

CAPACIDAD PROTECTORA EN BOVINOS DE UNA CEPA DE *Babesia bigemina* DERIVADA DE CULTIVO *in vitro* ^a

Julio Vicente Figueroa Millán ^b
Germinal Jorge Cantó Alarcón ^c
Jesús Antonio Alvarez Martínez ^b
Rocío Lona Galván ^d
Juan Alberto Ramos Aragón ^b
Carlos Agustín Vega y Murguía ^b

RESUMEN

Figueroa M J V, Cantó A G J, Alvarez M J A, Lona G R, Ramos A J A, Vega M C A. *Téc. Pecu. Méx.* Vol 36 No 2 1998 pp 95-107. Se determinó la capacidad inmunoprotectora de una cepa atenuada de *B. bigemina* en bovinos. Se utilizaron 24 bovinos de un año de edad provenientes de zona libre de garrapatas. La cepa inmunizante de *B. bigemina* fue aislada de un caso clínico y se ha atenuado por mantenimiento en cultivo *in vitro*. Para la determinación de la dosis mínima inmunizante se conformaron cinco grupos de cuatro animales que recibieron dosis crecientes de 10^5 - 10^9 de eritrocitos infectados, y un grupo testigo sin vacunación. Los animales vacunados y desafiados fueron monitoreados registrando temperatura rectal, volumen celular aglomerado (VCA) y parasitemia. En la fase posvacunal no hubo cambios notorios en los parámetros indicados. La confrontación se realizó siete meses posvacunación utilizando resultados de un ensayo previo en el que se determinó como dosis de confrontación 10^8 eritrocitos infectados con aislado de campo por vía intramuscular. Al día ocho posconfrontación se observaron parásitos circulantes en todos los bovinos de los grupos vacunados (10^5 - 10^9), con fiebre (40.2 C) únicamente en el grupo vacunado con 10^9 . Los animales del grupo testigo mostraron parasitemia relativamente elevada, fiebre (40.7 C), y disminución del VCA (> 50%) con respecto del valor basal a los nueve días posconfrontación, requiriéndose aplicar el tratamiento específico para evitar la muerte de los animales. Se concluye que la cepa atenuada de *B. bigemina* utilizada en este estudio, protege satisfactoriamente a bovinos confrontados con una cepa de campo virulenta.

PALABRAS CLAVE: *Babesia bigemina*, Cultivo *in vitro*, Inmunización, Protección bovinos.

INTRODUCCION.

La babesiosis bovina, transmitida por garrapatas del género *Boophilus* y causada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia*, es una de las enfermedades económicamente más

importantes para las regiones ganaderas localizadas en las zonas tropicales y subtropicales (1). En México, se ha identificado la presencia de las dos especies más importantes, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (2).

a Recibido el 29 de enero de 1998 y aceptado para su publicación el 7 de abril de 1998.

Parcialmente financiado por PAIEPEME, A.C.

b Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria/INIFAP. km. 11.5 Carretera Cuernavaca-Cuautla. Colonia Progreso, Jiutepec, Mor. 62550. Para solicitud de separatas dirigirse al primer autor en ésta dirección.

c Centro Nacional de Investigaciones en Fisiología y Mejoramiento Animal. Apartado Postal #2-29. Querétaro, Qro. 76280.

d Universidad Autónoma de Querétaro. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Centro Universitario. Querétaro, Qro.

El método inmunoprolifático que en la actualidad se utiliza con mayor frecuencia fue desarrollado en Australia (3) y la metodología ha sido posteriormente aplicada en Argelia, Sri Lanka, Argentina, Uruguay, Sudáfrica, Israel y Cuba (3,4,5). Este método, consiste en el uso de organismos vivos de reducida virulencia, los cuales se obtienen al realizar pases

seriados rápidos de sangre infectada en becerros esplenectomizados en el caso de *B. bovis* (3) y pases lentos en becerros sin esplenectomizar, en el caso de *B. bigemina* (6). Sin embargo, y dado que las vacunas se derivan de sangre de becerros infectados, existe el riesgo de que éstas se contaminen con diversos agentes patógenos (4,7). Con el advenimiento de técnicas que permiten la multiplicación continua del protozoo en condiciones de laboratorio (8,9), el riesgo de contaminación se reduce ostensiblemente, por lo que, el uso del cultivo *in vitro* de *Babesia* es probablemente la mejor fuente de parásitos para producir y evaluar inmunógenos contra la babesiosis bovina (10).

Asimismo, existe evidencia que poblaciones de *Babesia* producidas por este método, muestran una virulencia reducida cuando son inoculadas en animales susceptibles (11,12,13,14,15). El presente estudio tuvo como objetivos: la evaluación de la patogenicidad de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro*, en comparación con la de un aislado de campo; así como la determinación de la capacidad inmunoprotectora conferida por la cepa de cultivo, en bovinos confrontados en forma controlada con el aislado de campo.

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico

Bovinos. Se utilizaron 46 animales de la raza Holstein, con edades que fluctuaban entre los 12 y 15 meses, provenientes de hatos lecheros libres de garrapatas *Boophilus*, localizados en la periferia de la Cd. de Querétaro. Se comprobó que los animales estaban libres de anticuerpos contra *Babesia* spp, mediante la técnica

de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (16).

