

DIFERENCIAS EN LA VIRULENCIA Y EN LA INDUCCION DE PROTECCION DE AISLAMIENTOS DE *Babesia bigemina* DERIVADOS DE CULTIVO *in vitro*.*

Rubén Hernández Ortiz^a

J. Antonio Alvarez Martínez^a

Gerald M. Buening^b

Germinal J. Cantó Alarcón^a

Mario Monroy Basilio^a

J. Alberto Ramos Aragón^a

Carlos A. Vega y Murguía^a

RESUMEN

El uso del cultivo *in vitro* de *B. bigemina* permite la obtención de diferentes subpoblaciones, de las cuales se desconocía su comportamiento en bovinos susceptibles. En este estudio se evaluó el efecto de tres aislamientos derivados de cultivo *in vitro*: el aislamiento original, uno irradiado y un tercero clonado e irradiado, además de un cuarto aislamiento obtenido de un caso de campo. Cuatro grupos de cuatro animales cada uno fueron respectivamente inoculados por vía intramuscular. Un quinto grupo de animales no infectados sirvió como grupo testigo. Los cuatro aislamientos fueron capaces de multiplicarse. Solo en los bovinos inoculados con el aislamiento de campo se observó una forma clínica de la enfermedad, con marcados cambios en los valores de temperatura rectal, hematocrito, hemoglobina y conteo de glóbulos rojos y cuyas parasitemias fueron mayores y más prolongadas. En contraste, los aislamientos derivados *in vitro* se consideraron menos virulentos, ya que los cambios hematológicos fueron menos severos que los inducidos por la cepa de campo. Al desafío, el aislamiento de cultivo no irradiado y el de campo indujeron protección, no solo contra los signos clínicos sino aparentemente también contra la infección.

Téc. Pec. Méx. Vol. 28 No. 2 (1990)

INTRODUCCION

Una de las enfermedades más importantes del ganado en las áreas tropi-

cales y subtropicales del mundo es la babesiosis bovina, transmitida por garrapatas, causada por parásitos intraeritrocíticos del género *Babesia*¹⁵. En America Latina *Babesia bigemina* y *B. bovis* son los agentes causales de la enfermedad y responsables de grandes pérdidas económicas para la industria ganadera. En México se estimó que la babesiosis bovina ocasionó pérdidas anuales por 2,700 millones de pesos en 1980 (más de 100 millones de dolares) lo cual equivale al 6.5% del total de pérdidas causadas por enfermedades infecciosas en los

* Parcialmente financiado por la Agencia para el desarrollo Internacional, EE. UU. A. No. DPE-5542-G-55-3014-00. Parte de este trabajo corresponde a la tesis de Maestría del primer autor en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Becario CONACYT No. 54249.

a CENID-Parasitología. INIFAP-SARH. Apdo. Postal No. 206, CIVAC, Estado de Morelos C.P. 62500, MEXICO.
b Depto. Microbiología Veterinaria. Universidad de Missouri. Columbia, MO. 65211, EE. UU. A.

animales domésticos¹⁷.

Se sabe que animales recuperados de *Babesia* spp son resistentes a la reinfección, por lo que durante muchos años se ha utilizado la premunición, la cual consiste en la inoculación de ganado susceptible con glóbulos rojos infectados con *Babesia* viva procedente de animales portadores y después aplicar un tratamiento específico, como método preventivo¹³. Recientemente se han utilizado métodos alternos de inmunización. Un inmunógeno vivo de *B. bovis* de reducida virulencia fue obtenido después de varios pases rápidos por inoculación parenteral en becerros esplenectomizados^{4,5}. De la misma manera, pases lentos por inoculación parenteral en becerros intactos han servido para seleccionar una población de *B. bigemina* altamente infectiva de reducida virulencia⁷. Otros métodos para modificar la virulencia de *B. bigemina* incluyen el uso de radiaciones sobre sangre infectada².

La metodología de cultivo *in vitro* para babesias bovinas se ha descrito como posible fuente de inmunógenos vivos^{12, 19, 24, 25}. Recientemente se ha demostrado que *B. bovis* derivadas *in vitro* normales e irradiadas, parecen ser de reducida virulencia cuando son inoculadas en animales susceptibles^{3, 20}. El objetivo de este estudio fue evaluar la infectividad e inmunogenicidad de subpoblaciones vivas de *B. bigemina* derivadas *in vitro* e irradiadas.

MATERIALES Y METODOS

Bovinos experimentales - Veintiun becerros Holstein de 18 meses de edad, fueron seleccionados de una área libre de garrapatas y *Babesia*. Se comprobó que los animales estaban libres de anticuerpos contra *Babesia* spp

por medio de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)⁸. Estos fueron alojados en corraletas individuales con piso de concreto, proporcionándoles agua y alimento *ad libitum*.

Parásitos de *Babesia bigemina* - Se seleccionaron cuatro poblaciones para usarse en este estudio:

“A”: Un aislamiento mexicano derivado de cultivo *in vitro*, aislado en 1985 y propagado continuamente bajo condiciones *in vitro*²⁴.

