



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"CAPACIDAD PROTECTORA DE DIFERENTES DOSIS
DE INMUNOGENO CONGELADO MIXTO DE
Babesia bovis Y *Babesia bigemina*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A
ANDREA MARGARITA OLVERA RAMÍREZ

ASESORES
MVZ MSc PhD GERMINAL JORGE CANTÓ ALARCÓN
MVZ MSc PhD JULIO VICENTE FIGUEROA MILLÁN

Santiago de Querétaro, 1998

VET

No. ADQ.

01816

CLASIFI.

T 636.2089

042 c

BIBLIOTECA
ING. BERNARDO
QUINTANA ROO



INVESTIGACION Y
POSGRADO



A DIOS por darme la oportunidad de vivir

A MIS PADRES Y HERMANO por brindarme su amor, apoyo y confianza para lograr cada una de mis metas.

AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORES

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón porque con su apoyo, paciencia y conocimientos contribuyó en mi formación personal y profesional.

Dr. Julio Vicente Figueroa Millán por su apoyo y confianza en este trabajo de tesis.

A MIS AMIGOS por enseñarme el valor de la amistad, especialmente a Noritza Santos por el solo hecho de ser mi amiga.

A MIS TIOS Y PRIMOS por su cariño y comprensión.

AL COMITÉ ESTATAL DE FOMENTO Y PROTECCIÓN PECUARIA DEL ESTADO DE QUERÉTARO, por las facilidades brindadas para el desarrollo de este trabajo, especialmente por su ayuda incondicional al Director MYZ Juan Manuel Romo Romero y el administrador C. Gustavo A. Fernandez Narvaez (QDEP).

AL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES Y AGROPECUARIAS en especial al CENID-PAVET por las facilidades brindadas para el desarrollo de este trabajo.

A LA UNIVERSIDAD, A MIS MAESTROS Y COMPAÑEROS DE GENERACIÓN (92-97).

Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS que de alguna manera directa o indirectamente me apoyaron en la preparación y desarrollo de mi vida profesional.

A TODOS MIL GRACIAS

RESUMEN

Con el objeto de determinar la dosis óptima de un inmunógeno congelado mixto de cepas de *Babesia bovis* (BOR) y *Babesia bigemina* (BIS) derivadas de cultivo *in vitro*, la cual confiera una sólida protección contra la babesiosis bovina, se inocularon 24 novillos procedentes de una zona libre de garrapata común en el ganado. Se utilizaron cuatro animales por grupo los cuales recibieron el inoculo mixto de origen congelado en dosis de 1×10^7 (Grupo 1), 5×10^7 (Grupo 2), 1×10^8 (Grupo 3) y 5×10^8 (Grupo 4) eritrocitos infectados (Ei) de cada uno de los parásitos antes mencionados. Un quinto grupo de animales (Grupo 5) recibió 1×10^7 Ei con *B. bovis* y *B. bigemina* como inoculo mixto de origen fresco. Además un grupo testigo (Grupo 6) se inoculó con glóbulos rojos no infectados. Cuatro meses después de la inmunización los animales fueron trasladados a una zona endémica de babesiosis, para ser confrontados naturalmente mediante la exposición a la garrapata vector *Boophilus microplus*. La confrontación se realizó mediante la introducción del ganado a potreros infestados con garrapatas durante 39 días sin tratamiento garrapaticida alguno. A partir del día 6 pos introducción al potrero se llevó a cabo un monitoreo de los animales el cual incluyó: observación de manifestaciones clínicas de la enfermedad, medición de la temperatura rectal, determinación del valor del hematocrito y observación de la parasitemia. Se observó que todos los animales se infectaron con las especies de *Babesia* y que ninguno de los animales pertenecientes al Grupo 1, 2, 3, 5 y 2 animales del grupo 4, enfermaron de babesiosis clínica aguda de tal forma que fuera necesario el tratamiento específico. De los seis animales que enfermaron de babesiosis aguda (4 testigos y 2 del grupo 4) murieron. Se comprobó que la mayoría de las dosis de inmunógeno mixto congelado y fresco confieren una sólida protección (100%). Sin embargo evaluando los parámetros tales como promedio del máximo decremento en hematocrito (29.5%), promedio de los días con parasitemia (3 *B. bovis*; 8.5 *B. bigemina*) y promedio de días con temperatura mayor a 39.5°C (2), la dosis con 1×10^8 Ei de inmunógeno congelado mixto proporcionó, al grupo inoculado una protección más efectiva contra *Babesia* spp.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	
	A. DEFINICIÓN	4
	B. TAXONOMÍA	4
	C. EPIDEMIOLOGÍA	5
	D. CICLO BIOLÓGICO	10
	E. SIGNOS	13
	F. PATOGENIA	14
	G. LESIONES MACROSCÓPICAS	16
	H. LESIONES MICROSCÓPICAS	17
	I. DIAGNÓSTICO	18
	J. PREVENCIÓN Y CONTROL	20
III.	OBJETIVOS	27
IV.	HIPÓTESIS	27
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	
	A. LOCALIZACIÓN	28
	B. MATERIAL BIOLÓGICO	28
	C. DISEÑO EXPERIMENTAL	29
	D. SEGUIMIENTO CLÍNICO DE LOS ANIMALES	30
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
	A. VACUNACIÓN	32
	VOLUMEN CORPUSCULAR AGLOMERADO	33
	TEMPERATURA	35
	PARASITEMIA	35
	B. CONFRONTACIÓN	36
	VOLUMEN CORPUSCULAR AGLOMERADO	37
	TEMPERATURA	39
	PARASITEMIA	40
	TÍTULOS DE ANTICUERPOS	40
VII.	CONCLUSIONES	43
VII.	BIBLIOGRAFÍA	55
VIII.	APÉNDICES	61

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Prevalencia de la babesiasis determinadas en la Republica Mexicana. _____	10
Cuadro 2. Pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de babesiosis bovina. _____	19
Cuadro 3. Resumen de la fase de vacunación. _____	36
Cuadro 4. Parasitemias durante la etapa de confrontación _____	42
Figura 1. Transmisión de <i>Babesia</i> spp. _____	6
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Babesia</i> spp. _____	11

I. INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades que limita en mayor grado a la producción animal es la babesiosis bovina (Kuttler, 1986), enfermedad hemoparasitaria causada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia* y transmitidos por ácaros hematófagos de un solo hospedador. La distribución de esta enfermedad es muy extensa y corresponde a la de su vector, garrapatas del género *Boophilus* (Ristic, 1981). Los países más afectados se encuentran localizados entre las latitudes 35° Sur y 40° Norte del Ecuador, que incluye a la mayoría de los países de la franja tropical y subtropical del mundo (McCoeker, 1981; Álvarez y Cantó, 1985).

Desde las primeras descripciones de la enfermedad causada por *B. bovis* (Babes, 1888) y *B. bigemina* (Smith y Kilbourne, 1893), se reconoció el impacto económico de esta enfermedad debido a que puede tener una morbilidad superior al 80% y una mortalidad hasta el 50%, si no se aplican las medidas terapéuticas oportunamente; provocando bajas de producción y pérdidas ocasionadas por mortalidad. Se ha descrito que la babesiosis junto con la anaplasmosis llegan a inducir pérdidas estimadas en 7 mil millones de dólares anualmente en todo el mundo (Uilenberg, 1994). En América Latina estas dos especies causan pérdidas por 875 millones de dólares anuales (Smith, 1984).

La creciente necesidad de mejorar e incrementar la producción de proteína de origen animal en países tropicales ha estimulado la introducción de ganado de razas europeas para reemplazar el ganado criollo. En México, se ha estimado que en el trópico

se produce el 50% del total de la leche del país, no obstante que predominan las cruces indefinidas de ganado cebú con criollo, suizo pardo y en menor cantidad holandés. De la misma forma, miles de cabezas de ganado han sido transportadas a estas áreas y la muerte por babesiosis ha sido causa común de pérdidas de animales recientemente introducidos. Algunos países incluyendo México, han impuesto medidas de control basadas en la erradicación y estricto control del vector a un costo muy elevado (Barnett, 1974). En nuestro país, las pérdidas estimadas en 1975 debido a garrapatas y las enfermedades transmitidas por ellas fueron de 3,587 millones de pesos, de los cuales solo el 6.3% se debió a la muerte mientras que el 83.6% y el 1.6% se atribuyeron a la pérdida en producción de carne, leche y pieles respectivamente (Beltran, 1975; citado por McCosker, 1981). En 1980 las pérdidas ocasionadas solamente por babesiosis, se estimaron en 2,715 millones de pesos (Delegación mexicana, FAO, 1981).