Parásitos. Aislado de campo. Se obtuvo de un estabilizado amablemente donado por Lucious P. Chieves (Dept. Bacteriology, NVSL, USDA, Ames, Iowa). El aislamiento original se obtuvo de un caso clínico de campo en México y se ha mantenido mediante pases alternos en animales sin esplenectomizar, garrapatas y criopreservación (L.P. Chieves, comunicación personal). El aislado de campo de *B. bigemina* obtenido (material criopreservado a -196 C en nitrógeno líquido), fue inmediatamente descongelado e inoculado intramuscularmente en un bovino receptor no esplenectomizado para reactivar los parásitos criopreservados. Un segundo bovino receptor no esplenectomizado (donador de aislado de campo) fue inoculado con 10^8 eritrocitos infectados provenientes del bovino receptor uno, con el fin de incrementar la parasitemia (porcentaje de eritrocitos infectados, PEP), y para preparar las dosis a utilizar en el experimento I. Cuando el bovino donador mostró signología clásica de babesiosis, se colectó sangre periférica en bolsas conteniendo Citrato-Ácido-Dextrosa como anticoagulante. Una parte de sangre colectada se lavó en solución de VYM (17) y se procesó para preservación en nitrógeno líquido (50% V/V de paquete celular en VYM), utilizando como crioprotector una solución preparada al 20% (V/V) en VYM, de polivinilpirrolidona (17). Otra parte de la sangre infectada se utilizó para elaborar las distintas dosis de eritrocitos infectados con el aislado de campo de *B. bigemina*. Para esto, se determinó la cuenta eritrocítica por unidad de volumen (18), y

el valor relativo de PEP de acuerdo a lo descrito previamente (19). Una vez establecida la dosis de inóculo más elevada, se realizaron diluciones decuples de la sangre infectada en sangre obtenida de un bovino donador normal, las cuales se inocularon inmediatamente en los bovinos susceptibles del experimento I.

Cepa inmunizante. Se utilizó una cepa de *B. bigemina* originalmente aislada de un caso clínico en México, la cual se ha mantenido alternadamente en congelación y propagada continuamente en cultivo *in vitro* (9). Similar a lo anterior, para elaborar las distintas dosis de eritrocitos infectados con la cepa de *B. bigemina* derivada de cultivo *in vitro*, se determinaron la cuenta eritrocítica por unidad de volumen de cultivo y el valor relativo de PEP (17,18). Una vez determinada la dosis de inóculo más elevada, se realizaron diluciones décuples de los eritrocitos de cultivo [50% de paquete celular en solución de VYM (17)] en sangre obtenida de un bovino donador normal y almacenada también en solución de VYM. Las dosis así preparadas fueron mantenidas a 4 C durante almacenaje y transportación, antes de ser inoculadas en los animales susceptibles del experimento II.

Procedimiento

Diseño experimental. El estudio se diseñó de forma que se pudiera evaluar en bovinos altamente susceptibles a la babesiosis, la patogenicidad del aislado de campo (experimento I), la patogenicidad de la cepa derivada de cultivo *in vitro* (experimento II), y la capacidad inmunoprotectora de la cepa de cultivo *in vitro* (experimento III).

Experimento I. Evaluación del comportamiento del aislado de campo. Con objeto de determinar la variabilidad de la infección del aislado de campo, se utilizaron 20 bovinos que se dividieron al azar en cinco grupos (1-5) de cuatro animales cada uno. Los animales de cada grupo fueron inoculados por vía intramuscular con dosis de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , y 10^9 , de eritrocitos infectados con el aislado de campo respectivamente. A partir del día de la inoculación, los animales se observaron diariamente durante 12 días para determinar reacciones clínicas posinoculación (PI). A partir de sangre periférica, colectada de la vena caudal en tubos evacuados se prepararon frotis delgados que se tiñeron con colorante de Giemsa para observar al parásito por microscopía óptica; además, diariamente a partir del día cuatro PI se registró la temperatura rectal (TR) y se determinó el volumen celular aglomerado (VCA)(18). La dosis mínima de parásitos que al ser inoculada en los bovinos susceptibles desencadenó la manifestación clínica severa en forma típica, ie., parasitemia (0.5%-5%), fiebre (aumento de temperatura de 1.5 C por dos días consecutivos), descenso del valor de VCA (50% de reducción o valor de VCA de 15 por dos días), anorexia, deshidratación, depresión, recumbencia, hemoglobinuria e ictericia (4), fue considerada como la dosis de confrontación para utilizarse en el experimento III.

Experimento II. Inmunización. Se utilizaron 24 animales con los cuales, al azar, se formaron seis grupos de cuatro animales cada uno. Cinco de los grupos (Gpo. 1-5) recibieron, por vía intramuscular, diferentes dosis de

eritrocitos infectados (EI) con *B. bigemina* derivada de cultivo *in vitro*, siendo éstas de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 EI respectivamente, mientras que uno de los grupos (Gpo. 6) recibió 10^9 eritrocitos no infectados y permaneció como testigo. A partir de la inmunización, los animales se observaron diariamente para determinar reacciones clínicas posinoculación (PI). A partir de sangre periférica y durante 12 días PI, se prepararon frotis delgados que se tiñeron con colorante de Giemsa para observar al parásito por microscopía óptica, además de determinarse los valores de VCA y TR. El día de la inmunización, cada siete días durante el primer mes y posteriormente cada 28 días durante siete meses, se obtuvo sangre por punción yugular en tubos al vacío sin anticoagulante, y el suero obtenido se utilizó en la determinación de anticuerpos específicos a *Babesia* mediante la prueba de IFI (16).

Experimento III. Confrontación. Siete meses PI, los cinco grupos de animales inmunizados con parásitos derivados de cultivo *in vitro* y el grupo testigo, fueron confrontados con una dosis seleccionada del experimento I. Para llevar a cabo esto, la sangre infectada conteniendo el aislado de campo y mantenida en criopreservación, fue descongelada y administrada en un bovino receptor para reactivarse y preparar la dosis y volumen de inóculo necesario. Durante 14 días se observaron los animales confrontados con objeto de determinar reacciones severas, se colectaron muestras de sangre capilar para determinar el valor de VCA y realizar frotis para observación microscópica, además de registrar el valor de TR. El día de la confrontación y los días siete y 14 posconfrontación, se obtuvo sangre de la vena yugular para, en el suero obtenido, determinar títulos de anticuerpos anti-*Babesia* mediante la prueba de IFI (16).