“B”: Uno cultivado *in vitro* derivado de “A”, expuesto a 7 Krads con una fuente de ⁶⁰Co en las instalaciones de la Universidad de Missouri, U.S.A. y mantenido continuamente bajo condiciones de cultivo.

“C”: Una clona derivada de “A”, expuesta a 7 Krads con una fuente de ⁶⁰Co, reclonada y mantenida continuamente bajo condiciones de cultivo²⁵.

“D”: Un aislamiento mexicano derivado *in vivo*, aislado de un brote de campo en Texcoco, México en el año de 1984, y mantenida almacenada en nitrógeno líquido o por pases por vía parenteral en animales intactos.

Garrapatas- *Boophilus microplus*, libres de *Babesia* spp. obtenidas de la colonia que se mantiene en el Laboratorio de la División Hemoprotozoarios desde 1978.

INOCULACION PRIMARIA - Veinte becerros fueron divididos en cinco grupos de cuatro animales. El día cero, cuatro grupos fueron inoculados por vía intramuscular con 10 glóbulos rojos infectados (GRI), con cada una de las subpoblaciones de *B. bigemina* descritas anteriormente. El grupo 5 fue inoculado con una cantidad similar de glóbulos rojos no infectados por la misma vía.

Cada 3-4 días comenzando el día cero y durante 28 días, se registraron

datos de temperatura rectal y se colectaron muestras sanguíneas para determinar cambios en el porcentaje de hematocrito (Ht), proteínas plasmáticas totales (PPT), hemoglobina (Hb), glóbulos rojos (GR) y glóbulos blancos (GB)¹. Se prepararon frotis teñidos con colorante de Giemsa para detectar la parasitemia y los resultados se expresaron como porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP). Al mismo tiempo, se colectaron muestras de suero para determinar los títulos de anticuerpos contra *B. bigemina* por el método de IFI⁸. Utilizando como antígeno un aislamiento heterólogo derivado de cultivo *in vitro* y como conjugado anticuerpos anti-IgG bovina conjugada con fluoresceína preparada en conejo (SIGMA F.7509), considerando como positivos títulos iguales o superiores a 1:80.

DESAFIO - En un bovino se colocaron 5,000 larvas de *B. microplus* libres de *Babesia* cada 48 horas por cinco ocasiones. Quince días después de la primera infestación, fue inoculado con el aislamiento de campo (D). Se colectaron las hembras adultas desprendidas en forma natural y fueron seleccionadas aquellas positivas en la prueba de hemolinfa²². La progenie de estas últimas se utilizó para la confrontación.

Dos animales de cada grupo fueron desafiados con 20,000 de las larvas infectadas por animal, descritas anteriormente, el día 277 posterior a la inoculación primaria. Cada 3-4 días y por un lapso de 4 semanas se registraron los valores de temperatura rectal, hematológicos y de anticuerpos mediante la técnica de IFI como en la inoculación primaria. Los diez animales restantes fueron infestados con garrapatas libres de *Babesia* spp para determinar la transmisibilidad de los

diferentes aislamientos por *Boophilus microplus* (Datos enviados para su publicación).

RESULTADOS Y DISCUSION.

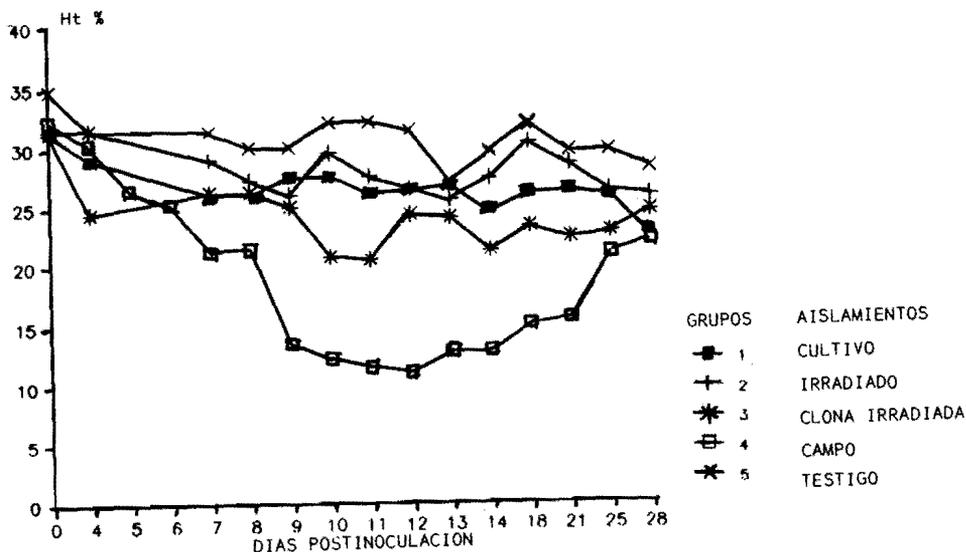
INOCULACION PRIMARIA - Solo un animal del grupo 2 y uno del grupo 3 mostraron incremento en la temperatura a 39.6 C el día 21 y 39.9 C el día 11 PI respectivamente. En los animales del grupo 4 se observaron aumentos en los valores de temperatura de 39.5 C desde el día 4 post-inoculación (PI), alcanzando valores máximos de 40.2 C en un animal el día 11 PI. La mayoría de los animales inoculados con el aislamiento de campo tuvieron incremento en la temperatura.

