia del animal. La vía IM fue mejor, por la respuesta de anticuerpos y alteraciones poco significativas en la temperatura y hematología. Se desconoce la capacidad protectora de los anticuerpos detectados.

INTRODUCCION

En las infecciones con *B. bovis*, los bovinos afectados pueden presentar cuadros clínicos severos, de los que algunos animales sobreviven y otros mueren con signos de encefalopatía⁸. Los trastornos hematológicos se creen debidos a la acción de una proteasa liberada por los hemoparásitos⁵.

En un estudio¹⁸ al trabajar con *B. bovis* atenuada por irradiación, se observó que los animales inoculados no mostraban cambios fisiológicos marcados.

En 1983 se estableció un método para la clonación del parásito de donde se obtienen progenies de idéntica genotipia, además se sugirió su utiliza-

a Recibido para su publicación el 22 de octubre de 1987.

b Proyecto Hemoprotozoarios, CIMEVET, INIFAP-SARH. Km. 15.5 Carr. México-Toluca, Apdo. Postal 41-652, México, D.F., C.P. 05110.

c Dept. Veterinary Microbiology, University of Missouri, Columbia, USA.

ción para derivar poblaciones puras que pudieran utilizarse como cepas premunizantes¹⁴.

El presente estudio se realizó con el fin de observar los cambios hemáticos y de respuesta inmunológica en los bovinos, cuando éstos son inoculados con una clona irradiada de *B. bovis* cultivada *in vitro*.

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones en Medicina Veterinaria (CIMEVET), INIFAP-SARH, localizado en el Km. 15.5 de la carretera México-Toluca, México, D.F., a los 19°, 29' y 40" de latitud Norte y a los 99°, 15' y 69" de latitud Oeste, a una altura de 2590 msnm, con una precipitación pluvial media anual de 950 mm³ y temperatura promedio anual de 16°C³.

Se utilizaron 11 animales bovinos no esplenectomizados; ocho de ellos fueron para el primoinóculo, dos para el primer pase y uno para el segundo. Estuvieron en confinamiento total, con agua y alimento a libre acceso. Todos los animales tenían una edad de 18 meses, al examen clínico sanos y resultaron negativos por la prueba de inmunofluorescencia indirecta a anticuerpos en contra de *Babesia spp* así como negativos a la prueba de Fijación de complemento en contra de *Anaplasma marginale*^{9,16}.

El material biológico para el primoinóculo se obtuvo a partir del cultivo *in vitro*⁴ de *Babesia bovis*, en el laboratorio del proyecto de Hemoprotozoarios del CIMEVET-INIFAP-SARH. Se utilizó una clona irradiada a 5 Kilorads y con una fuente de ⁶⁰Co^a.

En el caso del primer y segundo pase, el material biológico fue obtenido de los animales inoculados en el primoinóculo y en el primer pase en forma respectiva.

a Donada por el Dr. Sergio Rodríguez de la Universidad de Missouri, Columbia.

Primoinóculo: Los animales se integraron al azar en cuatro grupos de dos animales cada uno y se inocularon de la manera siguiente: Grupo EV: 1x10⁸ parásitos de *B. bovis* por vía endovenosa. Grupo IM: 1x10⁸ parásitos de *B. bovis* por vía intramuscular. Grupo SC: 1x10⁸ parásitos de *B. bovis* por vía subcutánea. Grupo T testigo: 1x10⁸ eritrocitos normales de bovino mantenidos en cultivo e inoculados por vía intramuscular.

En los animales diario se midieron los siguientes parámetros: Temperatura corporal media por vía rectal; porcentaje de hematocrito de muestras de sangre obtenidas de oreja y cola por el método de microhematocrito^{6,10}; parasitemia, determinada a partir de frotis de sangre obtenida del pabellón de la oreja y de la punta de la cola, se utilizó la tinción de Giemsa, observada al microscopio con objetivo de 100 X y expresada en porcentaje de eritrocitos parasitados¹¹.

Por punción de la vena yugular se extrajo sangre en un tubo que contenía ácido etilendiamino tetracético (EDTA) como anticoagulante, y una muestra en un tubo para obtener suero. La muestra de sangre con EDTA para la biometría hemática y de suero para la determinación de títulos de anticuerpos y concentración de proteínas totales, se tomaron los días: -10, -7, -4, el día de la inoculación y los días 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31 postprimoinóculo (hasta aquí se terminó de hacer la hematología) y se continuó los días 34, 38 y 42 para la determinación de títulos de anticuerpos.