Cuadro 1. Curso de la infección en bovinos holstein inoculados con diferentes dosis del aislado de campo de *Babesia bigemina*.

PARAMETRO	GRUPO ^a				
	1	2	3	4	5
Período de Incubación (días)*	8	6	5	5	5
Período Prepatente (días)*	7	6	6	6	5
Fiebre > 39.5 C (días)*	1	3	4	4	2
Fiebre > 39.5 C (# animales)	1	4	4	4	4
Temperatura Máxima (C)*	39.5	40.5	40.4	40.5	40.7
Valor mínimo/animal VCA** (%)	18	15	16	16	14
Valor mínimo VCA (%)*	25.3	18.0	19.7	18.5	16.7
Máxima Reducción VCA (%)*	12.3	37.7	29.6	38.4	41.6
Máxima Reducción VCA (día)	11	8	8	8	8
Eritrocitos parasitados (%)*	0.06	1.0	0.4	1.0	0.7
Duración parasitemia (días)*	2	3	3	3	2
Quimioterapia (# animales)***	2/4	4/4	2/4	4/4	4/4

^a 1: 1×10^5 , 2: 1×10^6 , 3: 1×10^7 , 4: 1×10^8 , 5: 1×10^9 eritrocitos infectados/animal/i.m.

* Promedio de cuatro animales por grupo.

** VCA = Volumen celular aglomerado

*** Babesiosis clínica severa. Tratamiento día siete-ocho PI. No. animales tratados/No. total de animales.

Cuadro 2. Curso de la infección en bovinos holstein inoculados con diferentes dosis de la cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro*.

PARAMETRO	GRUPO ^a				
	1	2	3	4	5
Período de Incubación (días)*	-	6	-	5	-
Período Prepatente (días)*	-	6	5	4	4
Fiebre > 39.5 C (días)*	-	1	-	2	-
Fiebre > 39.5 C (# animales)	1	3	1	2	2
Temperatura Máxima (C)*	39.2	39.8	39.3	39.8	39.1
Valor mínimo/animal VCA** (%)	21	22	23	21	22
Valor mínimo VCA (%)*	25.3	24.5	27.0	29.0	25.7
Máxima reducción VCA (%)*	10.8	9.1	4.8	13.2	10.1
Máxima reducción VCA (día)	12	12	12	12	5
Eritrocitos parasitados (%)*	<0.01	<0.01	<0.01	0.02	0.04
Duración parasitemia (días)*	1	1	2	3	3
Quimioterapia (# animales)***	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

^a 1: 1x10⁵, 2: 1x10⁶, 3: 1x10⁷, 4: 1x10⁸, 5: 1x10⁹ eritrocitos infectados/animal/i.m.

* Promedio de 4 animales por grupo. ** VCA= Volumen celular aglomerado.

***Babesiosis clínica severa. No. animales tratados/No. total de animales.

Cuadro 3. Confrontación con cepa de campo de bovinos holstein inmunizados con diferentes dosis de *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro*.

PARAMETRO	GRUPO ^a					
	1	2	3	4	5	6
Período de Incubación (días)*	5	-	-	-	5	5
Período Prepatente (días)*	6	6	5	6	5	5
Fiebre > 39.5 C (días)*	1	-	-	-	3	3**
Fiebre > 39.5 C (# animales)	3	-	2	1	4	4
Temperatura Máxima (C)*	39.6	39.2	39.4	39.4	40.2	41.0
Valor mínimo/animal VCA** (%)	20	20	20	24	18	8
Valor mínimo VCA (%)*	24.6	24.2	23.5	27.7	22.6	13.7
Máxima reducción VCA (%)*	15.6	17.9	20.3	12.9	18.5	51.8
Máxima reducción VCA (día)	8	9	9	7	12	8
Eritrocitos parasitados (%)*	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.02	1.1
Duración parasitemia (días)*	3.0	3.5	3.5	3.5	4.0	4.0
Quimioterapia (# animales)**	0/3 ^b	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4

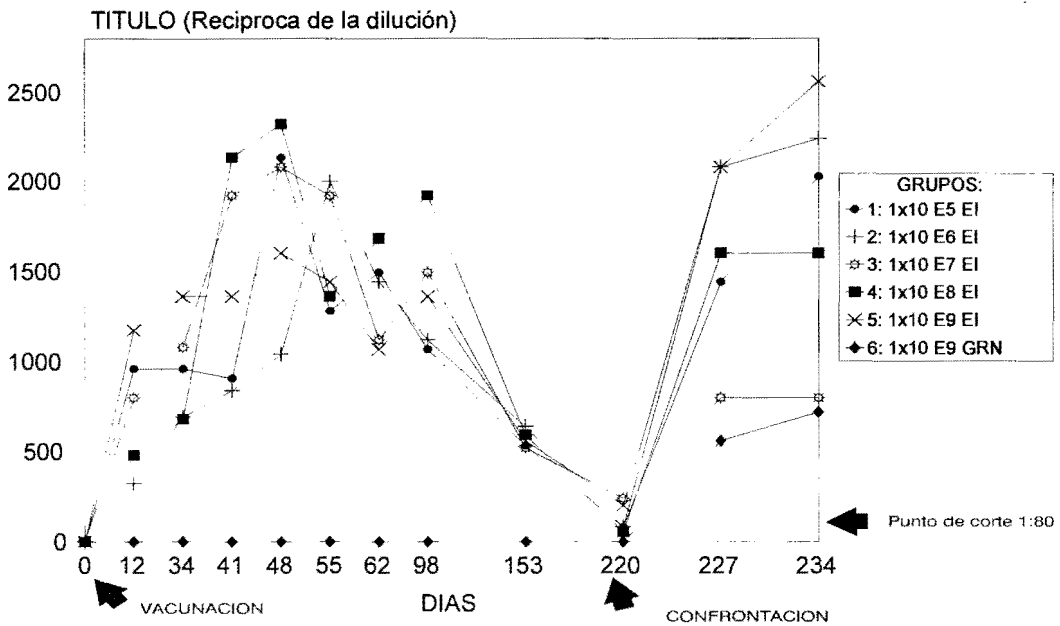
* Promedio de 4 animales por Grupo.