Solo en los animales del grupo 4, se observó una disminución en los valores de PPT inferior al rango normal²¹.

El porcentaje mínimo promedio de hematocrito por muestreo, en ninguno de los grupos inoculados con *B. bigemina* procedente de cultivo *in vitro* fue inferior a 20%, en tanto que en el grupo de animales inoculados con el aislamiento de campo, se observaron valores promedio por muestreo de 11 a 15% entre los días 9 a 18 PI (Gráfica 1).

En cuanto a los valores de hemoglobina en un animal del grupo 1 y tres animales del grupo 3 presentaron valores inferiores al rango normal²¹, los cuales oscilaron entre 6.5 y 7.5 g/dl. En tanto que los cuatro animales del grupo 4, presentaron los valores más bajos registrados durante el experimento, los cuales variaron entre 4-5 g/dl entre los días 11 y 14 PI. El promedio de este grupo fue el único con valores inferiores al normal²¹ (Gráfica 2).

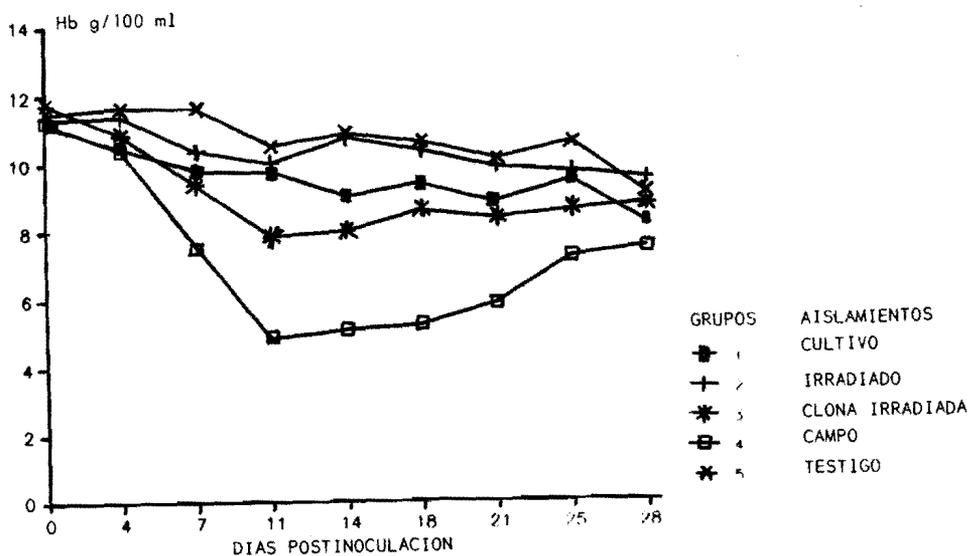
En todos los animales se observaron valores de glóbulos rojos inferior-



GRAFICA 1. PORCIENTO DE HEMÁTOCRITO PROMEDIO DE BOVINOS INOCULADOS CON CUATRO DIFERENTES AISLAMIENTOS DE *Babesia bigemina**.

Día 0: Inoculación de eritrocitos infectados con *B. bigemina* vía intramuscular, en grupos de cuatro animales cada uno.

* Tres aislamientos procedentes de cultivo *in vitro* y uno obtenido de un caso de campo



GRAFICA 2. PROMEDIO DE CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA DE BOVINOS

INOCULADOS CON CUATRO DIFERENTES AISLAMIENTOS DE *Babesia bigemina**.

* Tres aislamientos procedentes de cultivo *in vitro* y uno obtenido de un caso de campo.

Día 0: Inoculación de eritrocitos infectados con *B. bigemina* vía intramuscular, en grupos de cuatro animales cada uno.

res al rango normal en alguna fase del experimento, pero siempre superiores a 4×10^6 /ul, excepto en el grupo 4 inoculado con el aislamiento de campo en el que se observaron promedios de 2.7 a 3.23×10^6 /ul entre los días 11-18 PI, recuperándose al final del experimento (Gráfica 3).

En el conteo de glóbulos blancos, en todos los animales inoculados con aislamientos de cultivo se observaron valores superiores a lo normal²¹, solo en el grupo 4 se observaron valores inferiores a éste en los cuatro animales, los cuales variaron desde 2900 a 3900/ul entre los días 7-11 PI.