En la biometría hemática se midió: El conteo de eritrocitos y leucocitos por el método de hemocitómetro^{6,10}. La concentración de hemoglobina por el método de la cianometahemoglobina¹¹. El conteo de trombocitos por el método con oxalato de amonio^{6,10}.

Del suero se determinó el título de anticuerpos por el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI)¹³.

De los animales inoculados se tomó sangre y se hizo un primer pase a cultivo *in vitro* en el día 46 postprimoinóculo. Pases:

a) Primer pase *in vitro*: en el día 32, de los animales del primoinóculo, se obtuvo sangre (250 ml de cada uno) y se inocularon dos animales con 750 ml por vía SC.

b) Segundo pase *in vivo*: En el día 29, de los animales del primer pase, se obtuvo sangre y se inoculó un animal con 750 ml por vía SC.

En los animales empleados para el primero y segundo pase *in vivo* se les midieron diario los siguientes parámetros: temperatura por vía rectal; hematocrito de muestras de sangre obtenidas del pabellón de la oreja y de la punta de la cola, y la parasitemia.

En el primer y segundo pases *in vivo* realizados a los animales experimentales libres de babesiosis sólo se tomaron muestras de sangre para

obtener suero para la determinación de títulos de anticuerpos por el método de IFI, los días fueron, para el primer pase *in vivo*: 3, 7, 10, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38, 42 y 45 después del primer pase; para el segundo pase *in vivo* los días fueron: 2, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30, 35, 38 y 41.

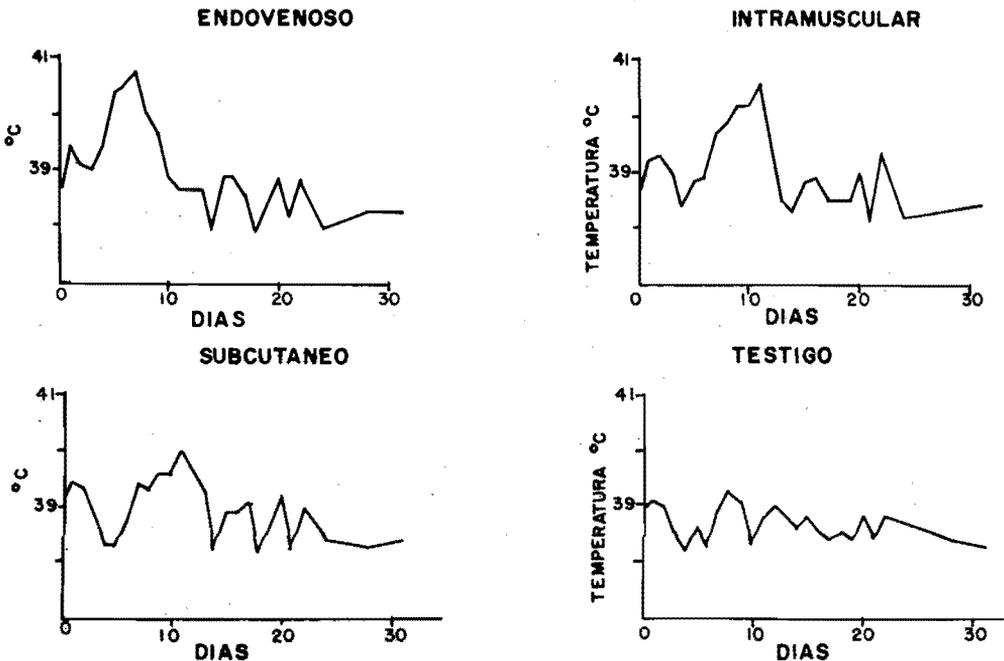
El pase a cultivo *in vitro* de la sangre de los animales del primer pase se realizó en el día 58 posterior a éste.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los promedios de la temperatura rectal de los animales primoinoculados (Gráfica 1), fueron diferentes, según la vía de inoculación utilizada. El primer grupo en presentar fiebre fue el EV que tuvo un valor máximo en el día 7 de 40.8°C, después en el día 11 el IM con 40.6°C y el SC con un valor máximo de 40°C; en el grupo T no existieron cambios significativos. Rogers¹⁵ inoculó por vía EV una cepa atenuada por