La existencia de poblaciones residuales y las variaciones estacionales en las poblaciones de garrapata también ponen en peligro a los hatos de ganado adulto libre de la enfermedad y por lo tanto susceptible. Además, las pérdidas incurridas en los brotes debido al incremento de la población de garrapatas son generalmente en exceso de las observadas en zonas donde no se ejerce un control, ya que las garrapatas inmunizan en forma natural al ganado desde una temprana edad (Barnett, 1974). Se ha informado también que en México las tasas de infección por babesiosis varían desde un 4% en zonas consideradas libres hasta un 96% en zonas donde no existe control alguno (Álvarez y Cantó, 1985).

Por otra parte, hasta ahora no se ha podido controlar y menos aún erradicar la garrapata vector de la babesiosis. La ausencia de información sobre la distribución de la enfermedad en general y por especie, el desconocimiento de los factores epidemiológicos asociados a la ocurrencia de brotes, el escaso conocimiento en detalle de los mecanismos de acción del sistema inmune de los bovinos en presencia de babesiosis y las interacciones que permiten a los animales obtener un grado de resistencia sólida y duradera contra la misma, hacen necesaria la planeación, producción y distribución de una vacuna para ayudar a controlar esta enfermedad en México.

Este trabajo propone estudiar la utilización de organismos modificados como agentes premunizantes.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. DEFINICIÓN.

La babesiosis es una enfermedad parasitaria ocasionada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia*, transmitidos por garrapatas del género *Boophilus* spp. que se caracteriza por fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria y muerte (McCoeker, 1981).

B. TAXONOMIA.

De acuerdo a la sociedad de protozoologistas y el comité sobre sistemas y evaluación (Levine *et al*, 1980; Levine, 1982) *Babesia* se clasifica de la siguiente forma:

Reino: Animalia

Subreino: Protozoa

Phylum II: Apicomplexa

Clase 2: Sporozoa

Subclase 3: Piroplasmia

Orden: Piroplasmida

Familia: Babesiidae

Género: *Babesia*

Se han descrito más de 70 especies de *Babesia*, de las cuales se considera que solo 18 causan la enfermedad en diferentes mamíferos domésticos y solo se conocen los

vectores de 15 de ellos (Levine, 1982). En las regiones tropicales y subtropicales se reconocen cuatro especies *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. major* y *B. divergens* (FAO, 1978), de las cuales las dos primeras se destacan por su gran distribución geográfica, por compartir los mismos vectores biológicos: garrapatas de la familia Ixodidae y por su marcada patogenicidad (Rietic, 1981).

C. EPIDEMIOLOGIA.

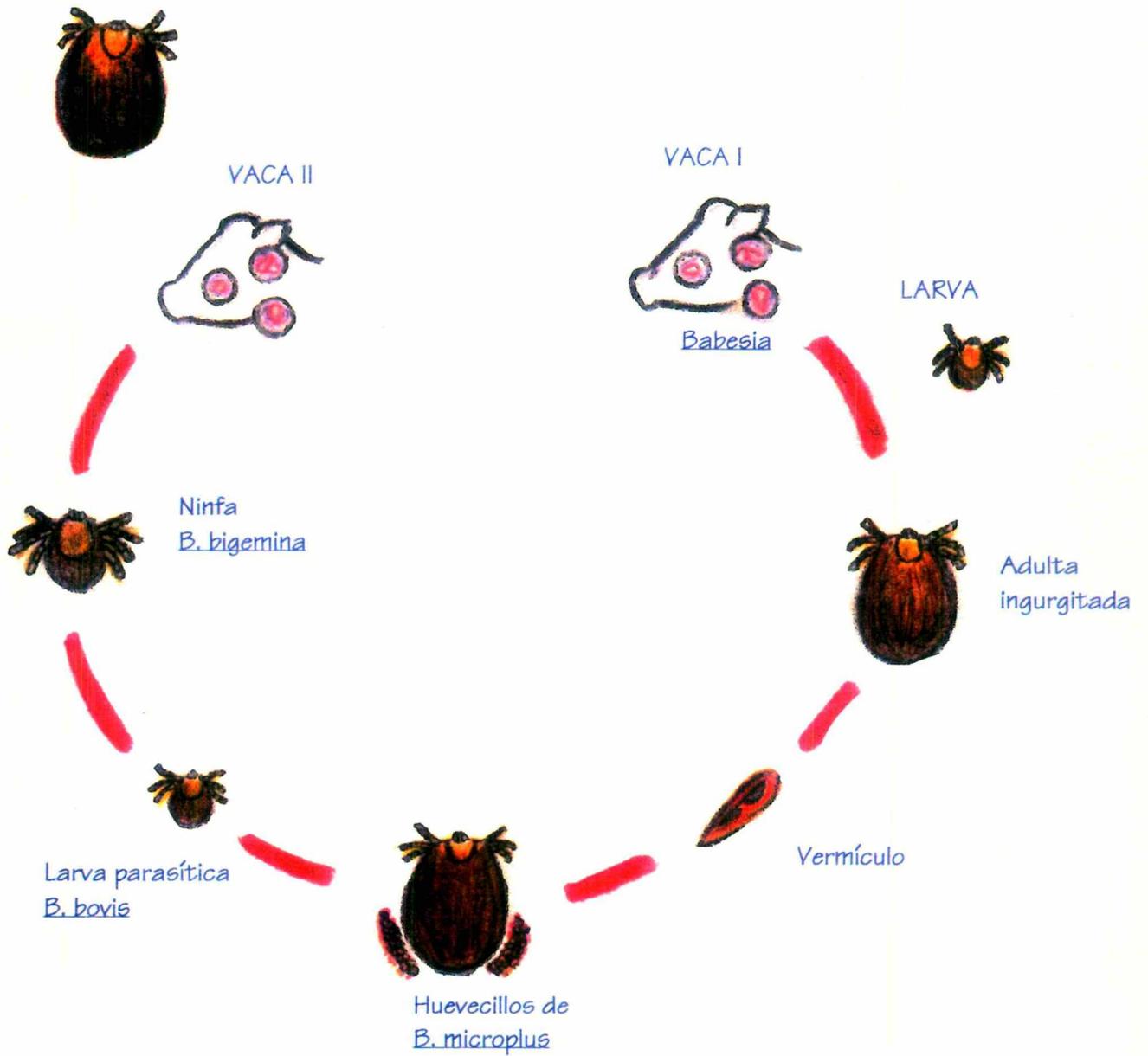
La transmisión de *Babesia* es un proceso complejo formado por tres elementos: vector, parásito y huésped; pero hay una serie de factores que pueden modificar la transmisión entre los que incluyen infección del vector, temperatura ambiental, entre otros.

1. Infección del vector.

La infección del ácaro hematófago del género *Boophilus* spp. con *Babesia* es muy compleja pues se inicia desde que el ácaro ingiere sangre del hospedero infectado con *Babesia* en el patrón de transmisión (Fig. 1), incluyendo el hecho de que *Babesia bovis* se transmite únicamente por larvas y *Babesia bigemina* por ninfas y adultas (Mahoney y Mirre, 1979; Potgieter y Els, 1977). Las larvas pierden la infección por *B. bovis* luego de haber ocurrido la transmisión impidiendo la infección vertical (Callow, 1985).

En ocasiones las especies de *Babesia* pueden ser patógenas para las garrapatas altamente susceptibles aunque tengan un grado bajo de parasitemia.

FIGURA 1. TRANSMISION DE *Babesia* spp.



(Álvarez y Cantó, 1985)

Infecciones superiores al 1% pueden causar altas tasas de mortalidad en hembras y huevos (Friedhoff y Smith, 1981).

II. Factores físicos.

a. Temperatura. La ovoposición a temperaturas de 30-37°C induce el desarrollo de estadios infectivos de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en los huevos de garrapatas *Boophilus* (Dalglish y Stewart, 1978).

b. Humedad relativa. Es el factor más importante para el desarrollo de la garrapata con un nivel óptimo del 80% de humedad (Álvarez y Cantó, 1985).

c. Edad de las garrapatas. Larvas de *Boophilus* sometidas a 14°C y 95% de humedad relativa han sido capaces de mantener viable a *B. bovis* durante 65 días, además de que las larvas pueden sobrevivir en estas condiciones hasta 200 días (Dalglish y Stewart, 1978).

