

CAPACIDAD INMUNOPROTECTORA DE UNA CLONA IRRADIADA DE *Babesia bovis* DERIVADA DE CULTIVO *in vitro*^a

Germinal Jorge Cantó Alarcón ^b
Julio Vicente Figueroa Millán ^c
Jesús Antonio Álvarez Martínez ^c
Juan Alberto Ramos Aragón ^c
Carlos Agustín Vega y Murguía ^c

RESUMEN

Se llevaron a cabo varios experimentos con objeto de conocer la capacidad de protección de una clona de *Babesia bovis*, derivada de cultivo *in vitro* e irradiada. Inicialmente, un aislado de campo fue caracterizado biológicamente para conocer sus propiedades de virulencia y patogenicidad, a diferentes dosis en animales susceptibles. En el segundo experimento, se utilizaron 24 bovinos Holstein de entre 12 y 18 meses de edad, divididos al azar en seis grupos de cuatro animales cada uno. Cuatro animales de cada grupo fueron inmunizados por vía IM con dosis de 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ y 10⁹ eritrocitos infectados (Ei), quedando un grupo como testigo. Cinco a siete días posinmunización, todos los animales inoculados presentaron signos, de leves a graves, clásicos de la infección, como aumento de temperatura, caída del volumen celular aglomerado (VCA) y presencia de parásitos en sangre, sin que esto haya causado la muerte en alguno de ellos. Siete meses después de la inmunización, los 23 animales restantes fueron desafiados con una dosis de 10⁸ Ei con la cepa de campo previamente caracterizada. Los resultados mostraron que, sin importar la dosis de inmunización, los 19 animales inmunizados no sufrieron la enfermedad clínica al desafío con la cepa de campo. En contraste, los cuatro animales del grupo testigo sufrieron severos descensos en el VCA, fiebre elevada por varios días y tuvieron que ser tratados con fármacos para evitar su muerte.

PALABRAS CLAVE: *Babesia bovis*, Clona, Cultivo *in vitro*, Inmunización, Bovino, Protección.

Tec. Pecu. Mex. Vol. 34 No. 3 (1996).

INTRODUCCION

A partir de la primera descripción de *Babesia bovis* por Babes en 1888 (1) y del descubrimiento de Smith y Kilborne en 1893 (2) de la garrapata *Boophilus spp.* como vector biológico de *Babesia bigemina*, se han realizado numerosos ensayos para el control de la enfermedad producida por estos protozoarios sanguíneos. Estas incluyen el control y erradicación del vector, el ataque directo contra *Babesia* mediante productos babesicidas, la preinmunización con sangre proveniente de animales afectados y la vacunación con antígenos inactivados del parásito (3,4,5), o bien con eritrocitos

infectados con parásitos atenuados mediante pases continuos en cultivo *in vitro* e irradiación (6). En la actualidad, el método más extendido para la prevención de la babesiosis bovina es la preinmunización. Esto es, provocar la infección de manera controlada en los animales susceptibles aplicando el tratamiento específico para, por un lado, permitir una suficiente estimulación antigénica y por el otro, evitar la muerte del animal. Entre los muchos inconvenientes de esta acción empírica, está el de la posible transmisión de otros agentes infecciosos a los animales preinmunizados, cuando se les inocula sangre proveniente de un animal portador (7). Esta práctica implica, además, un manejo excesivo de los animales infectados, con el riesgo de no aplicar el tratamiento oportunamente, causando la muerte si se retrasa, ó eliminado al parásito y, por lo mismo, al estímulo antigénico, si se aplica anticipadamente.

Con la aplicación de la tecnología de cultivo *in vitro* de *B. bovis* (8,9) incluyendo la

- ^a Recibido para su publicación el 20 de septiembre de 1996
Parcialmente financiado por PAIEPEME, A.C.
^b Centro Nacional de Investigaciones en Fisiología y Mejoramiento Animal. / INIFAP
Apdo. Postal # 2-29 Querétaro, C.P. 76280 Querétaro.
^c Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria. / INIFAP Km. 11.5 Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos.
Apdo. Postal # 206, CIVAC C.P. 62500, edo. de Morelos.
Dirigir correspondencia y solicitud de separatas a:
Carlos A. Vega y Murguía
Apdo. Postal # 206, CIVAC C.P. 62500, edo. de Morelos.

clonación de la misma (10), ha sido posible obtener subpoblaciones de comportamiento homogéneo. La identificación de éstas como subpoblaciones atenuadas, permitirían su uso como agentes inmunizantes; además, al utilizar la tecnología de cultivo *in vitro*, se disminuiría la posible transmisión de otros agentes infecciosos.