** Babesiosis clínica severa. Tratamiento día siete posconfrontación. No. de animales tratados/No. total de animales.

^a 1: 1x10⁵, 2: 1x10⁶, 3: 1x10⁷, 4: 1x10⁸, 5: 1x10⁹ eritrocitos infectados, 6: 1x10⁹ eritrocitos normales/animal/i.m.

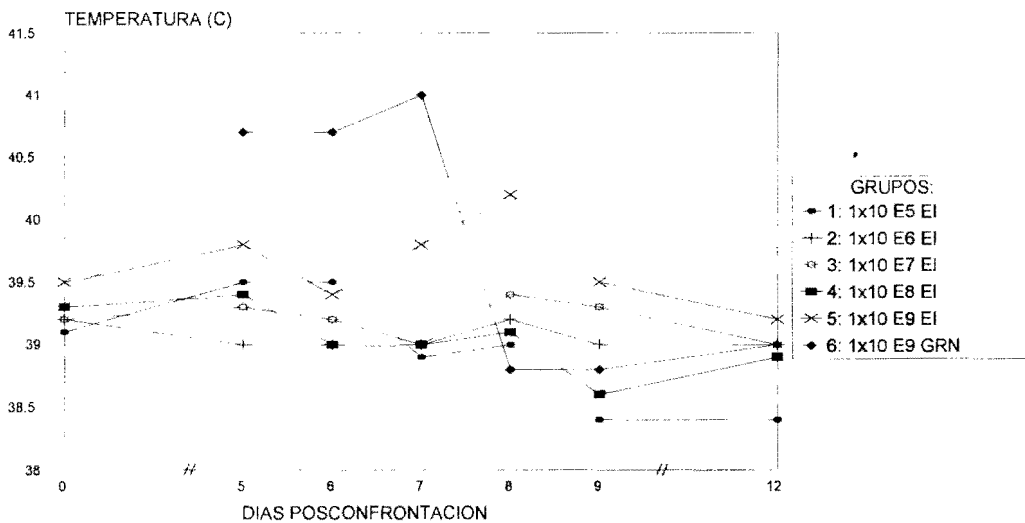
^b Un animal del grupo muerto por reticulopericarditis antes de la confrontación.

FIGURA 1. TITULO PROMEDIO DE ANTICUERPOS ANTI-*B. bigemina* EN ANIMALES INOCULADOS CON CEPAS DE CULTIVO EN LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA *



*Cada punto representa el promedio de cuatro bovinos

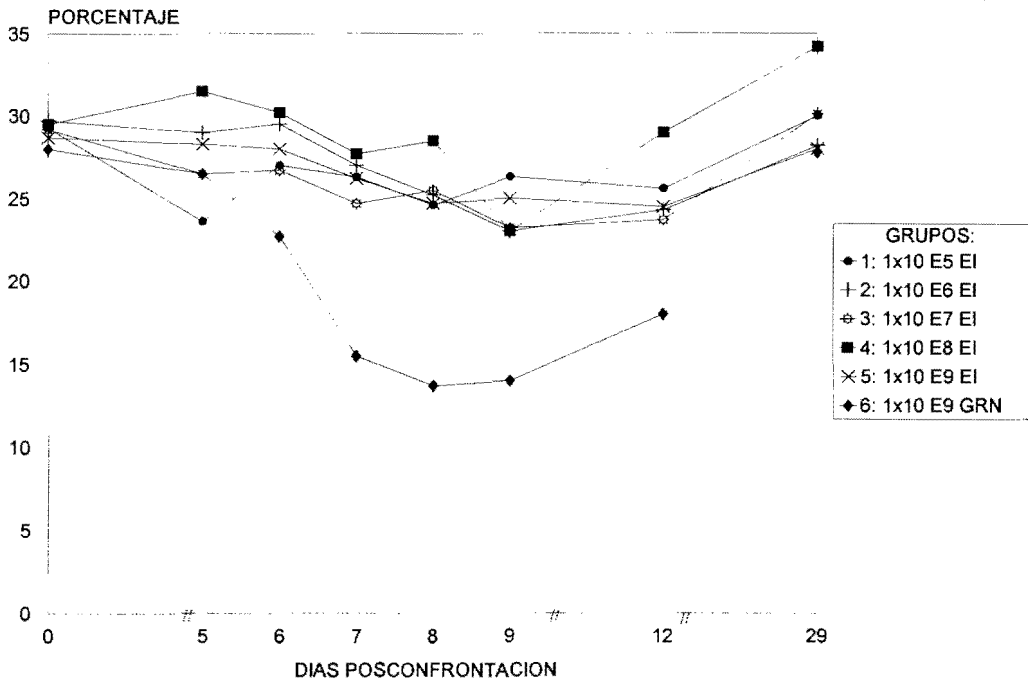
FIGURA 2 . TEMPERATURA RECTAL PROMEDIO EN ANIMALES INMUNIZADOS Y CONFRONTADOS CON CEPA DE CAMPO *



*Cada punto representa el promedio de cuatro animales

INMUNIZACION DE BOVINOS CONTRA *Babesia bigemina*

FIGURA 3 . VALOR PROMEDIO DE VCA EN ANIMALES INMUNIZADOS CONFRONTADOS CON CEPA DE CAMPO *



*Cada punto representa el promedio de cuatro animales

RESULTADOS.