III. Factores del hospedero.

La infección puede verse afectada por diferentes factores inespecíficos del hospedero entre los que se encuentran los genéticos, la edad y la inmunidad.

a. Genética. Se ha demostrado que el ganado *Bos indicus* es más resistente a la babesiosis que el ganado europeo *Bos taurus* (Johnston et al, 1978).

b. Edad. Se ha observado que los becerros resisten más a la enfermedad clínica por la ingestión de anticuerpos calostrales de hembras inmunes. Por esto mismo, los becerros menores de dos meses quedan protegidos de la enfermedad

pero no de la infección (Álvarez y Cantó, 1985). Así mismo, se ha reportado mayor proporción de brotes en animales de 10-24 meses de edad que los menores de 9 meses (Rogers, 1971).

c. Inmunidad. Se adquiere en forma activa por la exposición del huésped al parásito vivo o bien por productos de los mismos. La respuesta inmune del hospedero controla la parasitemia destruyendo parásitos, eritrocitos y deteniendo tanto el crecimiento como la multiplicación de *Babesia* (Phillips, 1971; Mahoney y Ross, 1972). Los animales que sobreviven a la fase aguda de la infección quedan inmunes a la reinfección de la cepa homóloga (Callow, 1985). De los parásitos existentes en la sangre del ganado infectado, solo continuarán su desarrollo los ingeridos durante las últimas 24 horas de vida parasitaria de las garrapatas (Callow y Hoyte, 1961). El número de parásitos ingeridos depende de la proporción de garrapatas que se alimentan sobre los bovinos; se estima que una pequeña proporción de larvas (1 de cada 2500) está infectada, esto a nivel campo (Smith, 1980).

Los animales que se recuperan de la enfermedad quedan como portadores sanos por un periodo variable de tiempo y sirven como focos de infección para los animales sanos (Álvarez y Cantó, 1985); además, la enfermedad esta asociada con las fluctuaciones estacionales en el número de garrapatas (Rogers, 1971), el cual aumenta después del final de la temporada de lluvias (Álvarez y Cantó, 1985). En general la presentación de brotes es por dos condiciones:

1. Exposición de ganado susceptible a la enfermedad, que ocurre al introducir o cambiar ganado infestado a zonas libres lo que ocasiona que las garrapatas se distribuyan en lugares en que normalmente no se encuentran o en caso contrario se introducen animales susceptibles a explotaciones infestadas (Álvarez y Cantó, 1985).

2. Inestabilidad enzoótica, se refiere a la presencia de una proporción de animales de un hato que no se infectan con *Babesia* sino hasta un tiempo después del nacimiento; no obstante, debe existir exposición a garrapatas. De esta forma, las regiones en las que se observa la babesiosis se clasifican como zonas endémicas y marginales. Las zonas endémicas poseen una población de garrapatas más o menos estable, suficiente para asegurar la exposición de los becerros a *Babesia* spp. En los primeros nueve meses de vida, lo que provoca un estado de premunición por la presencia de parásitos. Las zonas marginales, presentan variaciones poblacionales durante el año lo que conduce a que muchos animales se escapen a la infección en la primera etapa de vida para posteriormente infectarse y sufrir severamente la enfermedad (Mahoney y Ross, 1972; Rogers, 1971). Por otro lado, en forma natural y en zonas marginales puede existir una población reducida de garrapatas, lo que provocaría la infección en unos cuantos becerros menores de 9 meses y el ganado mayor sería más susceptible pero solo una escasa proporción de adultos enfermarán por que la transmisión es demasiado baja (Álvarez y Cantó, 1985). Por último, se ha observado que existe

variación en la prevalencia e incidencia de la babesiosis en México, de acuerdo a la región geográfica como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. PREVALENCIA DE LA BABESIASIS EN DIFERENTES PARTES DE LA REPUBLICA MEXICANA.

% INFECCIÓN	LOCALIZACIÓN	REFERENCIA
69.23	Tizimín, Yuc.	(Ponce, 1979).
29.00	Acapulco, Gro.	(Vega <i>et al.</i> , 1979).
37.00	Hueytamalco, Pue.	(Estrada <i>et al.</i> , 1980).
59.90	Hueytamalco, Pue.	(Ortega, 1982).
65.46	Playa Vicente, Ver.	(López, Fajardo y Cantó, 1983).
77.00	Zona central, Edo. Gro.	(Fragoso y Millan, 1983).
91.30	Santiago Ixcuintla, Nay.	(López <i>et al.</i> , 1983).
77.66	Huixtla, Chis.	(López, Cantó y Fernández, 1983).
4.54	Aldama, Tamps.	(López <i>et al.</i> , 1984).
11.08	Villa Comaltitlán, Chis.	(Fernández, Aboytes, Cantó, 1984).
87.88	Mtz. de la Torre, Ver.	(Ramírez, López y Soffer, 1984).
82.05	Veha de Alatorre.	(Ramírez, López y Soffer, 1984).
71.88	Tlapacoyan, Ver.	(Ramírez, López y Soffer, 1984).
77.97	Atzalán, Ver.	(Ramírez, López y Soffer, 1984).
96.15	San José Acateno, Pue.	(Escobar, 1984).
89.40	Jalapa, Tab.	(Orozco <i>et al.</i> , 1985).
86.80	Tacotalpa, Tab.	(Orozco <i>et al.</i> , 1985).
65.60	Cuetzalan, Pue	(Torres, <i>et al.</i> , 1985).
82.00	Paso del Toro, Ver.	(Palma, Álvarez y Rodríguez, 1985).

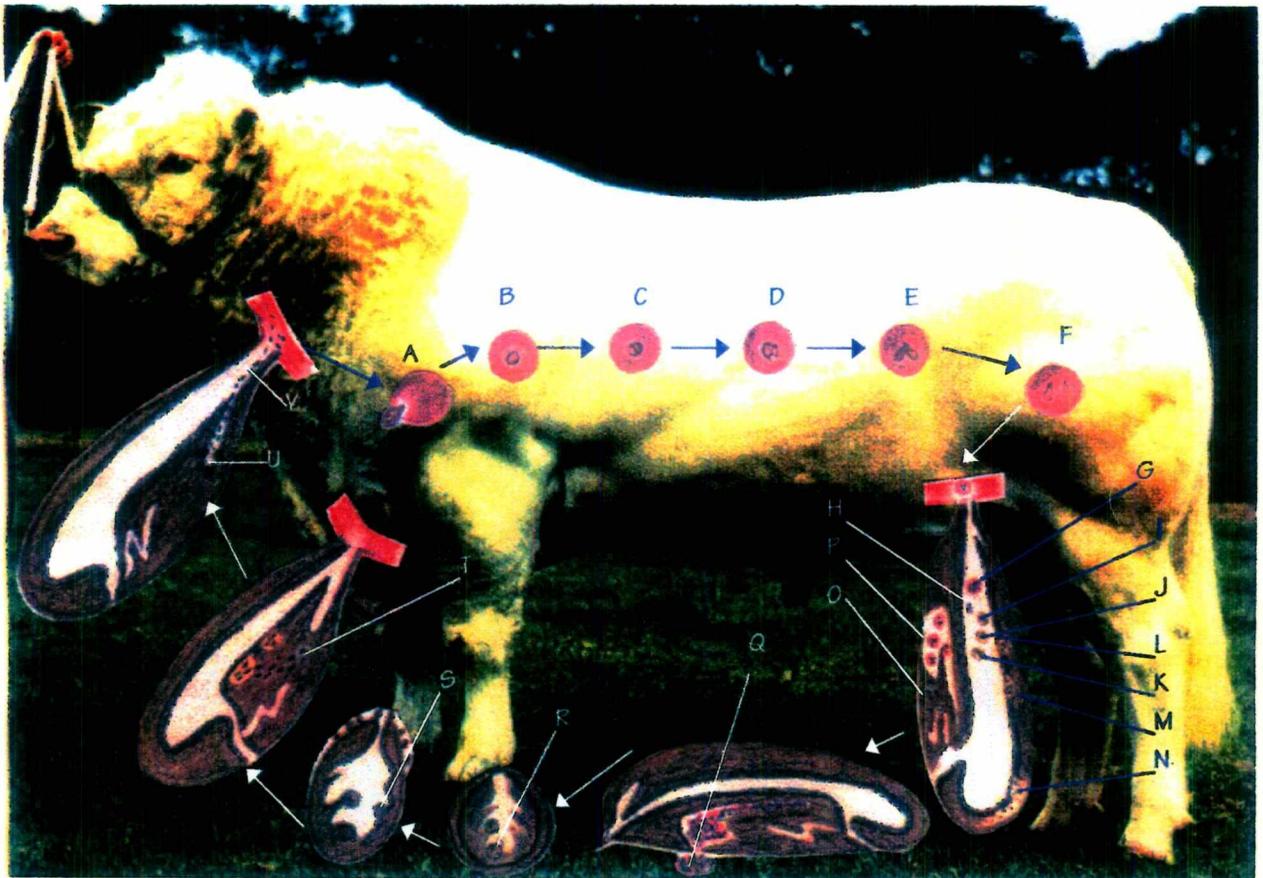
(Álvarez y Cantó, 1985).