Tomando lo anterior como base, el presente estudio tuvo como objetivo la evaluación de la patogenicidad, inmunogenicidad y capacidad protectora de una clona irradiada de *B. bovis* derivada de cultivo *in vitro*.

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico

Bovinos: Se utilizaron 40 terneros de la raza Holstein, de entre 12 y 18 meses de edad, provenientes de zonas libres de garrapata *Boophilus spp.* Los bovinos fueron mantenidos a lo largo del experimento en corrales de tierra, y alimentados con concentrado, silo de maíz y agua *ad libitum*.

Parásitos. Cepa de Campo de *Babesia bovis*: Se utilizó una cepa de laboratorio (Donada por el Dr. Luscious Chives, USDA-APHIS-NVSL, Ames, Iowa, EE.UU.A.) aislada en México y mantenida en forma intermitente en animales intactos, garrapatas y congelación.

Cepa inmunizante: Se utilizó la clona BOR de *B. bovis*, derivada de la cepa KBb (11) por dilución crítica (10) e irradiada en una fuente de ^{60}Co a 187 Grays (Gy) (12), la cual se ha mantenido alternadamente en cultivo *in vitro* y congelación (11) por más de 10 años.

Procedimiento

El estudio se dividió en tres experimentos.

Experimento I. Evaluación del comportamiento de la cepa de campo: Con el objeto de determinar la variabilidad de la infección del aislado de campo, se utilizaron 16 bovinos que se distribuyeron al azar en cuatro grupos de cuatro animales cada uno. Cada grupo de animales recibió una dosis diferente de eritrocitos infectados (Ei) por vía

intramuscular (IM) con la cepa de campo. Las dosis utilizadas fueron de 105 Ei para el grupo A, 106 Ei para el grupo B, 107 Ei para el grupo C y 108 Ei para el grupo E. A partir del día de la inoculación y durante los primeros 21 días, los animales se observaron diariamente para diagnosticar la enfermedad clínicamente. Para la identificación directa del protozooario y medición del porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP), se obtuvo sangre por punción de las venas auricular ó caudal ó por raspados de la punta de la cola, para la elaboración de frotis sanguíneos en portaobjetos teñidos con colorante de Giemsa; asimismo, las muestras de sangre se utilizaron para la medición del volumen celular aglomerado (VCA) por el método del microhematocrito(13). Similarmente, se registró diariamente la temperatura rectal (TR).

Experimento II. Inmunización: Al azar se formaron seis grupos de cuatro animales cada uno. Todos los grupos se inocularon por vía IM con diferentes dosis de eritrocitos infectados con la clona irradiada de *B. bovis* (Ei), ó eritrocitos normales (En); ambos provenientes del cultivo *in vitro*. De esta forma, el grupo 1 recibió 105 Ei, el grupo 2, 106 Ei; el grupo 3, 107 Ei; el grupo 4, 108 Ei; el grupo 5, 109 Ei y el grupo 6, que permaneció como testigo, 109En. Diariamente se registró la TR y se colectaron muestras de sangre periférica, para la determinación del VCA y el PEP. Con objeto de observar el comportamiento de los títulos de anticuerpos específicos contra el parásito, mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (14), el día de la inoculación, cada siete días por un mes y posteriormente cada 28 días durante seis meses posinoculación (PI), se obtuvo sangre por punción de la vena yugular y una vez decantado el suero, éste se congeló a -20 C hasta su uso.

Experimento III. Confrontación: Los seis grupos de animales inmunizados en el segundo experimento, se confrontaron, siete

meses después de la inmunización, con una dosis seleccionada del primer experimento, con base en aquella dosis mínima de parásitos que, al ser inoculada por vía IM en los diferentes grupos de animales, desencadenara la presencia de la enfermedad en forma clásica *v.gr.* fiebre, descenso del VCA, parasitemia, hemoglobinuria, ó ictericia; considerándose como la dosis de desafío. A partir del día de la confrontación, a todos los animales se les observó diariamente y se colectaron muestras de sangre para la determinación del VCA, observación de frotis teñidos con colorante de Giemsa para observar el PEP, y obtención del suero para la prueba de IFI, además de registrar la temperatura rectal.