GRAFICA 1

VALORES PROMEDIO DE LA TEMPERATURA EN EL PRIMOIINOCULO DE *B. bovis*



pases en animales y señala un valor máximo de temperatura en el día 5 postinoculación con 41.4°C; Rodríguez¹⁴ al utilizar las vías de inoculación EV y SC en el inóculo de una clona primaria de **B. bovis** informó que la ruta EV fue la primera en mostrar alteraciones con un valor máximo de temperatura de 40.5°C en el día 6 y después la SC con 41°C en el día 8 postinoculación. Estos resultados concuerdan con el presente estudio con respecto a que según la vía de inoculación es el tiempo que tarda la presentación de la semiología, aunque en ambos casos la vía EV resultó ser la primera en presentar alteraciones.

La concentración media de eritrocitos en los animales durante el primoinóculo, muestra cambios fluctuantes

sobre todo en el grupo EV e IM, de los que se observó un rápido restablecimiento. En el grupo EV existió una mínima concentración el día 7 con 6.2 millones/mm³, para el IM y SC los valores mínimos fueron de 6.6 y 7.4 millones/mm³ en el día 10 en ambos casos. El análisis estadístico (Cuadro 1) muestra diferencia significativa entre el grupo IM con respecto a los demás. La disminución de los eritrocitos quizá se deba a su destrucción provocada por el protozooario, esto ha sido notificado por distintos autores: Wright¹⁷ señaló una disminución de 2 millones/mm³ en el día 14 postinoculación, Monroy¹² al utilizar larvas de garrapata infectadas con **B. bovis** informa de un descenso notable en el día 16 postinfección con

Cuadro 1. Comparación múltiple de medias entre los distintos grupos y para las variables hemáticas medidas.

	T	EV	IM	SC
Eritrocitos *	6.927 a	6.915 a	6.968 b	6.917 a
Leucocitos *	4.10 a	3.93 b	3.91 b	4.04 a
Plaquetas *	5.746 a	5.674 a	5.653 a	5.729 a
Hemoglobina *	11.84 a	10.28 b	11.98 a	11.67 a
Hematocrito **:				
Oreja	37.32 a	34.9 c	38.42 a	37.46 a
Cola	36.48 a	33.38 b	36.68 a	35.67 a
Yugular	37.15 ab	35.86 a	37.84 b	36.94 ab
VCM (u)	46.33 a	40.95 a	44.39 a	45.47 a
HCM (uug)	14.84 a	12.15 b	13.0 ab	14.22 ab
CHCM (%)	32.62 a	30.47 a	30.96 a	32.31 a

Diferente literal en la misma línea indica diferencia significativa ($P < 0.05$)

* Valores que presentan la transformación a logaritmo.