D. CICLO BIOLÓGICO.

El ciclo puede resumirse en cuatro etapas (fig. 2):

- 1) Fisión binaria en los eritocitos. La forma infecciosa de *Babesia* spp. es inoculada al huésped por la garrapata al momento de alimentarse, penetrando al glóbulo rojo en forma de merozoito por un proceso activo (Jack y Ward, 1981). Posteriormente, se forma una vacuola parasitófora la que se diferencia para formar el estado en alimentación (trofozoito), este se divide por fisión binaria longitudinal formando merozoitos (formas de pera) que abandonan la célula para invadir otra. Esta división

FIGURA 2. CICLO BIOLÓGICO DE *Babesia* spp.



Esquema de ciclo evolutivo de *Babesia*. A. *Babesia bigemina* penetrando en eritrocito; B. Forma de anillo; C. Forma amiboide; D. Trofozoito en fisión binaria; E. Dos trofozoitos; F. Liberación de trofozoitos e inicio de otro ciclo en huésped vertebrado; G. Eritrocito con trofozoito en intestino de garrapata adulta; H. Trofozoito liberado; I. Primera forma esferoide; J. Segunda forma esferoide; K. Tercera forma cilindroide; L. Inicio de desarrollo en epitelio intestinal; M. Formación de vermículos; N. Vermículos en hemocele; O. Generación de vermículos en células de tubos de Malpighio y liberación de vermículos en hemocele; P. Desarrollo de vermículos en huevos; Q. Garrapata adulta poniendo huevos infectados; R. Vermículos en células intestinales de embrión; S. Vermículos en células intestinales de larva de garrapata en ayuno; T. Vermículos en hemocele de larva vía glándulas salivales; U. Vermículos en glándulas salivales de ninfa; V. Liberación de vermículos en el lumen de glándulas salivales.

asexual continua hasta que el huésped muere, se elimina el parásito o es ingerido por otra garrapata (Rudzínska, 1981).

2) Fisión múltiple en el epitelio intestinal y túbulos de Malpighio. La garrapata adquiere la infección cuando ingiere la sangre infectada en las últimas horas antes de desprenderse (Smith, 1978). Los eritrocitos son destruidos y los parásitos se liberan en el lumen intestinal del artrópodo (Smith, 1978), muere una gran proporción y solo un porcentaje de las formas sanguíneas sobrevive la digestión, estas forman un cuerpo de fisión que liberan 200 formas conocidas como quinetos o vermículos en el lumen intestinal (Friedhoff y Smith, 1981). Estos atraviesan el intestino, emigran a la hemolinfa de la garrapata, llegan a las células de los túbulos de Malpighio y se redondean (Smith, 1978).

3) Fisión múltiple en ovarios e invasión de huevos. Pasan a los ovarios donde se dividen e invaden los huevos antes de que sean cubiertos por quitina y permanecen en el vitelo (Smith, 1978).

4) Fisión múltiple en intestino y glándulas salivales de larva o linfa. Posterior a la ovoposición y durante el desarrollo del embrión dentro del huevo los quinetos invaden las células del intestino donde se forma otro cuerpo de fisión y liberación de otra generación de quinetos (Riek, 1964). Estos alcanzan por medio de la hemolinfa las células de las glándulas salivales en donde ocurre otra fase de fisión múltiple con la liberación de miles de cuerpos anulares que se transforman en peras las cuales son formas infectantes de *Babesia* que inoculan las larvas en el caso de *B. bovis*

(Friedhoff y Smith, 1981) o las ninfas y adultos en el caso de *B. bigemina* al bovino (Potgieter y Els, 1977).

E. SIGNOS.

Babesia bigemina y *Babesia bovis* producen manifestaciones clínicas casi idénticas que se observan después de un período de incubación de 8-14 días (Kuttler, 1986). Se caracteriza por aumento de temperatura hasta 41°C, esta fiebre permanece durante 3-5 días siendo acompañada por anorexia, depresión, debilidad, atonía ruminal, constipación, aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, agalactia y en animales gestantes puede causar aborto (Osorno, 1978).

En infecciones de *Babesia bigemina* debido a una hemólisis muy marcada, la sangre se observa más fluida y oscura (Morel, 1989). Posteriormente hay ictericia que esta correlacionada con la parasitemia que puede ser hasta del 20%, la orina adquiere un color pardo o rojo oscuro y produce espuma muy estable (Callow, 1984). La bilirrubina produce ciertas lesiones orgánicas provocando neumonía por irritación del parénquima pulmonar (Morel, 1989).

En *Babesia bovis* la hemólisis, la ictericia y la hemoglobinuria casi no se presentan (Kuttler, 1986). Hay desordenes de equilibrio, encefalitis, rechinado de dientes y agresión evidente (Kuttler, 1986; Morel, 1989).

F. PATOGENIA.

A la penetración y multiplicación de *B. bigemina* se detectan parasitemias ascendentes que ejercen acción traumática al liberarse del eritrocito y decremento de la concentración de hemoglobina por acción expoliatriz al alimentarse de esta, ocasionando anemia hemolítica normocítica que se convierte posteriormente en anemia hemolítica macrocítica (Wright, 1972; Quiroz, 1994). Se ha sugerido que la presentación de anemia no solo se asocia a la hemólisis por salida del parásito. Mahoney (1977), informó que los glóbulos rojos no infectados pueden ser eliminados o fagocitados probablemente debido a la adsorción de antígenos de *Babesia* en su membrana, los cuales son reconocidos como cuerpos extraños. Por otro lado Jennings (1981), encontró que el parásito altera las características de la membrana, lo que provoca la formación de anticuerpos que actúan como opsoninas que fijan el complemento aumentando la fagocitosis; además los eritrocitos alteran su permeabilidad provocando una mayor fragilidad osmótica que los predispone a una lisis espontánea principalmente en los capilares sanguíneos (Wright, 1973). Como consecuencia de la hemólisis, se produce la anemia que ocasiona anoxia generalizada provocando así daño en los tejidos; hay degeneración y aumento de las células endoteliales las cuales impiden el flujo de sangre complicando aun más la anoxia de un órgano. El endotelio dañado aunado a la hipoproteínemia, resultado de la disfunción hepática, permiten la salida de líquidos manifestado como edema (Osorno, 1978). Junto con el hígado, los riñones son los más afectados (Hernández, 1990). Los problemas de coagulación ocurren solamente en una infección aguda por *B. bigemina*, cuando existen

altas parasitemias que provocan hemólisis intravascular a gran escala (Schalm *et al.*, 1975).

Por otro lado, en la infección por *B. bovis* lo que generalmente ocurre es una alta liberación de sustancias farmacológicamente activas que provocan vasodilatación, estasis sanguínea y choque, además de una coagulación intravascular diseminada y trombosis pulmonar mortal (Wright, 1973; Callow, 1984). *B. bovis* produce una enzima que activa la presencia de calicreína en células de varios órganos, especialmente en el estroma de las células rojas. Las cininas producidas tienen efectos vasodilatadores e hipotensivos que incrementa la permeabilidad vascular. Estos fenómenos ocurren tempranamente y preceden a la aparición de la parasitemia. Los efectos producidos son completamente de choque, estasis sanguínea y ocasionan caída del volumen sanguíneo incluso antes de la hemólisis. La actividad de las cininas simultáneamente con otros productos porfirínicos degradados induce a lesiones de corazón y riñones (Wright, 1973). Los antígenos de *Babesia* forman complejos con el fibrinógeno e inducen aglutinación y adherencia de las células rojas sanguíneas parasitadas a la pared vascular incrementando así la acumulación de eritrocitos. El flujo sanguíneo es obstruido y hay distensión capilar principalmente en riñones y en la corteza cerebral (Wright, 1972; Morel, 1989). La coagulación diseminada se complica con trombosis pulmonar con formación de trombos en riñones e hígado (Morel, 1989).