RESULTADOS

Experimento I. Comportamiento de la cepa de campo: Se observó que el periodo de incubación, considerado como el tiempo en que aparece la fiebre >39.5 C, para los diferentes grupos de animales inoculados con dosis de 10⁵, 10⁶, 10⁷ y 10⁸ Ei con la

cepa de campo, fue disminuyendo conforme aumentó la dosis inoculada y estos fueron de 9, 7, 6 y 5 días respectivamente. Los resultados de esta fase se presentan en el Cuadro 1. La temperatura rectal máxima en todos los grupos fue superior a los 40 C y todos los animales manifestaron fiebre por un mínimo de cinco días. En relación al VCA, todos los animales sufrieron un descenso considerable, observándose el mayor decremento en el grupo inoculado con la dosis mas alta de parásitos, con un 41.7%. La presencia de los protozoarios en los frotis sanguíneos se detectó en los 16 animales, los tres grupos inoculados con las dosis mas bajas de parásitos presentaron parasitemias 0.01%, mientras que el grupo de animales inoculados con la dosis de 10⁸ Ei presentó parasitemias de 0.02%. Con objeto de evitar la muerte de los animales, dos bovinos del grupo inoculado con 10⁵, tres bovinos de los grupos inoculados con 10⁶ y 10⁷ y todos los del grupo inoculado con 10⁸ Ei, tuvieron que ser tratados con un fármaco (IMIZOL)*** para evitar su muerte. No obstante el

CUADRO 1. CURSO DE LA INFECCION EN BOVINOS HOLSTEIN INOCULADOS CON DIFERENTES DOSIS DE UN AISLADO DE CAMPO DE *Babesia bovis*.

PARAMETRO \ DOSIS	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Periodo de Incubación (días)*	9	7	6	5
Fiebre > 39.5 °C (días)*	5	8	7	5
Fiebre > 39.5 °C (# animales)	4	4	4	4
Temperatura máxima (°C)*	40.8	40.6	40.4	41.5
Valor mínimo individual VCA** (%)	17	18	14	14
Valor mínimo VCA (%)*	20.3	20.3	19	16.5
Máxima reducción VCA (%)*	32.1	28.6	35.6	41.7
Máxima reducción VCA (día)	14	11	11	9
Periodo Prepatente (días)*	11	9	8	8
Eritrocitos Parasitados (%)*	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.02
Parasitemia (días)*	3	3	3	2
Quimioterapia (# animales)	2 / 4	3 / 4	3 / 4	4 / 4
Mortalidad (# animales)	0 / 4	0 / 4	1 / 4	1 / 4

* Promedio de 4 animales por grupo

** VCA = Volumen Celular Aglomerado

*** Donado por: Laboratorios Mallinckrodt Veterinary de México S.A. de C.V.

tratamiento, un animal de cada uno de los grupos inoculados con las dosis más altas, presentaron desordenes de tipo encefálico, típico de babesiosis por *B. bovis* y murieron. Experimento II. Inmunización: Los animales inoculados con las diferentes dosis de parásitos de la cepa BOR de *B. bovis*, manifestaron una reacción clínica, de moderada a ligeramente severa, dependiendo de la dosis inoculada. Ninguno de ellos murió por efecto de la inmunización, ni requirió tratamiento para evitar la muerte. Un animal perteneciente al grupo 5 (10⁹ Ei), sufrió retículo-pericarditis traumática y tuvo que ser sacrificado. Los animales inoculados con dosis de 10⁵ mostraron en promedio sólo un día de fiebre, mientras que, en los cuatro grupos restantes, la duración de la fiebre fue más persistente, con un promedio de cuatro días. La máxima reducción del VCA, relativa al valor inicial, varió de 23% para el grupo inoculado con la dosis más baja (10⁵), hasta 41.2% para el grupo con la dosis más alta (10⁹). Todos los grupos presentaron parasitemias bajas, pero

constantes, con una duración promedio de siete días (Cuadro 2), con excepción del grupo de animales inoculados con la dosis más elevada, el cuál tuvo una duración mayor, con un promedio de 10 días. (Cuadro 2). La dosis de 10⁸ Ei por vía IM, fue seleccionada como la más recomendable para asegurar un desafío uniforme. Los bovinos comenzaron a recuperarse a partir del día 14 PI y seroconvirtieron ese mismo día (Figura 1).