Experimento I. Con excepción de los animales inoculados con la dosis más baja, 10^5 EI, todos los animales de los cuatro grupos que recibieron el aislado de campo de *B. bigemina* resultaron severamente afectados por la infección, presentando temperatura promedio por grupo superior a los $40\text{ }^\circ\text{C}$ y con duración de por lo menos dos días, descensos en el VCA desde 29.6% hasta 41.6%, con respecto a los valores de VCA basales, y porcentajes de eritrocitos infectados desde 0.06% a 1.0%. Los resultados de la evaluación de la patogenicidad del aislado de campo de *B.*

bigemina utilizada se muestran en el Cuadro 1, donde se observa que en la medida en que se incrementa la dosis de eritrocitos infectados en el inoculo (10^5 - 10^9), tienden a acortarse los períodos de incubación (día PI en el que se determina un aumento de temperatura $\geq 39.5\text{ }^\circ\text{C}$) y prepatente (día PI en el que se determina la presencia de eritrocitos infectados en frotis sanguíneo); la temperatura rectal en los bovinos es más elevada y persiste durante más días; y la reducción en el valor de VCA promedio es más drástica. Dos de los animales de los grupos

inoculados con 10^5 y 10^7 EI, sufrieron la enfermedad en menor grado y no requirieron tratamiento. Sin embargo, y para evitar la muerte, el resto de los animales fue tratado entre los días siete y ocho PI (Cuadro 1). No obstante que todos los animales inoculados con 10^6 EI tuvieron que recibir tratamiento específico para evitar su muerte, el hecho de que dos de los animales del grupo inoculado con 10^7 EI no requirieran tratamiento, definió que la dosis de desafío a utilizarse en el experimento III fuese de 10^8 EI.

Experimento II. No se observaron cambios significativos en las variables estudiadas en ninguno de los grupos de animales inmunizados con las diferentes dosis del parásito derivado de cultivo *in vitro* (Cuadro II). La temperatura corporal promedio no se elevó por arriba de los 39.8 C, y el porcentaje promedio de VCA no descendió más del 13.2%, con respecto al valor de VCA basal en ninguno de los grupos. Las parasitemias observadas en los tres grupos inoculados con las dosis más bajas fueron $<0.01\%$, y en los grupos inmunizados con 10^8 EI y 10^9 EI fueron del 0.02% y 0.04%, respectivamente, presentándose ésta por un máximo de tres días. Todos los animales inmunizados seroconvirtieron al día 12 posinmunización, manteniendo títulos promedio de anticuerpos hasta de 1:2320 el día 48 posinmunización, para posteriormente declinar a los 153 días PI, y manteniéndose bajos hasta el día de confrontación (Figura 1).

Experimento III. A la confrontación con la cepa de campo de *Babesia bigemina*, los animales de los grupos vacunados reaccionan rápidamente, incrementando los títulos promedio de anticuerpos anti-*B.*

bigemina hasta de 1:2500 en algunos animales, hacia los siete y 14 días posconfrontación (Figura 1). Los resultados de las variables analizadas durante la confrontación de los animales inmunizados se presentan en el Cuadro 3. Entre los días cinco y seis posconfrontación, se observaron al microscopio parásitos intraeritrocíticos en todos los bovinos de los grupos inmunizados, con parasitemias de $<0.01\%$ en todos los grupos, con excepción del grupo inmunizado con 10^9 , en el que se determinó una parasitemia promedio del 0.02%. En contraste, el promedio de las parasitemias de los animales del grupo testigo fue 1.1%. Los resultados de las variables de TR y VCA se muestran en las Figuras 2 y 3, donde se observan las diferencias que se presentaron en ambas variables entre los grupos inmunizados y el grupo testigo, siendo la más importante el descenso del 51.8% en el valor del VCA, con respecto al VCA basal que se observó en el grupo testigo, contra un descenso del 17.0% en promedio de los cinco grupos inmunizados. Dado que los animales del grupo testigo mostraron cambios significativos en las variables analizadas y padecieron la enfermedad en forma severa (4), estos tuvieron que ser tratados con babesiacida específico (Imidocarb, Imizol[®] Mallinckrodt Vet, México). En contraste, y a pesar de haberse presentado fiebre por tres días en los animales del grupo 5, ninguno de los animales vacunados requirió el tratamiento, dado que, después de una evaluación clínica y tomando en cuenta las variables analizadas, se consideró que los animales se encontraban físicamente sanos y en franca recuperación hacia el día 12 posconfrontación.