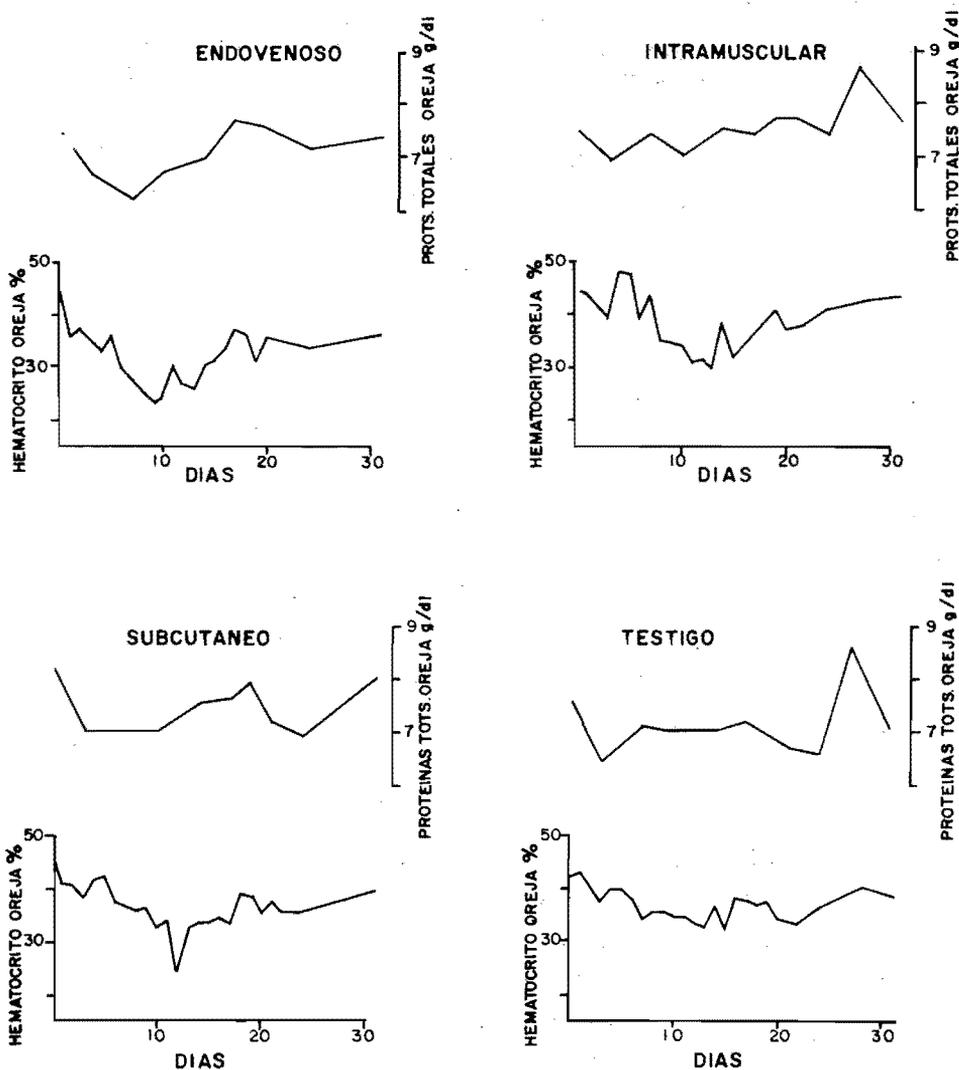
** Valores que presentan la transformación a arcoseno.

VCM= Volúmen Corpuscular Medio; HCM= Hemoglobina Corpuscular Media y CHCM= Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media.

2.8 millones/mm³; ninguno de estos casos concuerda con nuestros resultados debido a que se obtuvo una semiología más rápida en su presentación y menos drástica en la disminución de concentración de eritrocitos, lo cual se atribuye a un rápido desarrollo del parásito irradiado.

En la concentración de hemoglobina para los cuatro grupos, se puede observar que la caída más drástica existió en el grupo EV en el día 7 (6.2 g/dl), los grupos IM y SC tuvieron un valor mínimo de 9.7 y 9.0 g/dl, en forma respectiva en el día 12. El análisis estadístico (Cuadro 1) encon-

GRAFICA 2
 PORCENTAJE PROMEDIO DE HEMATOCRITO Y CONCENTRACION DE PROTEINAS TOTALES DE SUERO DE OREJA EN EL PRIMOCULO DE **B. bovis**



tró diferencias entre el grupo EV con respecto a los demás grupos. Los cambios ocurridos en la concentración promedio de hemoglobina resultan ser ligeros si se les compara con los obtenidos por Rogers¹⁵ quien notificó una baja en la cantidad de hemoglobina a partir del día 7 y alcanzó un valor mínimo de 4.1 g/dl en el día 8 postinoculación, o Wright¹⁷ quien al trabajar con *B. bovis* irradiada en ganado esplenectomizado observó una disminución en la cantidad de hemoglobina a partir del día 10 hasta llegar a valores menores de 5 g/dl en el día 14 postinoculación; o bien Monroy¹² menciona un decremento marcado a partir del día 12 con valores de 5.5 g/dl en el día 16 postinfección.

Concentración media de leucocitos: los grupos EV e IM presentaron a lo largo del estudio valores menores en comparación con los grupos SC y T; los grupos EV, IM y SC mostraron sus menores valores de 5000, 7200 y 7500/mm³ en el día 7 después del primer inóculo con una rápida recuperación. El análisis estadístico indica diferencia significativa entre los grupos EV e IM con respecto al SC y T (Cuadro 1). Se encontraron diversos datos con respecto a las alteraciones que provoca la babesiosis en la cantidad de leucocitos, Wright¹⁷ notificó una leucocitosis de 24000/mm³, en cambio Monroy¹² y Larios, Smith y Monroy⁷, informan de una leucopenia de 5000 y 2900/mm³, en forma respectiva; en el presente trabajo aún cuando existió cierta disminución en los valores (más aparente en los grupos EV e IM), no sobrepasó los valores normales.