G. LESIONES MACROSCÓPICAS.

Los tejidos se encuentran congestionados, pero si la enfermedad se prolonga estos se observan pálidos. La ictericia esta a menudo presente pero no es tan obvia si la congestión es intensa (Callow, 1984; Morel, 1989). Comúnmente hay presencia de hemorragias subserosas, particularmente en el corazón y los intestinos. La sangre usualmente fluye aún cuando los vasos están dañados (Callow, 1984). La mucosa del abomaso presenta inflamación catarral con pequeñas hemorragias y erosiones en la región pilórica (Quiroz, 1994). La vejiga frecuentemente contiene orina de color vino y su mucosa se observa con petequias (Ristic 1981; Callow, 1984). Los riñones presentan varios grados de congestión y la grasa perirenal esta edematosa e icterica; el bazo en casos crónicos esta aumentado de tamaño y en casos agudos se encuentra congestionado (Ristic, 1981). El hígado aparece congestionado y friable con el parénquima icterico y la vesícula biliar agrandada, la bilis esta espesa y con coágulos dando al hígado una coloración moteada. (Ristic 1981; Callow, 1984). El corazón y los pulmones usualmente están normales, excepto por la variable presencia de hemorragias y manifestación ocasional de edema. Los pulmones afectados por consiguiente contienen una copiosa cantidad de exudado sanguinolento (Callow, 1984). El encéfalo aparentemente esta normal, pero cuando hay infecciones de *B. bovis* la materia gris de la superficie esta distintivamente rosada. Esto puede traer la presentación de signos nerviosos cuando el encéfalo contiene fluido en exceso y está más blando de lo normal (Morel, 1989). Wright y col. (1981), reportaron marasmo (emaciación y debilidad

progresiva) en la musculatura intercostal y de los miembros posteriores, además de que observaron que la médula ósea se encuentra rojiza.

H. LESIONES MICROSCÓPICAS.

La mayoría de los cambios son observados en hígado, con necrosis centrilobular en zona media, y distensión de los canálculos biliares. En otros tejidos linfáticos (bazo, ganglios) hay menos linfocitos de lo normal, simultáneamente hay abundancia de macrófagos, muchos de los cuales contienen hemosiderina (Callow, 1984). En casos severos los riñones están afectados con degeneración tubular y depósito de hemosiderina a lo largo de todas las nefronas. Quizá se encuentre derramado y presente material hialino y de incorporación granular de la hemoglobina. En las infecciones de *B. bovis*, los vasos más pequeños son llenados con eritrocitos parasitados; en el encéfalo los eritrocitos infectados taponan los capilares, ocasionando algunas veces edema intersticial (Callow, 1963).

En pulmón los capilares están congestionados y contienen gran cantidad de linfocitos, neutrófilos y macrófagos. El corazón presenta subendocarditis, subepicarditis y hemorragias miocárdicas, los grandes vasos presentan baja parasitemia, mientras que en los capilares periféricos sucede lo contrario (Quiroz, 1994). Cuando el edema pulmonar ocurre, el depósito de fibrina y la trombosis son encontrados en este y en otros tejidos (Morel, 1989). Wright y col. (1981), encontraron muy extensa la degeneración del músculo esquelético de los miembros posteriores, con edema perivascular en casos agudos de infección con *B. bovis*. Los cambios en los tejidos son menos pronunciados en las

infecciones por *B. bigemina* que en las de *B. bovis*, pero en infecciones por *B. bigemina* son relativamente más evidentes los parásitos en los vasos sanguíneos pequeños (Callow, 1984).

I. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico puede efectuarse de manera directa o indirecta y puede ser del tipo de diagnóstico clínico-patológico individualizado o de tipo epidemiológico considerando grupo o grupos de animales (Álvarez y Cantó, 1991).

Una de las formas directas de diagnóstico es la observación del parásito mediante la elaboración y exámen microscópico de frotis teñidos con colorante Romanowsky. Puede hacerse de los venas auriculares o caudales; su uso está limitado a la fase aguda de la enfermedad, debido a que las parasitemias muy pocas veces rebasa el 1% de eritrocitos parasitados (Álvarez y Cantó, 1991). El frotis es confiable pero requiere de una revisión meticulosa y se ha considerado su utilidad en el reconocimiento del ganado portador de *Babesia* spp. (Callow, 1963). Conjuntamente con la observación del parásito es recomendable el uso de pruebas auxiliares como la determinación del paquete celular aglomerado (Schalm, 1975). Otra forma directa de diagnóstico es por *im pronta* de cerebro, riñón, etc., que son importantes en infecciones por *B. bovis* por su difícil identificación en frotis por las bajas parasitemias (Shaetri, 1986). A diferencia del frotis en la *im pronta* se observan los capilares con el 90% de eritrocitos parasitados (Ristic, 1981). Otro tipo de pruebas directas son las sondas de ADN y reacción en cadena a la polimerasa (PCR) (Álvarez y Cantó, 1991).

El curso clínico de la babesiosis también es parte fundamental para el diagnóstico reconociendo que esta supeditado a factores como son: la especie, la cepa de *Babesia* y el grado de susceptibilidad de huésped. Por otro lado existe un grupo de técnicas de tipo indirecto que permiten la detección de anticuerpos específicos circulantes para la identificación de bovinos portadores asintomáticos y reservorios. Estos procedimientos son serológicos y las desventajas de manera global es que tienen inconsistencia en la detección de animales portadores, subjetividad de algunas para su interpretación e incapacidad para diferenciar entre animales portadores y animales con anticuerpos residuales de una infección previamente resuelta (Calder, 1990). En la serología se han utilizado antígenos corpuscular y soluble a partir de animales infectados (Todorovic y Carson, 1981) o bien antígenos derivados de cultivo *in vitro* (Aboytes y Vega, 1985). Las pruebas generadas son muy variadas, todas poseen un fundamento inmunológico pero con su propia interpretación, sensibilidad y especificidad (Ristic, 1981). En el cuadro 2 se muestran las pruebas más utilizadas.

CUADRO 2 PRUEBAS SEROLÓGICAS UTILIZADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Babesia* spp.

PRUEBA	UTILIDAD*
Fijación del complemento (FC)	+++
Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	+++
Aglutinación capilar (AC)	+
Radio inmuno ensayo (RIE)	++
Hemoaglutinación indirecta (HI)	++
Ensayo inmuno-enzimático (ELISA)	+++

*Presenta mayor sensibilidad y especificidad (García, 1991)

Como se observa las pruebas más utilizadas son IFI, FC y ELISA, donde la primera ha sido más utilizada en diferentes estudios en el mundo por lo que esta parcialmente estandarizada, pero, la prueba de ELISA podrá reemplazar a IFI posteriormente cuando aumente su sensibilidad y especificidad (García, 1991).

J. PREVENCIÓN Y CONTROL

La prevención de la piroplasmosis es y ha sido materia de arduo trabajo realizado en muchas partes del mundo. Dichos trabajos han conseguido el lograr diferentes métodos de control e inmunización (Rodríguez, 1991) dentro de los cuales se incluyen:

- Control del vector. Consiste en romper el ciclo de transmisión de la enfermedad utilizando acaricida sobre el hospedador, se utiliza en las regiones tropicales como procedimiento rutinario (Álvarez, 1991).
- Control de la movilización del ganado. Necesaria cuando se desea evitar que el ganado portador o infestado sea introducido a regiones libres (Álvarez, 1991).
- Quimioterapia y quimioprofilaxis. Son armas con utilidad táctica, costosas y poco prácticas como estrategia definitiva (Álvarez, 1991).
- Uso de ganado resistente. Debido a que el ganado *Bos taurus* tiene habilidad para desarrollar inmunidad a la infestación con garrapatas, esto ha conducido a la utilización de cruza *Bos indicus* con *Bos taurus* (Álvarez, 1991).
- Inmunización o vacunación. Este procedimiento ofrece mayores perspectivas para resolver el complejo problema de la babesiosis (Álvarez, 1991). Existen dos principios que han sido aplicados para este procedimiento: 1º El ganado usualmente adquiere una fuerte y larga inmunidad después de recuperarse de la infección. 2º La sangre

tomada del ganado infectado puede ser usada para inmunizar a otros animales (Dalglish *et al*, 1981). A estos principios se les conoce como PREMUNICIÓN o INMUNIDAD INFECCIOSA, método que se desarrolló al principio del siglo en Australia que consiste en la transferencia de sangre de un bovino recuperado o portador a bovinos susceptibles provocando reacciones menos severas en los receptores que en los animales asintomáticos (Callow y Tammemagi, 1967). En 1966 Callow y Mellors afinaron este proceso y estandarizaron el número de parásitos de *B. bovis* en cada dosis 1×10^7 eritrocitos infectados utilizando becerros esplenectomizados en lugar de simples portadores. Con este método produjeron una mayor cantidad de vacuna en un mínimo de volumen de sangre, reduciendo así la fluctuación en el número de parásitos lo que anteriormente se reflejaba en mortalidad de 5% de animales vacunados por la presencia excesiva de parásitos o bien por su ausencia. La desventajas de este tipo de vacuna es que las cepas vacunales pueden revertirse en virulentas cuando son pasadas de animales vacunales a susceptibles, situación bastante común al tratar contra esta u otra enfermedad y se utiliza la misma jeringa o aguja; además de que tienen corta vida (7 días de refrigeración) y es posible la estimulación de eritrolisis neonatal en terneros de vacas vacunadas y por último una posible contaminación con otros patógenos no detectables en frotis como el virus de la Leucosis bovina (Rogers *et al*, 1988).