DISCUSION

La variación en los efectos biológicos producidos y medidos en el hospedero, posterior a una infección por *Babesia* spp en bovinos, está dada en gran parte, por las características de virulencia y patogenicidad de la población de parásitos utilizados para inducir tal infección (3,4,6,10,11,15). Sin embargo, otros factores importantes a considerar son los relacionados con el hospedero bovino, tales como: edad, sexo, estado nutricional, estado fisiológico, estado inmune, tipo de bovino, susceptibilidad del hospedero (tanto a la garrapata vector, como a *Babesia* spp) y los relacionados con los métodos de preparación y rutas de administración del inóculo conteniendo los parásitos en estudio (2,3,4,5,6,10,12,14,15,20,21). El curso de la infección observada en los animales inoculados con las diferentes dosis del aislado de campo de *B. bigemina*, demuestra en este estudio que, salvo por la respuesta de los cuatro animales aparentemente resistentes, la población de parásitos utilizada es lo suficientemente virulenta como para provocar la manifestación clínica severa, en por lo menos 60% de los animales susceptibles inoculados (4). Previamente se ha demostrado que existe una relación inversa entre la duración de los períodos de incubación y/o prepatente, y el número de parásitos presente en el inóculo (20,22). Animales que recibieron sangre infectada, obtenida de portadores sanos y conteniendo pocos eritrocitos infectados con *B. bigemina*, tuvieron un período de incubación más prolongado que aquellos que recibieron sangre de animales con la infección patente (22). De igual forma, los animales inoculados con 10^8 y 10^7 eritrocitos

infectados con *B. bigemina* presentaron períodos prepatentes de seis y nueve días, respectivamente (20).

La reacción causada por la cepa de campo de *B. bigemina* en los animales inoculados en este estudio puede clasificarse como severa, con base en los parámetros evaluados, ie, fiebre con cuatro días de duración y un máximo decremento en el valor de VCA de hasta 41.6%. En general, la infección causada por *B. bigemina* en los bovinos conduce a una anemia hemolítica del tipo macrocítica hipocrómica (23), la cual si no se interviene a tiempo, puede causar la muerte de los animales infectados (23,24). En contraste, los animales inoculados con organismos derivados de cultivo *in vitro* del experimento II muestran ya sea cambios moderados o ausencia de ellos de acuerdo a los parámetros evaluados, resultando más inocua la dosis de 10^7 EI, ya que los animales que recibieron esta dosis como inóculo mostraron el menor decremento en el valor promedio de VCA (4.8%). Este decremento es comparativamente más bajo que el producido por la cepa G vacunal (17.4%) de *B. bigemina* australiana (25), o por la cepa SIA vacunal (20.7%) de *B. bigemina* argentina (5), mantenidas en cultivo por 100 y ≈ 76 días, respectivamente, y cuando son utilizadas a la misma dosis pero inoculadas por vía subcutánea.

Aún cuando se presentaron bajas parasitemias en los animales inmunizados con la cepa de *Babesia bigemina*, es claro que las condiciones de cultivo *in vitro*, no interfirieron con la infectividad del parásito; sin embargo, confirmaron el proceso de atenuación que esta cepa ha sufrido durante su propagación continua en

cultivo por un período prolongado (15).

No obstante, la infección y subsecuente multiplicación de un organismo de reducida virulencia o atenuado, es un factor deseado en un inmunógeno vivo, ya que éste al estar circulando por períodos relativamente prolongados en el hospedero bovino, podría estimular el sistema inmune de una manera más constante y quizá más efectiva. Esto se manifiesta como la determinación de un título de anticuerpos relativamente elevado anti-*B. bigemina*, elucidado por la inoculación de organismos derivados de cultivo *in vitro* en los animales de este estudio.

Si bien es cierto que un elevado título de anticuerpos anti-*Babesia* no se correlaciona con protección en animales que son posteriormente confrontados (26), los títulos de anticuerpos determinados por medio de la prueba de inmunofluorescencia indirecta han sido considerados como una evidencia de la infectividad de las cepas vacunales de *Babesia* (5, 27), pero también como una medida indirecta de la duración de la inmunidad contra *Babesia* spp (5, 28). Así, se han detectado anticuerpos anti-*Babesia*, los cuales comienzan a incrementarse entre los días 10-20 posvacunación, alcanzando los títulos más altos entre los 25-50 días posvacunación, y disminuyendo a partir del día 30-60 posvacunación (5, 27). Los resultados obtenidos en este estudio coinciden en parte con los publicados recientemente (27), en los que se indica que los máximos títulos de anticuerpos anti-*B. bigemina* se alcanzan entre los 40 y 50 días posinmunización.

En la literatura se ha señalado que no existe

evidencia que demuestre que los bovinos puedan resistir una infección por *Babesia* al extremo de inhibir completamente la multiplicación de todas las cepas o aislados a los cuales ellos pudieran estar expuestos (29). De esta forma, la inmunidad conferida por un inmunógeno es mejor evaluada al medir la intensidad de infección posconfrontación con cepas o aislados cuyas características de virulencia hayan sido previamente evaluadas. En este estudio se satisface tal requisito, al compararse la intensidad de infección registrada en los animales testigo (severa), contra la registrada en los animales inmunizados con la cepa derivada de cultivo *in vitro* (leve a moderada), posterior a una confrontación heteróloga y con una población de organismos virulentos (aislado de campo). Así, en este estudio se demostró que todos los animales inmunizados, sin importar la dosis de parásitos administrados, resistieron la confrontación con un aislamiento de campo, que fue lo suficientemente patógeno como para matar a los cuatro animales del grupo testigo. Sin embargo, es de hacer notar que dentro de los grupos de animales inmunizados con *B. bigemina* derivada de cultivo *in vitro*, se observó una intensidad de infección más alta, pero sin llegar a severa, en el grupo que recibió 10^9 EI, manifestándose como fiebre de hasta tres días de duración, una mayor y más prolongada parasitemia promedio, y un mayor decremento en el valor de VCA. Este efecto puede ser debido en parte, a la excesiva cantidad de organismos inoculados (y por lo tanto, más masa antigénica), la cual pudiera conducir a un estado de daño o disfunción del sistema inmune, i.e., inmunotolerancia, evidenciada como un estado de respuesta inmune disminuída en uno o más de los

procesos interrelacionados del sistema inmune (30). En este estudio en particular se evaluó únicamente la respuesta humoral del sistema inmune. Sin embargo, se pudo comprobar que el grupo de animales inmunizado con 10⁹ EI registró el título promedio de anticuerpos más bajo (1:1,500) entre los 41 y 55 días posinmunización (Figura 1).