En el comportamiento de los trombocitos, los grupos EV e IM son los que mostraron mayores alteraciones, que se presentaron primero en el EV y después en el IM; los menores valores para el EV fueron de 90 000/mm³ en el día 7 y para el IM de 140 000/mm³ en el día 10; el SC presentó su menor valor en el día 17 con 340 000/mm³. Con el análisis estadístico (Cuadro 1) no se

encontró diferencia significativa entre los grupos; sin embargo, es importante resaltar que el grupo EV presentó una caída en sus valores fuera del rango normal aún cuando su recuperación fue rápida y en forma ascendente. Dagliesh y col.², Monroy¹² y Larios, Smith y Monroy⁷, describen una trombocitopenia en bovinos infectados con *B. bovis*, fenómeno que al parecer ocurrió sólo en el grupo EV del presente estudio.

Cuadro 2. Coeficientes de correlación tomando como base el Hematocrito de oreja con respecto al Ht de cola y yugular para los distintos grupos.

GRUPOS	Ht oreja/ Ht cola	Ht oreja/ Ht yugular
TESTIGO	0.5361	0.6505
SUBCUTANEO	0.7438	0.8673
ENDOPERIÓDICO	0.6261	0.6190
INTRAMUSCULAR	0.5835	0.6112

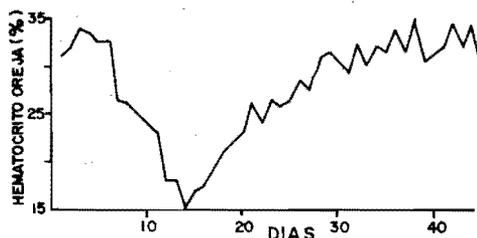
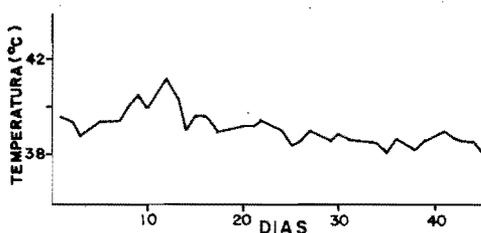
(P < 0.01)

Ht = hematocrito.

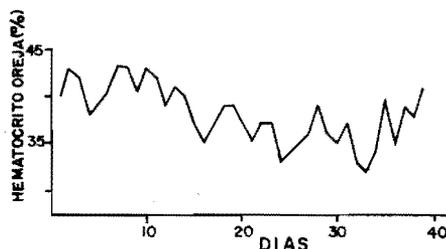
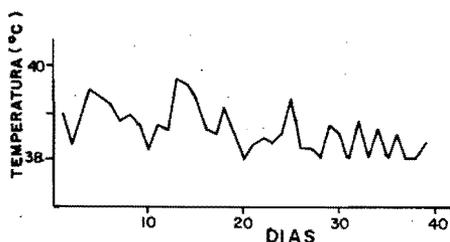
En los porcentajes de hematocrito obtenidos (Gráfica 2), para el primoinóculo los valores mínimos correspondieron al grupo EV con un valor menor de 25% en el hematocrito de oreja y cola, ya que para el hematocrito de yugular el menor valor lo tuvo el SC con 25%. En la comparación de medias para los hematocritos (Cuadro 1) los resultados fueron: en el hematocrito de oreja existió diferencia entre el grupo EV e IM, para el hematocrito de cola el EV fue diferente de los demás grupos y por último en el hematocrito de yugular el EV difirió del SC, IM y T, así como este último del SC. Los datos obtenidos no coinciden con los de Rogers¹⁵ quien menciona valores mínimos obtenidos de 13% de hematocrito en el día 10 postinoculación, ni con Monroy¹² que en el día 10 postinóculo obtiene un hematocrito de 19%, igual que Rodríguez¹⁴ sólo que éste en el día 13. De tal forma los cambios ocurridos resultan no ser significativos al ser comparados con otros estudios, debido quizá a las características intrínsecas de la clona irradiada.