Posteriormente, se desarrolló una metodología para la atenuación de *B. bovis* mediante pases rápidos seriados de las cepas vacunales en terneros esplenectomizados para inducir una notable disminución de la virulencia en animales

adultos susceptibles (Callow y Mellors, 1966; Callow *et al.* 1979). Estas muestras puras de *B. bovis* atenuadas según la metodología australiana, son usadas en países como Uruguay (Nari *et al.* 1979); Argentina (Guglielmone, 1989); Bolivia (McCoeker, 1981) y Cuba (Alonso *et al.* 1991). La atenuación de *B. bigemina* fue lograda en Australia por Dalgliesh y col. (1981) haciendo pasajes lentos en becerros con bazo *in situ*. En Uruguay, empleando el mismo sistema de atenuación, existe en el Instituto Miguel C. Rubino una muestra atenuada disponible para su uso desde 1981 (Solari, 1983). Los pasajes lentos también fueron usados en Argentina por Bermudez (Aguirre *et al.* 1989) y en Brasil por Keesler y col. (1988). En Colombia se utilizó en conjunto con *B. bovis* y *B. bigemina* en vacunas vivas con aplicación de un antibabesial administrado 8-9 días pos inoculación, no presentándose en los animales vacunados casos clínicos (Todorovic *et al.* 1975). En Sudáfrica, con el método australiano se han usado vacunas contra *B. bovis* y *B. bigemina*, encontrando falta de protección contra cepas de campo (De Vos, 1978).

El cultivo *in vitro* es otra modalidad introducida por Erp y col. (1979) aplicada directamente a la atenuación de parásitos (Yunker *et al.* 1987; Kuttler *et al.* 1988). Otra forma de modificar o inactivar parásitos es someterlos a radiaciones ionizantes con Cobalto 60, haciéndolos no patógenos pero manteniendo su inmunogenicidad (Álvarez, 1991). Los primeros experimentos para atenuar el parásito por irradiación fueron hechos en *B. rodhaini* por Phillippe (1970), evitando el desarrollo de parasitemia en ratones inoculados los parásitos utilizados fueron previamente expuestos a dosis de 40 y 80 Kilorads (Kr), sin embargo la protección alcanzada fue muy pobre. En

contraste, ratas inoculadas con *B. rodhoni* irradiada a 60 Kr sí alcanzaron una buena protección al desafío (Phillips, 1971). Por otro lado, Brookesby y col. (1972), encontraron que 30 a 50 Kr fueron suficientes para inactivar *B. major* pero no se evitó la infección al desafío aunque la severidad del proceso fue menor. Mahoney y col. (1973), trabajaron con *B. bovis* irradiada entre 20-50 Kr observando que ésta conserva la inmunogenicidad. Posteriormente Bishop y Adams (1974), inocularon en bovinos eritrocitos parasitados con *B. bigemina* expuestos a 24 Kr desarrollando parasitemias sin manifestaciones clínicas. Wright y col. (1980) realizaron experimentos con irradiación y conservación de *B. bovis* concluyendo que la mejor dosis es 35 Kr, este dato fue comprobado mediante la inoculación de becerros no esplenectomizados con dosis de 1×10^8 parásitos recientemente irradiados. Al conservar el inmunógeno irradiado en nitrógeno líquido durante diez meses para ulterior inoculación en becerros, verificaron que la mayoría de los animales sufrieron infección moderada. También se comprueba que bovinos vacunados de esta forma son capaces de resistir un desafío de diez a doce meses pos vacunación (Wright *et al*, 1982). Mas aún, estos parásitos pierden la capacidad de ser transmitidos por las garrapatas (Wright *et al*, 1983). En Colombia se atenuaron muestras puras de *B. bigemina* y *B. bovis* con 35 Kr (Vizcaino y Urrego, 1986). Por otro lado Alonso y col. (1991) empleando un aislado cubano de *B. bovis* iniciaron experimentos para atenuar el parásito con 32.6 Kr, la cual recuperó su virulencia después de periodos de conservación en nitrógeno líquido y 4 pasajes para la multiplicación en becerros esplenectomizados. Por lo tanto el uso de vacunas atenuadas puede ser

aprovechado, sin embargo; puede existir transmisión de otros patógenos naturales del bovino.

En nuestro país, se pudo por primera vez en el mundo mantener y reproducir *B. bovis in vitro* (Erp *et al*, 1979). Posteriormente Rodríguez *et al* (1983), lograron su clonación a partir del cultivo de un solo eritrocito infectado, aisándolo por medio de diluciones críticas. Dichas poblaciones, fueron diluidas por segunda y tercera vez para asegurar su pureza. Una de estas clonas con crecimiento más acelerado que el de la cepa original, fue usada como vacuna y comparada con la población original en animales susceptible de un año (Rodríguez, 1985) La clona produjo reacciones clínicas menos severas que las de la cepa original y mostraron una sólida resistencia (Rodríguez *et al*, 1993). Por otro lado, Hernández y col. (1990), evaluaron cuatro diferentes aislados de *B. bigemina* derivadas de cultivo *in vitro* en bovinos susceptibles inoculados con dosis de 1×10^9 donde se identificó a un aislado como posible inmunógeno vivo ya que no alteró la hematología, ni provocó reacciones clínicas en los animales inoculados, a diferencia de los testigos que al recibir un aislado de un brote de campo mostraron parasitemia prolongada y signos clínicos severos.

Con estos trabajos se demuestra que México cuenta con dos cepas una cepa de *B. bovis* (BOR) originalmente clonada, irradiada a 18.9 Kr o 189 Gy y mantenida en cultivo *in vitro* (Rodríguez *et al*, 1993) y otra cepa de *B. bigemina* (BIS) atenuada mediante innumerables pases en cultivo *in vitro* la cual ha presentado características biológicas de reducida virulencia al la inoculación de animales susceptibles (Vega *et al*, 1985), además de inducir protección al desafío contra cepas

virulentas del hemoparásito transmitidas por garrapatas infectadas (Hernández *et al*, 1990).

A partir del año 1992 el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) inició en el Rancho González Blanco (GB) en Querétaro, estudios con ambas cepas descritas para conocer inocuidad y capacidad inmunoprotectora contra el desafío controlado y de campo de aislados patógenos. Los dos primeros estudios consistieron en la vacunación y desafío controlado de animales susceptibles contra una sola de las especies, con objeto de evaluar la patogenicidad de las cepas derivadas de cultivo *in vitro* (fresco), comparada con la de los aislados de campo, así como obtener la dosis mínima de desafío (aislados de campo) y la dosis mínima inmunizante (cepas de cultivo). Los resultados mostraron que la clona *B. bovis* y la cepa *B. bigemina*, utilizadas a dosis mínimas de 1×10^5 protegen en forma satisfactoria a los bovinos desafiados con aislados virulentos (Cantó *et al*, 1996; Figueroa *et al*, 1998, en prensa). El siguiente paso fue el de demostrar si ambas cepas protegían en forma mixta en contra del desafío en condiciones de campo; es decir, bajo una infección natural, observando que la vacuna combinada de ambas especies de *Babesia* confiere protección del 100% al aplicarse una dosis de 1×10^7 fresca y cuando los bovinos son vacunados dos meses antes de la exposición a garrapatas. El siguiente estudio se realizó para comprobar la capacidad protectora del inmunógeno al ser aplicado en la zona endémica observando que la vacuna confiere solo un 70% de protección a bovinos inmunizados y sometidos al desafío natural 21 días después, lo cual nos puede indicar que el estrés térmico

sufrido por los animales, aunado a la vacunación no permite a los animales tener una respuesta adecuada (Rojas *et al*, 1995).

En los trabajos anteriores realizados por el grupo del CENID-PAVET, se demostró la capacidad inmunoprotectora de las cepas de *B. bovis* y *B. bigemina*, sin embargo, en todos los estudios se utilizaron glóbulos rojos frescos infectados provenientes de cultivo *in vitro*, lo cual sería sumamente difícil llevarlo a cabo en vacunaciones masivas o en regiones alejadas. Por lo tanto, se consideró la necesidad de evaluar el uso de cepas atenuadas como material congelado en nitrógeno líquido, lo que podría significar una optimización en la producción, mantenimiento y distribución del material premunizante.

IV. OBJETIVOS

- I. Evaluar la capacidad inmunogénica de las cepas atenuadas de *Babesia* spp. previamente congeladas, en bovinos susceptibles.
- II. Observar el comportamiento de la infección provocada por las cepas atenuadas y congeladas derivadas de cultivo, al ser inoculadas en animales susceptibles a diferentes dosis.
- III. Determinar la eficacia inmunoprotectora de las diferentes dosis atenuadas y congeladas de *Babesia* spp. en bovinos susceptibles bajo una confrontación de campo.