Todos los animales inoculados con GRI fueron positivos en frotis sanguíneo, excepto uno del grupo 3. La parasitemia comenzó a observarse el día cuatro en los animales del grupo 4 y para el día 12 todos los animales se encontraban negativos. El número promedio de días con parasitemia fue 3.5, 2.5, 2.25 y 5.5 para los grupos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. El PEP máximo observado fue de 2.26 en un animal del grupo 4; en los animales inoculados con aislamientos de cultivo *in vitro* el PEP nunca fue superior a 0.09 (Cuadro 1).

Todos los animales inoculados con GRI fueron positivos en la prueba de IFI hacia el día 11 PI. Sin embargo, algunos de los animales de los grupos 2 y 4 estaban positivos en IFI desde el día 4. Para el día 28 PI cuatro animales se convirtieron a IFI negativos, tres en el grupo 1 y uno en el grupo 2. En el grupo 4 hacia el día 18 PI, el promedio de títulos de anticuerpos fue mayor de 1:2560 hasta el final del experimento. Ningún otro grupo mostró una respuesta tan alta (Gráfica 4).

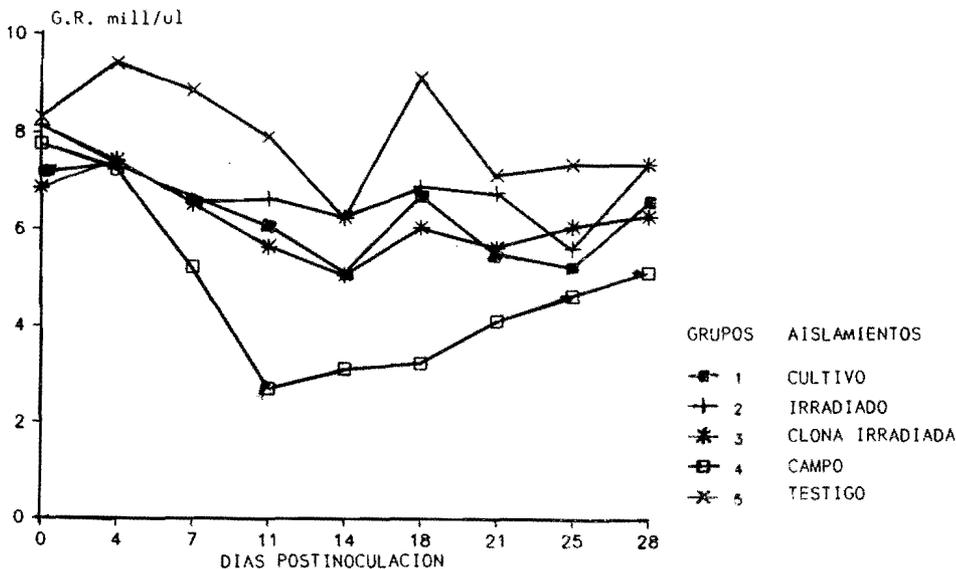
DESAFIO. La temperatura de los animales de los grupos 1-4 fue inferior a 39.0 C, durante los 35 días del estudio post-desafío (PD). Solamente los

animales del grupo 5 susceptible mostraron incrementos de temperatura superiores a 39.1 C, con un máximo de 39.7 C en el día 21 PD. Las fluctuaciones del porcentaje de hematocrito estuvieron dentro de los valores normales en todos los animales excepto en dos de ellos, de los grupos 3 y 5, con valores de hematocrito de 21 y 18% respectivamente. Ambos animales del grupo 5 fueron positivos en frotis sanguíneo hacia el día 17 PD, permaneciendo positivos hasta el día 24 PD. Se observó que dos animales de los grupos 2 y 3, también fueron positivos en el día 18 con duración de la parasitemia de 8 y 6 días respectivamente.

Mientras que los valores de PPT y hemoglobina no disminuyeron más allá del rango normal en ninguno de los grupos, en glóbulos rojos se observaron valores de 3.82 y 2.92×10^6 /ul los días 21 y 24 respectivamente en un animal del grupo testigo, en el resto de los bovinos no se observaron cambios importantes.

Al desafío, la respuesta en la producción de anticuerpos, presentó títulos similares a los de la inoculación primaria en los grupos 1 y 2, en tanto que en el grupo 3 se presentó una disminución marcada en un bovino y ligera en el otro animal; de igual forma en el grupo 4 se observó una respuesta menor en la producción de anticuerpos en ambos animales. Por último en el grupo 5 (testigo) se detectaron anticuerpos hasta una dilución de 1:640 comenzando a detectarse el día 17 postdesafío (Gráfica 5).