GRAFICA 3
VALORES DE TEMPERATURA Y PORCENTAJE
DE HEMATOCRITO DE OREJA PARA LOS PASES DE
B. bovis

PRIMER PASE



SEGUNDO PASE

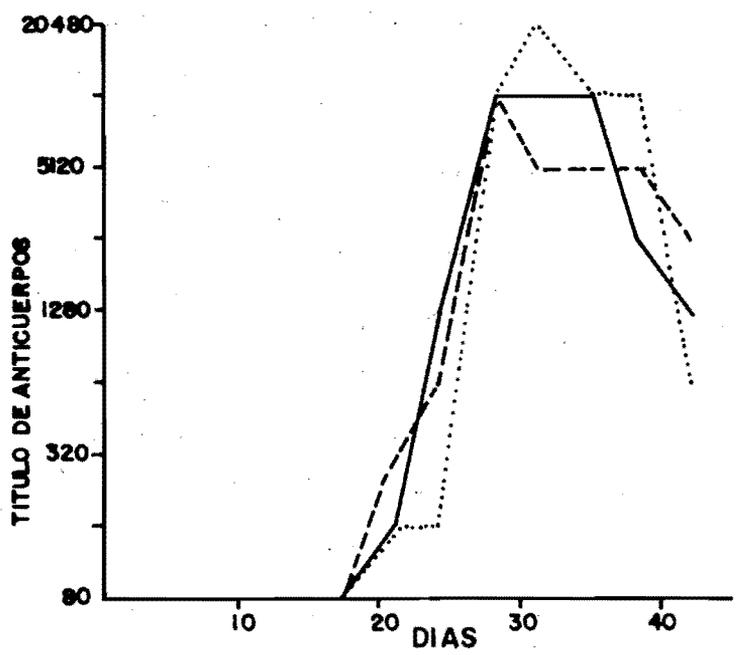


En cuanto a los cambios ocurridos en la temperatura para los dos pases (Gráfica 3), se observa en el primer caso un valor máximo de 41.2°C en el día 12 posterior al primer pase y para el segundo pase un temperatura máxima de 39.7°C en el día 13 posterior al segundo pase. Rodríguez¹⁴ realizó un pase a animales con la obtención de sangre de animales antes inoculados con una clona primaria de **B. bovis**, mezcló las sangres obtenidas y dividió el volumen total para inocular una parte por vía EV y la restante por vía SC con lo que obtuvo dos tipos de respuesta, una temprana con un valor máximo de 41°C en el día 4, y otra de 40°C en el día 11 después del pase. El resultado de los pases no siempre es la

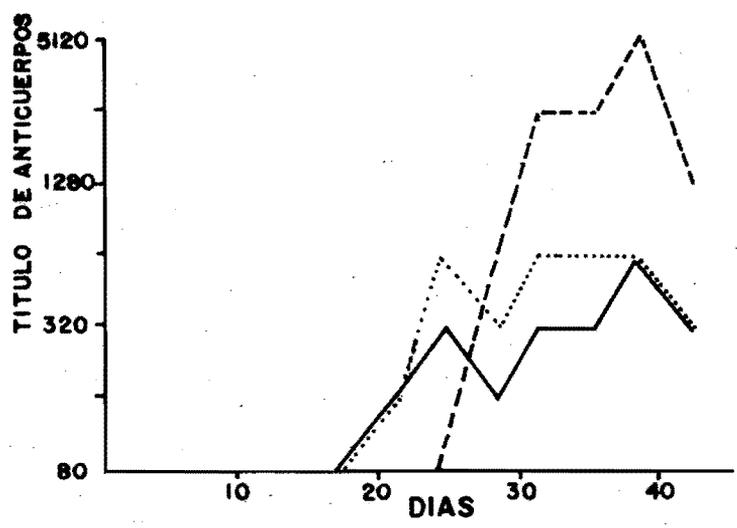
atenuación del parásito, sino que es posible aumentar su virulencia, esta variante se muestra tanto en el pase efectuado por Rodríguez¹⁴ como en el presente estudio, en donde la cepa en apariencia aumentó su grado de patogenicidad al ser transmitida la primera vez. Sin embargo, dicha exacerbación no se observó en el segundo pase.