IV. HIPÓTESIS

Con las diferentes dosis de inmunógeno mixto de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* atenuadas y congeladas, se obtendrá una protección superior al 90% en contra de una confrontación de campo.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Localización.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Rancho González Blanco (GB), en el Campo Experimental (CE) "La Posta" y en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) donde se llevó a cabo la cinética de anticuerpos específicos contra *Babesia* spp.

VACUNACIÓN. Se realizó en una zona libre de garrapatas en las instalaciones del Rancho GB a 27 km de Santiago de Querétaro en el Municipio del Marqués, que cuenta con una precipitación media anual de 500 a 600 mm y una temperatura de 20°C.

CONFRONTACIÓN. Se llevó a cabo en las instalaciones del CE "La Posta" en Paso del Toro, Veracruz del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), la cual es una zona tropical reconocida como zona endémica de babesiosis.

B. Material biológico.

ANIMALES EXPERIMENTALES. Se utilizaron 24 novillos *Bos taurus* mayores de 14 meses de edad con un peso promedio de 320 kg provenientes de Chihuahua, zona libre de garrapatas *Boophilus* spp.. Los animales se encontraban libres de anticuerpos específicos en contra de *Babesia* spp., *Anaplasma marginale*, *Brucella* spp., Leucosis e IBR y negativos a la prueba de Tuberculosis (tuberculina).

INMUNÓGENO. Se emplearon eritrocitos infectados de dos cepas de *Babesia* derivadas y mantenidas en cultivo *in vitro*, previamente demostradas como atenuadas, las cuales se identificaron como BIS-1 para *Babesia bigemina* y BOR-1 para *Babesia bovis*. La cepa de *B. bovis* es una clona de la cepa *B. bovis* KBb la cual fue irradiada mediante la exposición a una fuente de Cobalto⁶⁰ a 189 Gy y la cepa *B. bigemina* fue obtenida después de un número indefinido de pases en cultivo *in vitro*. Las dosis experimentales del inóculo mixto fueron de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 eritrocitos infectados (Ei) con cada especie de *Babesia*, las cuales fueron congeladas previamente a -196°C en nitrógeno líquido y se utilizó como control la dosis de 1×10^7 con cada especie de *Babesia* de origen fresco.

C. Diseño experimental.

El estudio se realizó en dos fases:

FASE 1. VACUNACIÓN. Los animales se dividieron aleatoriamente en seis grupos de 4 animales cada uno. Los animales de los grupos 1, 2, 3 y 4 recibieron un inóculo mixto de Ei con cada uno de los microorganismos mencionados de origen congelado en dosis de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 respectivamente. El grupo 5 recibió un inóculo mixto de Ei de 1×10^7 de origen fresco y por último el grupo 6 que fungió como testigo a la confrontación se le inocularon con eritrocitos no infectados a la misma dosis (GRNI).

FASE 2. CONFRONTACIÓN DE CAMPO DE LOS ANIMALES VACUNADOS.

Cuatro meses después de la inmunización el lote de animales experimentales fue trasladado al CE "La Posta" y liberado inmediatamente en potreros infestados por la

garrapata *Boophilus* spp.. La confrontación de campo se realizó en forma natural mediante la exposición del ganado a la garrapata vector por 30 días sin tratamiento garrapaticida alguno.

D. Seguimiento clínico de los animales.

Tanto el período comprendido durante la vacunación como en la confrontación, a los animales se les realizó un seguimiento clínico individual. Antes de la inoculación se obtuvo temperatura rectal y volumen corpuscular aglomerado (VCA) para determinar los valores basales. A partir del día 0 (día de la inoculación) se registró diariamente la temperatura rectal. Del día 5 en adelante se obtuvo sangre por venopunción coccígea en tubos vacutainer (Becton y Dickinson) con y sin ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) en condiciones asépticas para medir VCA por la técnica de microhematocrito (Schalm *et al*, 1975). El porcentaje de eritrocitos infectados (PEP) se obtuvo por medio de frotis sanguíneos delgados teñidos con colorante Giemsa (Schalm *et al*, 1975) y observados en el microscópio óptico con el objetivo de inmersión (100X). Por otro lado, la sangre obtenida de los tubos sin anticoagulante se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 10 minutos para la obtención de suero con objeto de detectar anticuerpos específicos en contra de *Babesia* por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Ocampo, 1994; Apéndice I). Todas estas variables se determinaron diariamente hasta el día 13 y después cada 7 días. Posteriormente los animales se mantuvieron tres meses en los corrales con el manejo propio del rancho GB hasta la confrontación. En la fase 2 (confrontación), al igual que en la vacunación, el seguimiento clínico se realizó

los días 1-6-9-11 pos introducción y después diariamente hasta el día 27 con objeto de observar la presentación sintomática de la enfermedad.

Los datos se analizaron obteniendo medias y desviaciones estándar por grupo de las variables estudiadas para realizar la estadística descriptiva.

DISEÑO EXPERIMENTAL

GRUPOS	NO. DE ANIMALES	DOSIS DEL INÓCULO*	TIPO DE INÓCULO
I	4	1×10^7	Congelado
II	4	5×10^7	Congelado
III	4	1×10^8	Congelado
IV	4	5×10^8	Congelado
V	4	1×10^7	Fresco
VI	4	testigo	GRNi**

*Inóculo compuesto por *B. bovis* y *B. bigemina* con dosis igual en cada especie.

**Glóbulos rojos no infectados

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. VACUNACIÓN.

Los resultados de la vacunación nos muestran que ninguno de los grupos vacunados sufrieron alteraciones importantes tanto en los valores de temperatura como de volumen corpuscular aglomerado (VCA) (Apéndice 2). Sin embargo, se pudieron observar alzas de temperatura y disminución del hematocrito, probablemente causado no solo por la inoculación del parásito sino también por la inyección de eritrocitos, ya que el grupo testigo también sufrió alteraciones en estas variables.

Se pudo apreciar un descenso marcado de VCA en la primera semana pos inoculación en todos los grupos lo que podía haber sido causado por una respuesta fisiológica normal ya que los animales provenían de una zona árida en la cual existe una hemoconcentración debido a la falta de agua (Gráfica 1). Los resultados de disminución del hematocrito expresados en porcentaje de disminución después de haber restado la baja fisiológica observada en el grupo testigo se observan en la gráfica 2.

Con relación a la temperatura, los cambios observados durante la primera semana pudieron ser debidos a la inoculación de los parásitos o bien al manejo que sufrieron los animales, ya que estos anteriormente se encontraban en pastoreo extensivo y no tenían ningún tipo de manejo. Resultados similares tanto e temperatura como en hematocrito se observó en animales provenientes de Chihuahua por Cantó y col. (1996) y Figueroa y col. (En prensa, 1998).

Volumen corpuscular aglomerado

El promedio de hematocrito de los grupos de animales inoculados con eritrocitos parasitados o eritrocitos normales sufrió un decremento marcado durante la primera semana, posteriormente se estabilizó únicamente en el grupo de animales testigo para el día 7 post-inoculación (PI) (Gráfica 1). Para los animales vacunados en todos los casos, con excepción del grupo 1 se observó que todos sufrieron una baja mayor en el hematocrito en relación del grupo testigo durante la primera semana, debido a la presencia de *B. bigemina* (Gráfica 1) lo cual se confirmó con la presencia del parásito en frotis teñidos con Giemsa. Asimismo, se presentan los valores promedio de todos los grupos pudiéndose observar que los valores mínimos de hematocrito se alcanzaron para los grupos 1 y 2 los días 10 y 12 PI siendo de 25 y 24.5% respectivamente, en cambio los grupos 3, 4 y 5 los tuvieron para el día 11 y fueron de 26.25, 26.75 y 24.75% respectivamente.