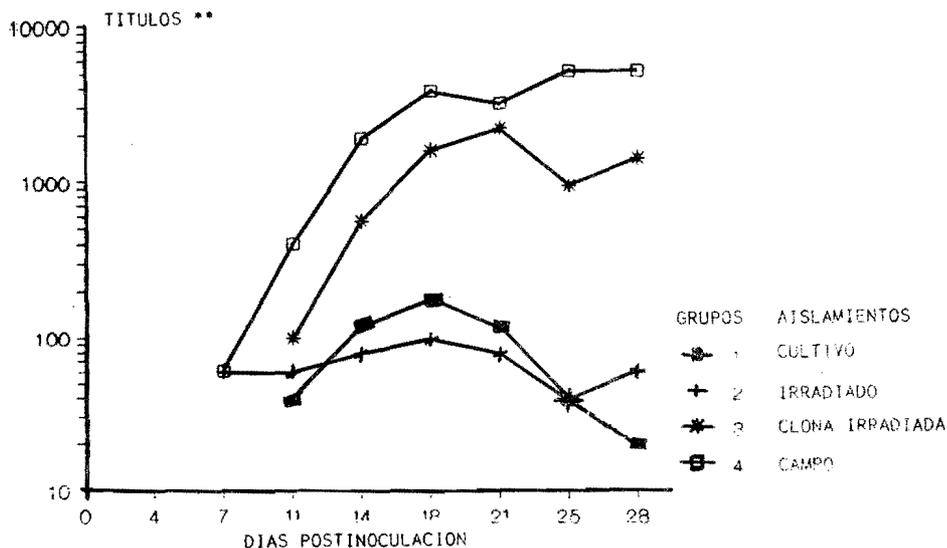
Es aparente que las condiciones de cultivo no interfieren con la infectividad de *B. bigemina* para el huésped bovino, ya que la mayoría de los animales fueron positivos al parásito para el día 8 PI. Sin embargo, posible-



GRAFICA 3. PROMEDIO DE CONCENTRACION DE GLOBULOS ROJOS DE BOVINOS INOCULADOS CON CUATRO DIFERENTES AISLAMIENTOS DE *Babesia bigemina**

* Tres aislamientos procedentes de cultivo *in vitro* y uno obtenido de un caso de campo.

Día 0: Inoculación de eritrocitos infectados con *B. bigemina* via intramuscular. en grupos de cuatro animales cada una.



GRAFICA 4. PROMEDIO DE TITULOS DE ANTICUERPOS DE BOVINOS INOCULADOS CON CUATRO DIFERENTES AISLAMIENTOS DE *Babesia bigemina**

* Tres aislamientos procedentes de cultivo *in vitro* y uno obtenido de un caso de campo.

Día 0: Inoculación de eritrocitos infectados con *B. bigemina* via intramuscular en grupos de cuatro animales cada una.

** Prueba de Inmunofluorescencia indirecta.

CUADRO 1. PORCIENTO DE ERITROCITOS PARASITADOS (PEP) DE BOVINOS INOCULADOS CON CUATRO DIFERENTES AISLAMIENTOS DE *Babesia bigemina**.

GRUPOS	ANIMAL	DIAS								
		No	4	5	6	7	8	9	10	11
1	2494	-	-	-	0.020	0.083	+	+	+	
	2580	-	-	-	+	+	+	-	-	
	CULTIVO	2452	-	-	-	+	+	+	-	-
	2605	-	-	-	0.018	+	0.019	-	-	
2	2515	-	-	-	+	+	+	-	-	
	85257	-	-	-	+	+	-	-	-	
	IRRADIADO	2412	-	-	-	+	+	+	-	-
	2447	-	-	-	-	+	+	-	-	
3	2440	-	-	-	0.019	0.047	0.018	-	-	
	85235	-	-	-	0.090	0.034	+	-	-	
	CLONA	2577	-	-	-	-	-	-	-	
	IRRADIADA	2420	-	-	-	0.071	0.036	0.017	-	-
4	2565	+	0.076	0.075	0.047	0.058	+	-	-	
	2438	+	0.218	2.260	0.628	+	-	-	-	
	CAMPO	2559	+	0.041	0.058	+	+	+	-	-
	381	0.055	0.169	0.222	0.124	0.036	-	-	-	
5	2592	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2505	-	-	-	-	-	-	-	-	
	TESTIGO	8691	-	-	-	-	-	-	-	
	2594	-	-	-	-	-	-	-	-	