Experimento III. Confrontación: El Cuadro 3 muestra los resultados obtenidos en esta fase del experimento. El desafío de los animales inmunizados con diferentes dosis de parásitos de la clona BOR, mostró que con excepción de un animal del grupo inmunizado con la dosis de 10⁹Ei, el cual sufrió un descenso del 25% del VCA inicial y presentó temperatura por arriba de los 40 C, el resto de los animales, sin importar la dosis de inmunización, no sufrieron alteraciones importantes en TR, ya que la temperatura en ninguno de los otros grupos se elevó por arriba de los 40 C, ni la

CUADRO 2. CURSO DE LA INFECCIÓN EN BOVINOS HOLSTEIN INOCULADOS CON DIFERENTES DOSIS DE UNA CLONA IRRADIADA DE *Babesia bovis*

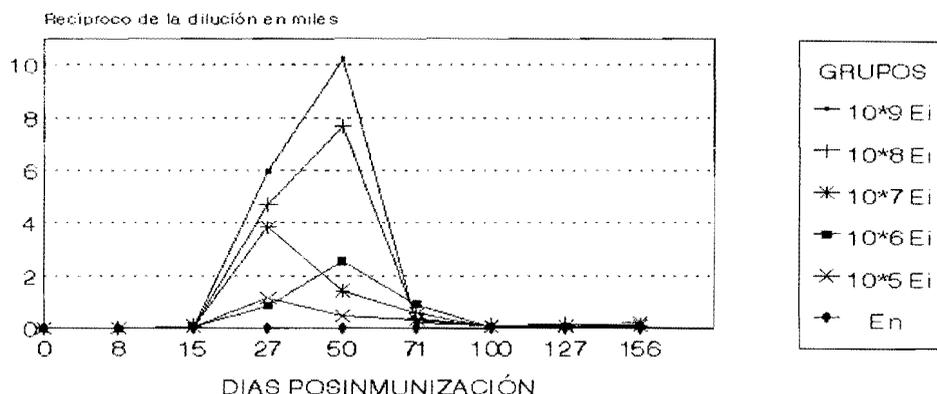
CONCEPTO \ DOSIS	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
Periodo de Incubación (días)*	8	5	5	5	5
Fiebre > 39.5 °C (días)*	1	4	4	4	4
Fiebre > 39.5 °C (# animales)	4	3	4	4	4
Temperatura máxima (°C)*	40.1	40.2	40.4	40.6	41
Valor mínimo individual VCA** (%)	20	14	14	12	16
Valor mínimo VCA (%)*	24.8	25	23.8	21.3	18.5
Máxima reducción VCA (%)*	23	26	26	31.5	41.2
Máxima reducción VCA (día)	15	15	15	15	8
Periodo Prepatente (días)*	8	8	8	5	5
Eritrocitos Parasitados (%)*	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02
Parasitemia (días)*	7	7	7	7	10
Quimioterapia (# animales)	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
Mortalidad (# animales)	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	1 / 4***

* Promedio de 4 animales por grupo

** VCA = Volumen Celular Aglomerado

*** Muerte por Reticulo-pericarditis traumática

FIGURA 1. TITULO PROMEDIO DE ANTICUERPOS IgG ANTI-Babesia*
EXPERIMENTO II. INMUNIZACION



*= Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta
Ei= Eritrocitos infectados con clona irradiada
En= Eritrocitos normales

disminución del VCA fue superior al 20% con respecto al valor inicial.

En contraste, los animales del grupo testigo, presentaron una temperatura superior a los 40 C por seis días consecutivos, una baja del VCA con respecto al original del 26% y un PEP del 0.2% por cinco días

consecutivos. Todos los animales de este grupo tuvieron que ser tratados para evitar su muerte. En relación al título de anticuerpos específicos contra *B. bovis*, los resultados se muestran también en la Figura 2. En todos los animales inmunizados se observa una rápida respuesta de