Los coeficientes de correlación en el primoinóculo se obtuvieron para determinar si existía diferencia entre cuantificar el hematocrito obtenido de muestras de oreja, cola y yugular; en los resultados (Cuadro 2) se observa que éstos fueron significativos, lo cual señala una estrecha correlación entre los mismos.

GRAFICA 4
TITULOS DE ANTICUERPOS EN EL PRIMOCINOCULO
DE B. bovis



..... ENDOVENOSO
 - - - - INTRAMUSCULAR
 ——— SUBCUTANEO



En los índices de Wintrobe: El volumen corpuscular medio y la concentración de hemoglobina corpuscular media no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los grupos, sin embargo, en hemoglobina corpuscular media existe diferencia ($P < .05$) entre el grupo EV y el T, lo que resulta indicativo de una posible anemia normocítica hipocrómica para el grupo EV (Cuadro 1).

Se estimó la parasitemia causada por el primoinóculo, que fue negativa en los 42 días del estudio, por lo que se determinó hacer un primer y segundo pase tanto a animales experimentales susceptibles, así como intentar el aislamiento del protozooario en el cultivo *in vitro* y de esta manera demostrar la presencia y viabilidad del parásito. Los animales utilizados en el primer pase comenzaron a presentar parasitemia en el onceavo día con un 0.21%; en el segundo pase, en el animal utilizado no se encontró parasitemia durante los 39 días del seguimiento.

En el primer pase hecho al cultivo *in vitro* los parásitos aparecieron 10 días posteriores al primer pase y se mantuvieron en cultivo durante 15 días donde se obtuvo una parasitemia menor al 1%. Para el segundo pase al cultivo *in vitro*, los parásitos aparecieron a los 15 días después del pase, se mantuvieron en cultivo durante 15 días y alcanzaron una parasitemia del 2.8%.

Del porcentaje de hematocrito para el primer y segundo pase (Gráfica 3), en el primer pase existe un descanso rápido a partir del día 6 hasta alcanzar su valor mínimo en el día 14 con un 15% de hematocrito para después restablecerse en forma rápida. En el caso del segundo pase no hay alteraciones significativas dentro del comportamiento del porcentaje de hematocrito durante todo el seguimiento. Nuestros resultados del primer pase no concuerdan con los de Rodríguez¹⁴ que al efectuar la inoculación de *B. bovis* y un pase consecutivo, obtuvo en el caso

del pase un hematocrito mínimo de 19% en el día 19 después del pase, aún cuando fue un poco más tardía esta respuesta comparada con la muestra, es importante señalar que en ambos casos en apariencia se vió aumentado el grado de patogenicidad de *Babesia* al ser transmitida en forma experimental.

Con respecto a la concentración de anticuerpos, al presentar los datos para el primoinóculo se dividieron los resultados en dos gráficas (Gráfica 4), la gráfica superior muestra a los animales que tuvieron los títulos más altos y la inferior a los de los más bajos, así el grupo IM en ambos casos presentó altos y duraderos títulos de anticuerpos, con un inicio de la respuesta en el día 17 postprimoinóculo. En el primer pase la respuesta de anticuerpos se presentó rápido, comenzó el día 3 posterior al primer pase y alcanzó su valor máximo el día 17 para mantenerse estable durante los días restantes. En el segundo pase la respuesta resultó tardía (día 20) sus máximos títulos los tuvo el día 27 para descender en forma constante. Se señala que la presencia de anticuerpos no siempre es indicativa de protección¹ este concepto resulta importante debido a que en el presente estudio no se realizaron desafíos con cepas de elevado grado de patogenicidad, por lo que se desconoce la capacidad protectora de los anticuerpos detectados.