- = negativo

+ = positivo, parasitemia baja para ser cuantificada

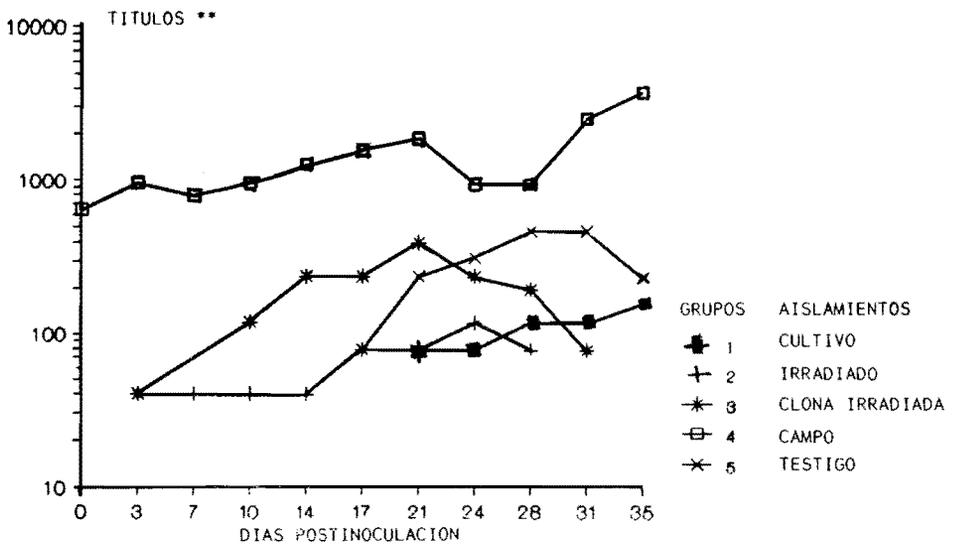
* Tres aislamientos de cultivo *in vitro* y uno obtenido de un caso de campo.

Día 0: Inoculación de eritrocitos infectados con *B. bigemina* vía intramuscular.

mente la adaptación a cultivo modifica la virulencia, ya que *B. bigemina* derivada *in vitro* es detectada en frotis sanguíneos por periodos menores en animales intactos que aislamientos de campo mantenidos en becerros. Es importante considerar que no hay una presión negativa impuesta para la selección de subpoblaciones altamente

infectivas en cultivo, ya que todas las condiciones son en favor de la replicación, aún para las subpoblaciones menos virulentas.

El aislamiento de campo *B. bigemina* fue pasado solamente en animales intactos, seleccionando de esta forma las poblaciones más infectivas. La fiebre y la disminución en PPT,



GRAFICA 5. PROMEDIO DE TITULOS DE ANTICUERPOS DE BOVINOS DESAFIADOS CON GARRAPATAS *Boophilus microplus* INFECIADAS CON *Babesia bigemina**

* Grupos de cuatro animales inoculados 277 días antes con tres aislamientos procedentes de cultivo *in vitro* y uno obtenido de un caso de campo. Día 0: Infestación con 20,000 larvas de *Boophilus microplus* infectadas con el aislamiento de campo.

** Prueba de Inmunofluorescencia indirecta.

detectadas solo en los bovinos inoculados con este aislamiento, es un indicador de la virulencia del mismo, ya que la destrucción de glóbulos rojos ocasiona liberación de pirógenos que ocasionan una respuesta febril⁹, esta destrucción, junto con la posible disfunción hepática ocasionaría una estasis sanguínea que se traduce en un estado de anoxia, dañando el endotelio vascular y provocando la salida de fluidos del torrente circulatorio, con una subsecuente pérdida de proteínas plasmáticas²⁶.

Se observaron disminuciones abajo del rango normal en hemoglobina, hematocrito y glóbulos rojos en diferentes grupos. Sin embargo, en el grupo inoculado con el aislamiento de campo este efecto fue más marcado. Se menciona que la disminución de estos valores conduce a un cuadro anémico; pudiendo deberse a la des-

trucción de G.R. por la salida del parásito, por fagocitosis de células dañadas o aquellas sanas que adsorben antígenos de *Babesia*, o bien algunas sufren alteraciones en su forma aumentando su fragilidad osmótica¹⁶.

Las disminuciones más severas en hematocrito en los animales del grupo 4 se observaron después que la parasitemia había desaparecido. Esto podría indicar que la disminución en Ht no esta relacionada a un efecto directo de la invasión del eritrocito y a su destrucción por el parásito.

Diversos autores han informado de la disminución en virulencia de *Babesia* spp por efecto de irradiación a diferentes dosis^{2, 27}, o bien por efecto de la adaptación a cultivo *in vitro*^{11, 28}; sin embargo, no existe información en la literatura respecto al efecto de *B. bigemina* cultivada *in vitro* sobre bovinos.

Parece ser que dosis bajas de irradiación pueden no tener efectos adversos sobre el protozoario; sin embargo, debe considerarse que la virulencia del parásito podría depender no solo de la dosis de irradiación, sino también de la especie de *Babesia*, de su patogenicidad y de las adaptaciones previas que la cepa haya experimentado. En otros estudios se han presentado indicios de un incremento en la síntesis de ácidos nucleicos por *Babesia* cuando es sometida a bajas dosis de irradiación¹⁰, en tanto que dosis altas disminuyen la reproducción e incluso provocan la muerte del parásito¹⁸.

En el presente trabajo, al comparar las poblaciones irradiadas y la no irradiada todas derivadas de cultivo *in vitro*, se pudo apreciar que los efectos de la irradiación no son previsible, pues todas se comportaron de manera diferente entre sí, incluso la clona irradiada a pesar de haber sido manipulada más veces en el cultivo, aparentemente es más virulenta que la otra población irradiada.