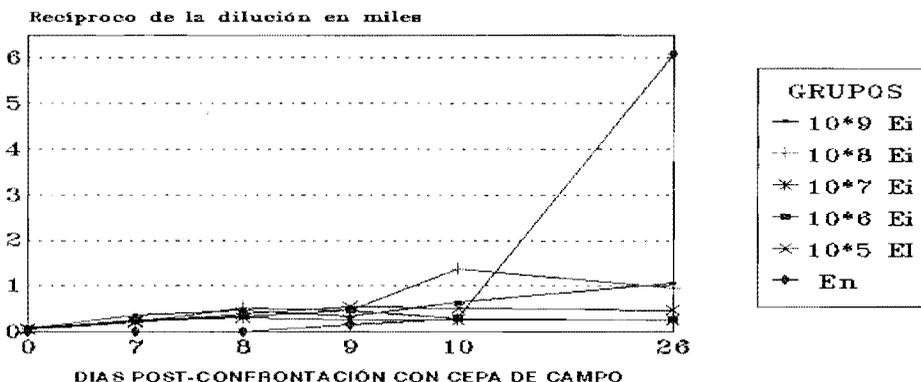
CUADRO 3. CURSO DE LA INFECCIÓN EN BOVINOS HOLSTEIN INMUNIZADOS CON DIFERENTES DOSIS DE UNA CLONA IRRADIADA Y CONFRONTADOS CON UN AISLADO VIRULENTO DE *Babesia bovis*.

CONCEPTO \ DOSIS	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	Testigo
Periodo de Incubación (días)*	-	-	5	-	5	5
Fiebre > 39.5 °C (días)*	-	-	1	-	1	6
Fiebre > 39.5 °C (# animales)	-	-	2	1	3	4
Temperatura máxima (°C)*	39.1	39.2	39.8	39.3	39.7	41
Valor mínimo individual VCA** (%)	22	25	23	22	21	19
Valor mínimo VCA (%)*	23.5	26.7	25	25.5	23.3	21
Máxima reducción VCA (%)*	13.8	9.75	11.3	9.8	19	26
Máxima reducción VCA (día)	9	6	5	9	9	10
Periodo Prepatente (días)*	8	9	6	5	5	5
Eritrocitos Parasitados (%)*	< 0.01	< 0.01	0.02	0.04	< 0.01	0.2
Parasitemia (días)*	1	1	2	4	1	5
Quimioterapia (# animales)	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 3	4 / 4
Mortalidad (# animales)	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 3	0 / 4

* = Promedio del grupo

** VCA = Volumen Celular Aglomerado

FIGURA 2. TITULO PROMEDIO DE ANTICUERPOS IgG ANTI-Babesia*
EXPERIMENTO III. CONFRONTACIÓN



*= Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta
Ei= Eritrocitos infectados con clona irradiada
En= Eritrocitos normales

anticuerpos anti-*Babesia* a partir del día siete posconfrontación (PC), mientras que en los animales del grupo testigo, la respuesta se hace aparente a partir del día 10 PC.

DISCUSION

En el presente estudio se demuestra que la clona BOR de *Babesia bovis* es lo suficientemente inmunogénica como para inducir una protección sólida en bovinos confrontados, siete meses después de su inoculación con un aislado virulento del protozoario.

Con relación a la patogenicidad de la cepa de campo, la morfología del parásito, aunado al curso y el cuadro clínico de la enfermedad, ratificaron la característica de una infección causada por *B. bovis*; en este caso, se consideró a la cepa de campo como virulenta, capaz de provocar la muerte de los animales, aún a pesar del tratamiento específico. El que un animal inoculado con la dosis de 10⁷ Ei, no presentara la enfermedad en la forma clásica observada en el resto de los animales inoculados con la misma dosis, fue decisivo para considerar que 10⁸ Ei por vía IM, sería la mejor dosis para desafío con este aislado.

No obstante que a la confrontación, los

animales previamente inmunizados no presentaron ningún tipo de problema, los resultados obtenidos durante la inmunización producen dudas en cuanto la completa atenuación de la clona. Se ha sugerido que las ventajas de la irradiación consisten en que, los parásitos quedan lo suficientemente debilitados como para ejercer su acción patogénica en el huésped, pero si son capaces de estimular una respuesta inmune lo suficientemente fuerte como para proteger al huésped contra futuras infecciones (15). Este no es el caso en el presente ensayo, ya que después de la irradiación, el protozoario se multiplicó en condiciones de cultivo libremente, con tiempo suficiente para recuperar sus funciones metabólicas, si acaso hubieran sido alteradas por la acción ionizante (12). Lo que si resulta aceptable es que las modificaciones inducidas por la irradiación, hayan alterado el ADN parasitario y que su expresión metabólica pudiera no haber provocado cambios letales para el mismo, pero si haber permitido modificar su comportamiento, expresando antígenos que lo convirtieran en un sujeto más susceptible a la acción del sistema inmunocompetente del bovino ó disminuyendo parcialmente su virulencia (15). Esto último puede aseverarse,