Es importante conocer la duración de la inmunidad conferida a los bovinos por un inmunógeno, especialmente si se piensa implementar regímenes de vacunación en una determinada región, o si se planea introducir ganado altamente susceptible a zonas tropicales y subtropicales de alto riesgo de babesiosis. El efecto protector de vacunas contra *Babesia* spp, generalmente se considera prolongado (28, 29). En Australia, por ejemplo, usualmente se recomienda una sola vacunación del ganado en zonas endémicas de babesiosis (3,28,29). En condiciones de campo, la inmunidad estimulada mediante la vacunación se refuerza ante la confrontación continua y persiste de por vida, siempre y cuando los animales se expongan a los aislados de campo, transmitidos por la garrapata vector (3, 26, 28, 29).

Estudios comparables a éste, señalan una duración de inmunidad protectora en animales vacunados con cepas mantenidas en cultivo *in vitro*, de por lo menos cinco meses, cuando los animales se confrontan con 10⁸ EI de un aislado virulento de *B. bigemina* (5, 25). En este estudio se pudo comprobar que la duración de la inmunidad conferida por el inmunógeno derivado de cultivo *in vitro* es de por lo menos siete meses. Se estableció también, que los

promedios de máximo decremento en el valor de VCA determinado en los animales confrontados (18.5%-20.3%), se encuentran dentro de los límites tolerables de severidad o intensidad de infección (4, 5, 25), no requiriéndose el tratamiento anti-babesial. Se confirma además, que tanto la inmunogenicidad como la avirulencia de la cepa derivada de cultivo *in vitro* se mantiene y no ha sido apreciablemente afectada por su prolongado mantenimiento en cultivo (15).

En conclusión, las características de inocuidad, inmunogenicidad y capacidad protectora de la cepa de *B. bigemina* derivada de cultivo *in vitro* (denominada BIS-1), son altamente satisfactorias cuando es inoculada en bovinos susceptibles, por lo que se prevé la inclusión de ésta en un preparado combinado con una clona de *B. bovis* derivada también de cultivo *in vitro* (31). Una vez establecidos y satisfechos los criterios de inocuidad, inmunogenicidad y potencia del preparado combinado, un inmunógeno combinado de organismos vivos de reducida virulencia y derivados de cultivo *in vitro* podría, eventualmente, utilizarse como vacuna para proteger al ganado contra la babesiosis causada por *B. bigemina* y *B. bovis*. Los resultados de estudios a publicarse posteriormente, indican que el método es factible de llevarse a cabo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del Dr. Lucious Chieves, Dept. Bacteriology, NVSL, APHIS, USDA, en Ames, IA., al donar el aislado de *B. bigemina* para confrontación. Los autores agradecen también la importante labor técnica de la

Bióloga Carmen Rojas Martínez, al mantener el cultivo continuo de *Babesia* en el laboratorio.

PROTECTIVE CAPABILITY IN CATTLE OF AN *in vitro* CULTURE DERIVED *Babesia bigemina* STRAIN

SUMMARY

Figueroa M J V, Cantó A G J, Alvarez M J A, Lona G R, Ramos A J A, Vega M C A. *Téc. Pecu. Méx.* Vol 36 No 2 1998 pp 95-107. To assess the protection conferred by an *in vitro* culture-derived *Babesia bigemina* strain, 24 susceptible Holstein young bulls (12-14 months old) were allotted in groups of four animals each. Five groups were inoculated IM with ten-fold increasing dosis (10^5 - 10^9) of parasite infected erythrocytes (IE). A sixth group of bulls remained as control group inoculated with normal bovine erythrocytes. Animals were monitored by recording rectal temperature (RT), packed cell volume (PCV) and percent parasitemia (PPE). All animals became infected after immunization and showed none to mild clinical signs of disease. Seven months after immunization all groups of cattle, including the control animals, were IM challenged with 10^8 IE of a virulent *B. bigemina* field isolate previously evaluated as such. Eight days post-challenge (PC) all principals and control animals became infected. However, only cattle vaccinated with the highest dose (10^9 IE) showed a peak of fever (40.2 C). Regardless the immunization dose received, all immunized animals resisted challenge with the virulent isolate. In contrast, control animals showed a relatively high PPE (1.1%), fever (40.7 C) for up to four days, and a maximum decrease in PCV index of >50%, requiring specific babesiacide treatment to avoid death. Thus, the attenuated, *in vitro* culture-derived *B. bigemina* strain used as an immunogen in this study, conferred solid protection in cattle when challenged with a virulent field isolate.

KEY WORDS: *Babesia bigemina*, *in vitro* culture, Immunization, Cattle protection.