SUMMARY

An irradiated clone of *B. bovis* developed and grown *in vitro* was inoculated experimentally to eleven 18-months old calves, in order to assess the produced haematologic changes and antibody response. Animals used with the first inoculum were randomly divided in four groups of two calves, and inoculated endovenously (EV), intramuscularly (IM) and subcutaneously (SC) with 1×10^8 infected red blood cells. A control group received 1×10^8 non-infected erythrocytes IM. Blood samples were taken daily; temperature, packed cell volume, red blood cell count, total leucocyte count, platelets, hemoglobin, IFA test antibody titer and parasi-

temia were determined. Fever and haematologic changes appeared earlier depending on the inoculation route. EV group showed the most severe changes, although haematologic parameters were poorly significant. Giemsa stained blood smears yielded a negative parasitemia during this 42 day experiment. On the 32th day, a pass to other healthy calves and to the *in vitro* culture was done. It demonstrated viable *Babesia* parasites. *Babesia bovis* irradiated clone developed *in vitro* caused slight haematologic changes with no risk for animals survival. Because the IM group yielded a good Ab response without significant rectal temperature and haematologic alterations, it might be an optimal immunization route. It is not known whether the observed antibody response of calves is protective or not.

LITERATURA CITADA

- 1 CANTO, G.J., VEGA, C.A. y SMITH, R.D., 1982. Vacunación contra *Babesia bovis* utilizando antígenos procedentes de cultivo *in vitro*. *Téc. Pec. Méx.*, 43:43.
- 2 DAGLIESH, R.J., DIMMOCK, C.K., HILL, M.W.M. and MELLORS, L.T., 1976. *Babesia argentina*. Disseminated intravascular coagulation in acute infections in splenectomized calves. *Exp. Parasitol.*, 40:124.
- 3 D.E.T.E.N.A.L., 1982. Cartografía del Territorio Nacional. Dirección de estudios del Territorio Nacional (DETENAL), México, 1982 Secretaría de Programación y Presupuesto, D.F.
- 4 FIGUEROA MILLAN, J.V., 1984. Cultivo *in vitro* de *Babesia bovis*: Establecimiento del sistema fase estacionaria microaerofílica y condiciones óptimas de multiplicación. Tesis de Licenciatura Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. México, D.F.
- 5 GOODGER, B.V., 1978. *Babesia bovis* (= *argentina*); Changes in erythrocytic and associated proteins during acute infection of splenectomized and intact calves. *Z. Parasitenkd.*, 55:1.
- 6 HENRY, J.B., 1979. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 16a. edition, **W. B. Saunders Company** USA.
- 7 LARIOS, F., SMITH, R. and MONROY, J., 1980. Pathophysiology of calves infected with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Proceedings: Progress in Bovine Anaplasmosis and Babesiosis. Mexico City, p.47-55.
- 8 LARIOS, F., 1981. A pathophysiological study of *Babesia bovis* (virus lent and attenuated strain) in Splenectomized calves. M. Sc. Thesis University of Illinois, Urbana-Champaign. Illinois, USA.
- 9 MAHONEY, D.F., 1967. Bovine babesiosis: preparation and assessment of complement fixing antigens. *Exp. Parasitol.*, 20:232.
- 10 MEDWAY, W., PRIER, S., JAMES, E. and WILKINSON, J., 1969. Veterinary Clinical Pathology. **The Williams and Wilkins Co.** Baltimore, USA.
- 11 MERCK, E., 1984. Medico-Chemical Investigation Methods. Darmstadt, Federal Republic of Germany.
- 12 MONROY, B.J., 1980. Alteraciones hemáticas y de química sanguínea en bovinos expuestos experimentalmente a larvas de garrapata infectadas con *Babesia bovis*. Tesis de Licenciatura, ENEP-Cuautitlán, México.
- 13 PONCE, I.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. y Zoot. UNAM, México, D.F.
- 14 RODRIGUEZ, S.D., 1983. Development of a modified *in vitro* cultivation technique for *Babesia bovis* and its adaptation for cloning. M.Sc. Thesis. University of Missouri-Columbia.
- 15 ROGERS, R.J., 1971. Observations on the pathology of *Babesia argentina* infections in cattle. *Aust. Vet. J.*, 47:242.
- 16 ROSS, J.P.J. and LOHR, K.F. 1968. Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. *Res. Vet. Sci.* 9:557.
- 17 WRIGHT, I.G., 1973. Observations on the haematology of experimentally induced *Babesia argentina* and *B. bigemina*. *Res. Vet. Sci.* 14:29.
- 18 WRIGHT, I.G., MAHONEY, D.F., MIRRE, G.B., GOODGER, B.V. and KERR, J.D., 1982. The irradiation of *Babesia bovis* II. The immunogenicity of irradiated blood parasites for intact cattle and splenectomized calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 3:591.