ya que la infección fue limitante, la temperatura en todos los grupos fue superior a los 40 C y el descenso del VCA se determinó por arriba del 23%, incrementándose en forma directamente proporcional al incremento de la dosis inoculada. Diversos estudios utilizando cepas irradiadas del parásito, ó clonas sin irradiar de *B. bovis* muestran resultados similares en cuanto al decremento que se observa en el volumen celular aglomerado y la fiebre producida a los animales. Buening *et al.* (16) presentan resultados similares, al observar decrementos hasta del 50% del VCA original y respuestas febriles de alrededor de 3.8 días promedio utilizando una clona de *B. bovis*. En el presente estudio, la duración del periodo febril varió entre un día, para el grupo inoculado con 105, hasta cuatro días para los grupos inoculados con 108 y 109 Ei. Yunker *et al.* (17) observaron, al utilizar una cepa atenuada por pases en cultivo *in vitro* en animales esplenectomizados, una caída del VCA del 49%. Bock *et al.* (7) al utilizar una cepa atenuada de *B. bovis* describen un descenso del VCA de alrededor del 43%. Pérez, (18) al inmunizar bovinos adultos con una cepa de *B. bovis* irradiada, observó disminuciones que oscilan entre el 14% y el 27% dependiendo de la dosis inoculada de eritrocitos infectados. Como se puede observar, el primer contacto que sufren los bovinos adultos con el parásito, sin importar la forma de atenuación, irradiación o pases en cultivo *in vitro* y dosis de inmunización, causa una disminución considerable del VCA y la presencia de fiebre. Con estos resultados se podría hipotetizar que, hasta la fecha las cepas o clonas de *B. bovis*, atenuadas por irradiación o por pases en cultivo *in vitro*, no han sufrido un proceso completo de atenuación ya que, aunque no producen una signología de tipo nervioso, la reacción febril y la baja del VCA producida en los bovinos inoculados las colocarían dentro de una categoría de moderada

patogenicidad. Otros estudios (6,19) han demostrado que las modificaciones inducidas por la irradiación ionizante, no necesariamente conllevan a una condición de atenuación. En un estudio en el que se evaluaron diferentes subpoblaciones de *B. bigemina* irradiadas e igualmente derivadas de cultivo *in vitro*, todas se comportaron de manera diferente; mientras que, algunas mostraron un comportamiento indicativo de atenuación, otra resultó ser más virulenta que la población que le dio origen (6).

En cuanto a la capacidad protectora al desafío, en el presente trabajo se observó que sin importar la dosis de inmunización, todos los animales se encontraban protegidos siete meses después de la inmunización.

No cabe la menor duda de que el aislado de confrontación utilizado, se comportó como un aislado virulento al ser capaz de inducir cambios fisiológicos notables en los animales susceptibles del grupo testigo.

El alto nivel de protección al desafío (100%) alcanzado con esta clona irradiada, podría deberse también en parte a que ambas cepas pudieran tener el mismo origen. Con anterioridad, otros autores han manifestado que el nivel de protección, para el caso de *B. bovis*, está asociado el fenómeno de especificidad de especie (20). Otras experiencias (21, 22) han demostrado que los desafíos en los que el inmunógeno ó la fuente del antígeno y la cepa de confrontación son similares ú homólogos, son más exitosos para obtener una respuesta protectora más favorable, en contraste con aquellos en los que las cepas de desafío son de diferente origen geográfico ó heterólogas (23). Sin embargo, en nuestro país, el comportamiento biológico de cepas de distinto origen geográfico no ha sido documentado. En este caso, se asume que las diferencias en el origen geográfico de las cepas no son, necesariamente, representativos de variabilidad antigénica; aún cuando así fuese, es aceptable

considerar que la infección causada por la clona atenuada, puede activar los mecanismos de defensa, específicos e inespecíficos que permiten al bovino sobreponerse a la infección por la cepa de desafío.