REFERENCIAS

1. McCosker P J. The global importance of babesiosis. En: Ristic M, Kreier J P. (eds.) *Babesiosis*. Academic Press, New York, 1981:1-24.
2. Alvarez M J A, Cantó A G J. Epidemiología de la babesiosis. En: Soc. Mex. Parasitol. (eds) *PARASITOLOGIA*, Volumen Conmemorativo. México, D.F. 1985. pp. 55-72.
3. Callow L L. Métodos australianos de vacunación contra la anaplasmosis y babesiosis. 1976; *Rev. Mundial Zootec.* 18:9.
4. REDLAB/Programa de Hemoparásitos. Protocolo para evaluar la seguridad y eficacia de los inmunógenos contra la anaplasmosis y babesiosis bovina. FAO, Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile, 1994, pp. 7-10.
5. Echaide I E, de Echaide S T, Guglielmone A A. Live and soluble antigens for cattle protection to *Babesia bigemina*. *Vet. Parasitol.* 1993; 51:35.
6. Dalgliesh R J, Callow L L, Mellors L T, McGregor W. Development of a highly infective *Babesia bigemina* vaccine of reduced virulence. *Aust. Vet. J.* 1981; 57:8.
7. Rogers R J, Dimmock C K, de Vos A J, Rodwell B J. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced *in vivo* against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust. Vet. J.* 1988; 65:285.
8. Levy M, Ristic M. *Babesia bovis*: continuous cultivation in microaerophilus stationary phase culture. *Science* 1980; 207:1218.
9. Vega C A, Buening G M, Green T J, Carson C A. *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am. J. Vet. Res.* 1985; 46:416.
10. Dalgliesh R J. Babesiosis. En: K S Warren (ed.) *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London. 1993; pp 352-383.
11. Salas T E, García, G J, Ramos J A, Rodríguez R, Aboytes R, Buening G M, Vega C A. Patogenia de una clona irradiada de *Babesia bovis* obtenida de cultivo *in vitro*. *Tec. Pecu. Mex.* 1988; 26 (1):36.
12. Timms P, Stewart N P, Rodwell B J, Barry D N. Immune responses of cattle following vaccination with living and non-living *Babesia bovis* antigens. *Vet. Parasitol.* 1984; 16:243.
13. Jorgensen W K, Waldron S J, McGrath J, Roman R J, de Vos A J, Williams K E. Growth of *Babesia bigemina* parasites in suspension cultures for vaccine production. *Parasitol. Res.* 1992; 78:423.
14. Buening G M, Kuttler K L, Rodriguez S D. Evaluation of a cloned *Babesia bovis* organism as a live immunogen. *Vet. Parasitol.* 1986; 22:235.

INMUNIZACION DE BOVINOS CONTRA *Babesia bigemina*

15. Hernández R, Alvarez J A, Buening G M, Cantó G J, Monroy M, Ramos J A, Vega C A. Diferencias en la virulencia y en la inducción de protección de aislamientos de *Babesia bigemina* derivados de cultivo *in vitro*. Tec. Pecu. Mex. 1990; 28 (2):51.
16. Goldman M, Pipano E, Rosenberg A S. Fluorescent antibody tests for *Babesia bigemina* and *Babesia berbera*. Res. Vet. Sci. 1972; 13:77.
17. Vega C A, Buening G M, Rodriguez S D, Carson C A, McLaughlin K. Cryopreservation of *Babesia bigemina* for *in vitro* cultivation. Am. J. Vet. Res. 1985; 46:421.
18. Jain N C. Schalm's Veterinary hematology 4th Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986:41.
19. Figueroa J V, Cantó G J, Juárez J, Ruiz L F. *Babesia bovis*: Cultivo *in vitro*, establecimiento y condiciones óptimas de multiplicación. Tec. Pecu. Mex. 1984; 46(2):46.
20. González E F, Todorovic R A, Thompson K C. Immunization against anaplasmosis and babesiosis: Part I. Evaluation of immunization using minimum infective doses under laboratory conditions. Tropenmed. Parasit. 1976; 27:427.
21. Lohr K F. Susceptibility of non-splenectomized and splenectomized Sahiwal cattle to experimental *Babesia bigemina* infection. Zbl. Vet. Med. B. 1973; 20:52.
22. Pipano E. Immunization of cattle against *Babesiella berbera* infection. I. Infection of cattle with blood from patent and latent carriers. Refuah Veterinarith. 1969; 26:11.
23. Wright I G. Observations on the hematology of experimentally induced *Babesia argentina* and *B. bigemina* infections in splenectomized calves. Res. Vet. Sci. 1973; 14:29.
24. Smith R D, Molinar E, Larios F, Monroy J, Trigo F, Ristic M. Bovine babesiosis: Pathogenicity and heterologous species immunity of tick-borne *Babesia bovis* and *B. bigemina* infections. Am. J. Vet. Res. 1980; 41:1957.
25. Jorgensen W K, De Vos A J, Dalglish R J. Comparison of immunogenicity and virulence between *Babesia bigemina* parasites from continuous culture and from a splenectomised calf. Aust. Vet. J. 1989; 66:371.
26. Mahoney D F. Bovine babesiosis: The passive immunization of calves against *Babesia argentina* with special reference to the role of complement fixing antibodies. Exp. Parasitol. 1967; 20:119.
27. Guglielmone A A, Lugaresi C I, Volpogni M M, Anziani O S, Vanzini V R. Babesial antibody dynamics after cattle immunization with live vaccines, measured with an indirect immunofluorescence test. Vet. Parasitol. 1997; 70:33.
28. Tjornehoj K, Lawrence J A, Whiteland A P, Kafuwa P T. Field observations on the duration of immunity in cattle after vaccination against *Anaplasma* and *Babesia* species. Onderstepoort J. Vet. Res. 1996; 63:1.
29. Callow L L. Vaccination against bovine babesiosis. En: Miller H, Pino J A, McKelvey J J. (eds.) Immunity to blood parasites of animals and man. Advances in experimental medicine and biology. Vol. 93. Plenum Press, New York, 1977:121-149.
30. Muneer M A, Farah I O, Newman J A, Goyal S M. Immunosuppression in animals. Br. Vet. J. 1988; 144:288.
31. Cantó G J, Figueroa J V, Alvarez J A, Ramos J A, Vega C A. Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivado de cultivo *in vitro*. Tec. Pecu. Mex. 1996; 34:127.