La caída inicial en el conteo de células blancas, puede ser resultado del estrés causado por la infección o un indicio del efecto inmunosupresor que ejerce el protozoario sobre el sistema inmune del bovino^{6, 21}.

Se menciona que animales intactos responden a la infección por *Babesia*, con un rápido aumento en la actividad linfocítica teniendo así mayor oportunidad para sobrevivir¹⁴. En el grupo inoculado con el aislamiento de campo, el aumento de la cuenta leucocitaria fue más tardía que en el resto de los grupos, pudiendo indicar que al ser más virulenta, el efecto de inmunodepresión sea más marcado, ocasionando que el animal tenga menor posibilidad para atacar la infección con mayor riesgo de muerte. Es-

to también se ve reflejado en el porcentaje y duración de eritrocitos parasitados, que fue mayor con el aislamiento de campo que con los otros tres.

El hecho de que los animales del grupo 4 hayan sobrevivido a una infección severa pudo haberse debido a una situación favorable de alimentación y confinamiento, pues no requirieron de grandes esfuerzos para su mantenimiento. Posiblemente en condiciones menos favorables, el efecto de la infección hubiese sido fatal.

El desafío con garrapatas infectadas, aunque fue exitoso en mostrar la infectividad del aislamiento, aparentemente no fue lo suficientemente virulento para producir cambios severos en los valores hematológicos. Las parasitemias en el grupo de animales susceptibles aparecieron mucho después que en la inoculación primaria. Esta observación está relacionada a las características del ciclo de *B. bigemina* en la ninfa de la garrapata. La inoculación del organismo por la garrapata ocurre después de 7-9 días de haber subido al animal. Diferencias en las subpoblaciones de los aislamientos utilizados pueden explicarse por las parasitemias observadas en animales expuestos previamente. Las subpoblaciones altamente infectivas para el huésped bovino podrían haber inducido estas parasitemias, ya que las defensas de los animales no controlaron tales subpoblaciones. Actualmente es aceptada la hipótesis de que los animales deben estar protegidos contra los signos clínicos de la enfermedad antes que contra la infección. Por lo tanto, la reinfección puede incrementar el desarrollo de resistencia²³.

Se debe de tomar en cuenta que el desafío en los animales del grupo 4 se

realizó con el aislamiento homólogo, lo que explicaría en parte la ausencia de parasitemia. Por otro lado, el grupo 1 fue desafiado con un aislamiento heterólogo, comprobándose la inducción de protección en una infección de este tipo. La heterogenicidad del desafío, permite asimismo entender la aparición de los parásitos en la circulación sanguínea de los animales de los grupos 2 y 3.

Podríamos especular que el cultivo *in vitro*, ha seleccionado una población que probablemente no pierde su capacidad invasiva para el bovino, pero que ha disminuido su virulencia; esto quizá debido a la ausencia del sistema inmune del huésped mamífero, el cual cuando está presente, podría estimular la expresión de ciertos genes, necesarios para la sobrevivencia del protozooario y que además éstos podrían codificar para ciertas características de virulencia para el bovino.

Se puede concluir que los aislamientos procedentes de cultivo se comportaron como poblaciones atenuadas, al no afectar en forma importante los valores hematológicos; lo cual podría ser una característica deseable al seleccionar poblaciones útiles en programas de preinmunización, reduciendo así los riesgos que implica el uso de ésta con aislamientos de campo de los cuales se desconoce su virulencia.

SUMMARY

The *in vitro* culture of *Babesia bigemina* allows to obtain different subpopulations. The behavior of these subpopulations in susceptible bovines had been unknown. In this study, the effect of three different isolates; one derived from *in vitro* culture; original strain; another irradiated; and a third cloned and irradiated, was assessed. In addition, a fourth isolate obtained from a field case was used. Four groups of four animals were utilized. Each group was inoculated with one of the isolates by the

intramuscular route. A fifth group of animals was not inoculated and remained as a control group. The four isolates were capable of multiplying in the host. Only in the bovines inoculated with the field isolate was the disease observed in its clinical form with marked changes in rectal temperature, hemocrit, hemoglobin, red blood cells and prolonged parasitemias. On the other hand, the isolates from the *in vitro* culture had lower hematological changes and were considered less virulent. The field and original *in vitro* culture isolates produced protection after challenge; not only against signs, but also against infection.