En relación a la presencia de anticuerpos, se demostró que la clona BOR, es antigénica al presentarse altos títulos de anticuerpos IgG (1:2,560 y 1:5,120) para el día 28 PI en los animales inmunizados con las dosis de 107 y 108 Ei, respectivamente; aunado al título de 1:10,240 para el día 30 PI de los animales inmunizados con la dosis de 109 Ei. Los títulos de anticuerpos disminuyeron conforme disminuyó la dosis de inmunización.

Para el día 180 PI, los títulos se encontraban por debajo de 1:320 en todos los grupos de animales inmunizados, sufriendo una respuesta anamnésica a los siete y ocho días PC y llegando a títulos entre 1:320 y 1:1280, inferiores a los observados a la inmunización, lo que podría indicar que la afinidad y avidéz, ó tal vez la clase (15) de los anticuerpos es más importante que la cantidad. Asimismo, no se debe descartar el papel de otros mecanismos específicos involucrados en la protección, p. Ej. de inmunidad celular, que también pudieran estar activados en los animales inmunizados con estos protozoarios.

Una validación exitosa de la capacidad protectora real de esta clona, podría ser verificada mediante la inoculación de animales susceptibles que fueran introducidos a una región endémica de babesiosis, permitiendo la confrontación natural mediante infestación con garrapatas y dilucidar si se obtienen resultados similares, al realizarse bajo condiciones de campo, con prácticas de manejo adecuadas que permitan la expresión completa de la inmunidad adquirida, sin causar un estrés adicional a los animales. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que en México, una vacuna contra la babesiosis bovina deberá

también contener antígenos de *Babesia bigemina*, por ser ambos parásitos ampliamente prevalentes en nuestro país.

Por otro lado, el uso de una vacuna de esta naturaleza, sería recomendable para una sola y única aplicación, en animales susceptibles que habrán de ser expuestos al desafío natural, cuando sean introducidos en zonas endémicas. Por las características de aplicarse una sola vez y a que la dosis del inóculo derivado del cultivo *in vitro* es reducida, la expectativa de inducción de isoanticuerpos, como ha ocurrido en otros casos (24), sería muy limitada. Además, los sistemas de grupos sanguíneos correspondientes que soportan del desarrollo de la clona en el cultivo, proceden de un solo animal donador, en contraste con lo que ha ocurrido en Australia, en la que las cepas se multiplican en múltiples animales donadores, con la consecuente inducción de isoeritrolisis neonatal, asociada, entre otros, al uso de volúmenes mayores de dos ml y a la frecuencia de las inmunizaciones (24).

Con lo anterior se concluye que el proceso de inmunización en contra de *B. bovis* con esta clona es factible, con un alto grado de confiabilidad, principalmente para la protección de ganado especializado altamente susceptible que pretenda ser introducido a las zonas endémicas, tropicales y subtropicales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la gentil colaboración al Dr. Luscius Chives del Departamento de Bacteriología del Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios del Servicio de Inspección de Salud Vegetal y Animal del Departamento de Agricultura de los EE.UU.A., en Ames, Iowa, al donar la Cepa de Laboratorio de *Babesia bovis*.

Así mismo, agradecen la infatigable labor de Carmen Rojas Martínez, por su apoyo en la implementación del cultivo y los ensayos de laboratorio.

IMMUNE PROTECTION CAPABILITY OF AN IRRADIATED *in vitro* DERIVED *Babesia bovis* CLONE.

SUMMARY

Several experiments were carried out to assess the protection conferred by an *in vitro* derived irradiated *Babesia bovis* clone. Initially, a field isolate was characterized in terms of pathogenicity and virulence in susceptible animals. In a second experiment, 24 susceptible Holstein calves (12 - 18 months old) were allotted in groups of four each. Then, five groups were inoculated IM, with ten-fold increasing doses (10^5 - 10^9) of an *in vitro* derived irradiated *B. bovis* clone. A sixth group remained as non-inoculated control. All animals became infected and despite of showing different, mild to severe, signs of the disease such as fever, packed cell volume (PCV) reduction and parasitaemia, none died. In a third experiment seven months after immunization, all 23 remaining animals of the previous experiment were needle-challenged with 10^8 infected erythrocytes of first experiment's *B. bovis* field isolate to evaluate the protection. Regardless of dose received, all 19 immunized animals resisted challenge by the virulent *B. bovis* field isolate. None showed clinical signs, while control animals showed severe PCV reduction, high fever for several days and parasitemia. All four controls required treatment to prevent death.

KEY WORDS: *Babesia bovis*, Clone, *in vitro* cultivation, Immunization, Bovine, Protection.

REFERENCIAS

1. Babes V. Sur l'hémogloburie bacterienne du boef. C.R. Hebd. Sceances Acad. Sci. Paris. 1888; 107:692.
2. Smith T, Kilborne F L. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. U.S.D.A. Bureau of Animal Ind. Bull. 1893. 1:1.
3. Smith R D, Carpenter J, Cabrera A, Gravelly S M, Erp E E, Osorno M, Ristic M. Bovine babesiosis. Vaccination against tick-borne challenge exposure with culture-derived *Babesia bovis* immunogens. Am. J. Vet. Res. 1979; 40:1678.
4. Cantó G J, Vega C A, Smith R D. Ensayos de vacunación contra *Babesia bovis* utilizando antígenos procedentes de cultivo *in vitro*. Tec. Pecu. Mex. 1988; 43:43.
5. Timms P, Stewart N P, Barry D N, Dalglish R J. Non living *Babesia bovis* vaccines from culture. How good are they? 2nd. International Conference Malaria and Babesiosis. Annecy France. 1983; 28.
6. 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.
7. Bock R E, de Vos A J, Kingston T G, Shields I A, Dalglish R J. Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. Vet. Parasitol. 1992; 43:45.
8. Erp E E, Smith R D, Ristic M, Osorno B M. Continuous cultivation *in vitro* of *Babesia bovis* Am. J. Vet. Res. 1980; 41:1141.
9. Levy M, Ristic M. *Babesia bovis* continuous cultivation in microaerophilus stationary phase culture. Science 1980; 207:1218.
10. Rodríguez S D, Buening G M, Green T J, Carson C A. Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. Inf. Immun. 1983; 42:15.
11. Palmer D A, Buening G M, Carson C A. Cryopreservation of *Babesia bovis* for *in vitro* cultivation. Parasitology 1982, 84:567.
12. Rodríguez S D, Buening G M, Carson C A. Caracterización bioquímica preliminar de clonas de *Babesia bovis* irradiadas con Co^{60} . Tec. Pecu. Mex. 1993; 31(1):16.
13. Jain N C. SCHALM's VETERINARY HEMATOLOGY 4th. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986:41.
14. Ponce L I. Determinación de la probabilidad diaria de infección de *Babesia spp* de un hato de bovinos en el C.E.P. de Tizimin, Yucatán. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1979:47
15. Wales A, Kusel JR. Biochemistry of irradiated parasite vaccines: Suggested models for their mode of action. Parasitology Today 1992; 8:358.
16. Buening G M, Kuttler K L, Rodríguez S D. Evaluation of a cloned *Babesia bovis* organism as a live immunogen. Vet Parasitol. 1986; 22:235.
17. Yunker C E, Kuttler K L, Johnston L W. Attenuation of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. Vet. Parasitol. 1987; 24:7.
18. Pérez M M E. Determinación de una dosis premunizante contra *Babesia bovis* en bovinos. 1992. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro.
19. Sálas-Téllez E, García-García J, Ramos-Aragón J A, Rodríguez del Rosal E, Aboytes-Torres R, Buening G M, Vega y M C A. Patogenia de una clona irradiada de *Babesia bovis* obtenida de cultivo *in vitro*. Tec. Pecu. Mex. 1988; 26:36.
20. Mahoney D F, Kerr J D, Goodger B V, Wright I G. The immune response of cattle to *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). Studies on the nature and specificity of protection. Int. J. Parasitol. 1979; 9:297.
21. Goodger B V, Wright I G, Waltisbuhl D J, Mirre G B. *Babesia bovis*: Successful vaccination against homologous challenge in splenectomized calves using a fraction of haemoagglutinating antigen. Int. J. Parasitol. 1985; 15:175.
22. Goodger B V, Commins M A, Wright I G, Waltisbuhl D J, Mirre G B. Successful homologous vaccination against *Babesia bovis* using a Heparin-binding fraction of infected erythrocytes. Int. J. Parasitol. 1987; 17:935.
23. Mahoney D F, Wright I G. *Babesia argentina*: Immunization of cattle with a killed antigen against infection with a heterologous strain. 1976; Vet. Parasitol. 2:273.
24. Dimmock C K. Blood group antibody production in cattle by a vaccine against *Babesia argentina*. Res. Vet. Sci. 1973; 15:305.