LITERATURA CITADA

1. BENTINCK-SMITH, J., 1969. Hematología. En Medway, W., Prier, J.E. y Wilkinson, J.S. eds. Patología Clínica Veterinaria. UTHEA México, D.F. 208-251.
2. BISHOP, J.P. and ADAMS, L.G. 1974. *Babesia bigemina*: Immune response of cattle inoculated with irradiated Parasites. *Exp. Parasitol.* 35:35.
3. BUENING, G.M. KUTTLER, K.L. and RODRIGUEZ, S.D. 1986. Evaluation of a cloned *Babesia bovis* organism as a live immunogen. *Vet. Parasitol.* 22:235.
4. CALLOW, L.L. and MELLORS, L.T. 1966. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomised calves. *Aust. Vet. J.* 42: 464.
5. CALLOW, L.L., MELLORS, L.T. and MCGREGOR, W. 1979. Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomised cattle. *Int. J. Parasitol.*, 9:333.
6. CALLOW, L.L. and STEWART, N.P. 1978. immunosuppression by *Babesia bovis* against its tick vector, *Boophilus microplus*. *Nature.* 272:818.
7. DALGLIESH, R.J., CALLOW, L.L., MELLORS, L.T. and MCGREGOR, W. 1981. Development of a highly infective *Babesia bigemina* vaccine of reduced virulence. *Aust. Vet. J.* 57:8.
8. GOLDMAN, M. PIPANO, E. and ROSENBERG, A.S. 1972. Fluorescent antibody tests for *Babesia bigemina* and *Babesia berbera*. *Res. Vet. Sci.* 13:77.

9. GUYTON, A.C. 1977. Tratado de fisiología médica. 5a. ed. *Interamericana*. México D.F., p 231-242.
10. IRVIN, A.D., YOUNG, E.R. and ADAMS, P.J.V. 1979. The effects of irradiation on *Babesia* maintained *in vitro*. *Res. Vet. Sci.* 27:200.
11. KUTTLER, K.L., ZAUGG, J.L. and YUNKER, C.E. 1978. The pathogenicity and immunological relationship of a virulent and a tissue-culture-adapted *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.* 27:239.
12. LEVY, M. and RISTIC, M. 1980. *Babesia bovis*: Continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture *Science*. 207:1218.
13. LORA, C.A. 1981. Methods of immunization against bovine babesiosis used in Latin America. In: Ristic M., Kreier J.P. eds. *Babesiosis*. New York, *Academic Press* 567-571.
14. LOHR, K.F., OTIENO, P.S. MEYER, H., HIGGS, J. and ASHFORD, W.A. 1977. Hematological reactions to experimental *Babesia bigemina* infection in splenectomised and non-splenectomised cattle. *Zbl. Vet. Med.* 24:508.
15. McCOSKER, P.J. 1981. The global importance of Babesiosis. In: Ristic M., Kreier J.P., eds. *Babesiosis*. New York *Academic Press*. 1-24.
16. MORILLA, G.A. 1981. Inmunología de la Babesiosis. En *Ciencia Veterinaria*. Ed. Moreno Chan R., *U.N.A.M.*, D.F. México, 3: 240-275.
17. O.I.E. 1981. Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. *Bull. Off. Int. Epiz.* 93: 903.
18. PURNELL, R.E. and LEWIS, D. 1981. *Babesia divergens*: combination of dead and live parasites in an irradiated vaccine. *Res. Vet. Sci.* 30:18.
19. RODRIGUEZ, S.D., BUENING, G.M., GREEN T.J. and CARSON, C.A. 1983. Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation *Inf. Imm.* 1983. 42:15.
20. SALAS, T.E., GARCIA, G.J., RAMOS, A.J., RODRIGUEZ, R.E., ABOYTES, T.R., BUENING, G.M. y VEGA, M.C. 1988. patogenia de una clona irradiada de *Babesia bovis* obtenida de cultivo *in vitro*. *Tec. Pec. Mex.* 26(1):36.
21. SCHALM, W.C., JAIN, N.C. and CARROLL, E.J. 1975. *Veterinary Haematology*. 3th ed. *Lea and Febiger*, Philadelphia, U.S.A. 384-403.
22. SMITH, R.D. 1978. Ciclo biológico de *Babesia* en la garrapata. En: *Ciencia Veterinaria*. Ed. Moreno Chan R. *U.N.A.M.* México, D.F. 2:233-264.
23. SMITH, R.D., RISTIC, M. 1981. Immunization against bovine babesiosis with culture-derived antigen. In: Ristic, M. Kreier, J.P., Eds. *Babesiosis*, *Academic Press* New York. 485-507.
24. VEGA, M.C., BUENING, G.M., GREEN, T.J. and CARSON, C.A. 1985. *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am. J. Vet. Res.* 46 (2):416.
25. VEGA, C.A., BUENING, G.M., RODRIGUEZ, S.D. and CARSON, C.A. 1986. Cloning of *in vitro* propagated *Babesia bigemina*. *Vet. Parasitol.* 22:223.
26. WRIGHT, I.G. 1981. Biochemical characteristics of *Babesia* and physicochemical reactions in the host. In: Ristic M. and Kreier J.P. eds. *Babesiosis*, *Academic Press*. New York, 171-205.
27. WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V. and MAHONEY, D.F. 1980. Theiradiation of *Babesia bovis*. 1. The difference in pathogenicity between irradiated and non irradiated populations. *Z. Parasitenkd.* 63:47.
28. YUNKER, C.E., KUTTLER, K.L. and JOHNSON, L.W. 1987. Atenuation of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Vet. Parasitol.* 24:7.