En los grupos 2, 3 y 5 se observó que estos sufrieron dos descensos en el VCA, en el grupo 2 fueron de 13.7 y 17.4% los días 7 y 12, mientras que los grupo 3 y 5 sufrieron decrementos del 14.5 y 17.8% y de 13.4 y 15.6% respectivamente los días 7 y 11 PI. El primer decremento pudo ser causado debido a la presencia de *B. bigemina* y el segundo probablemente a la presencia de *B. bovis*, la cual, aunque no fue posible observarla en frotis sanguíneos, si se pudieron medir anticuerpos específicos mediante la técnica de IFI. Salas y col. (1988), al trabajar con una cepa similar a BOR-1, es decir clonada e irradiada informan que no fue posible detectar *B. bovis* en frotis sanguíneos de animales inoculados; sin embargo, fue aislada en cultivo y en becerros al hacer un pase de sangre

con jeringa, indicando la viabilidad de la cepa. La gráfica 2 nos muestra el porcentaje de descenso del hematocrito de los 5 grupos vacunados. Se puede observar que el grupo que presentó mayor decremento fue el grupo 1 con 18.46%, seguido por el grupo 3 con un 17.8% y el grupo 2 con un 17.4% (Cuadro 3). Estas caídas de hematocrito no son tan palpables como las observadas por Ocampo (1994), trabajando con la cepa BOR-1 de *B. bovis* en las que el grupo vacunado en fresco con 1×10^7 E₅₀ tuvo un descenso de VCA por arriba del 35%. En cambio Lona (1994), en un estudio sobre la capacidad protectora de la cepa BIS-1 de *B. bigemina* muestra que los decrementos en el hematocrito se presentan entre el 15 y 20%, lo que es similar a lo observado en los primeros días del presente estudio que es cuando se presentó *B. bigemina* (Gráfica 2). Para el día 86 PI se observa que los valores del porcentaje de hematocrito son similares a los que se presentaron el día de la vacunación (Apéndice 2, Gráfica 1, Gráfica 2). Yunker y col. (1987), observaron en los bovinos esplenectomizados inoculados con una cepa atenuada de *B. bovis* mediante cultivo in vitro un porcentaje de descenso del hematocrito del 49%, encontrando una parasitemia mayor a 0.1%, en el presente estudio el descenso máximo observado fue de 18.46% y la temperatura promedio no fue superior a los 40° C. Asimismo, Bock y col (1991), al utilizar una cepa de *B. bovis* observaron un descenso en el VCA alrededor del 43%. Estos resultados sugieren que lo observado en el presente estudio es indicativo de que se cuenta con un aislado que al ser inoculado no produce daños severos a los animales.

Por otro lado, Hernández (1990), utilizando la cepa de *B. bigemina* que dio origen a la BIS-1 observó una disminución del 25% en el VCA de animales inoculados con una

dosís de 1×10^6 y 1×10^7 , Estos datos podrían sugerir que la cepa después de seis años adicionales en cultivo *in vitro* ha sufrido una atenuación mayor.

Temperatura.

Se observó que todos los grupos de animales inoculados sufrieron un incremento mayor a 39.5°C en el promedio de temperatura rectal a partir del día 5 post-inoculación (Gráfica 3). El cuadro no. 3 muestra el número de animales que sufrieron fiebre en cada grupo y los días con temperatura superior a los 39.5°C . Se puede observar que con excepción del grupo 1 en el que se presentó fiebre durante 7 días, los demás grupos solos tuvieron fiebre de 2 a 4 días.

Los grupos vacunados que presentaron un mayor incremento en su promedio de temperatura fueron el grupo 3 con 40°C , grupo 4 con 40.2°C y grupo 5 con 40.1°C , los demás grupos sufrieron un incremento hasta 39.9°C (Cuadro 3, Gráfica 3).

Parasitemia.

Con respecto a esta variable se esperaba encontrar ambas especies de *Babesia* en frotis sanguíneos, pero solo se observó *B. bigemina*. Esto no significa que los animales no se infectaron con ambas especies sino que el porcentaje de parasitemia de *B. bovis* fue tan mínimo que hizo imposible la observación en frotis.

El porcentaje de parasitemia observado de *B. bigemina* fue menor de 0.1% en todos los casos. El número de animales por grupo en el que se pudo observar el parásito fue de 4, 2, 1, 1 y 4 para los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. En los animales restantes no

se observaron eritrocitos parasitados. La duración de la parasitemia observada durante la vacunación fue de 4 días para el grupo 5 desde el día 5 pos inoculación, para el grupo 4 fue de 3 días desde el día 6 pos inoculación, para los grupos 1 y 2 fue de 2 días para ambos desde el día 8 pos inoculación y por último para el grupo 3 solamente se observó 1 día de parasitemia que fue el día 8 pos inoculación. Ningún animal presentó babesiosis clínica por lo que no se utilizó tratamiento alguno.

Cuadro 3. RESUMEN DE LA FASE DE VACUNACIÓN

CONCEPTO/GRUPO	1	2	3	4	5
Período de incubación*	5	6	6	5	5
Fiebre mayor 39.5°C (días)*	7	4	3	2	3
Fiebre mayor 39.5°C (no. animales)	4	4	4	4	4
Temperatura máxima *	39.9	40	40	40.2	40.1
Valor mínimo individual VCA (%)**	21	21	24	24	21
Valor mínimo VCA (%)*	25	24.5	26.25	26.75	24.75
Máxima reducción VCA (%)*	18.46	17.4	17.8	12.021	13.45
Máxima reducción VCA (día)	10	12	11	11	11
Días de parasitemia <i>B. bigemina</i> *	2	2	1	3	4

*Promedio de 4 animales/gpo.

** VCA= Volumen corpuscular aglomerado.

B. CONFRONTACIÓN.

Los resultados obtenidos en la etapa de confrontación, nos indican que el inmunógeno conformado por una cepa atenuada irradiada y otra cepa atenuada a través de pases en cultivo *in vitro* confirieron sólida protección al desafío de campo, a través de garrapatas infectadas. En el presente estudio *B. bovis* fue irradiada a una dosis de 189 Geys (18.9 Krads) en una fuente de Co⁶⁰. A este respecto Castro y Canabéz (1968), informaron que la irradiación ionizante de sangre infectada con *B. bigemina*

podría eliminar la infectividad del parásito para el ganado. Mahoney *et al.* (1973), observaron que el período de incubación de la infección por *B. bovis* en becerros esplenectomizados, se alargó después de la administración de parásitos expuestos a una dosis creciente de irradiación gamma. La exposición de parásitos a dosis de 20-50 Krads pareció ser necesario para producir una atenuación de *B. bovis*, la cual todavía confería inmunidad protectora al desafío heterólogo. Wright *et al.* (1983), mencionan que la población de *B. bovis* irradiada resultó no ser transmitida por garrapatas, esto también se demostró con la cepa BOR en estudios realizados por Mosqueda *et al.* (1994) y la cepa BIS en estudio realizados por Hernandez (1990). La eficiencia en la inmunización de parásitos irradiados podría estar relacionada al hecho de que aún después de la irradiación existe alguna actividad metabólica residual por el organismo (Purnell *et al.*, 1978). Buening *et al.* (1986), demostraron que una clona de *B. bovis* seleccionada con base en su rápido crecimiento *in vitro* resultó ser menos patógena que la población original de parásitos. El ganado que fue inoculado con el parásito clonado estaba inmune, ya que al desafío con una población virulenta de *B. bovis* no mostró cambios significativos en el hematocrito y en la temperatura rectal.

Volúmen corpuscular aglomerado

La gráfica No. 4 nos muestra el promedio del porcentaje de VCA de los seis grupos de animales, donde se observa con excepción del grupo testigo en el cual el porcentaje de hematocrito disminuye por debajo del 15%, los grupos vacunados sin importar la dosis y presentación de inmunógeno, tienen un comportamiento parecido sin

que el hematocrito disminuya por debajo del 20% en ninguno de los casos. La gráfica No. 5 nos muestra el porcentaje de descenso del hematocrito de los animales en experimentación, apreciándose las diferencias entre los grupos vacunados y el testigo. Ocampo (1994), nos indica un descenso del 40% para el grupo testigo utilizando como desafío una cepa de campo de *B. bovis*, por otro lado, Lona (1994), utilizando una cepa de campo de *B. bigemina* observa un descenso del hematocrito de 44.64%. Estos resultados al compararlos con el presente estudio donde se observa un descenso en hematocrito del 65.9% en testigos, probablemente sean debidos a que los experimentos realizados por Ocampo (1994) y Lona (1994) se llevaron a cabo en condiciones controladas en una zona templada en la cual los animales se encontraban con agua y alimento *ad libitum*, además de que el desafío se realizó con una sola especie. En relación a los animales vacunados los máximos decrementos observados fueron de 30.8, 30.4, 26.7, 31, 31.4% para los grupos vacunados con dosis de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 de un inmunógeno congelado y 1×10^7 de inmunógeno fresco respectivamente. Estos resultados también difieren en gran proporción a los observados por Ocampo (1994), con inóculo fresco a dosis de 1×10^7 y 1×10^8 observando descensos que fueron de 11.3 y 9.8% respectivamente. Mientras que Lona (1994), indica descensos de 17.4% y del 6.8% para dosis de 1×10^7 y 1×10^8 respectivamente. Por otro lado Rojas y col. (1995), en dos experimentos realizados con material fresco de BOR y BIS y desafío naturales, observaron decrementos pos desafío del 32.4% en animales que fueron vacunados en el altiplano y del 39.2% en animales vacunados en el trópico, lo que es similar a lo observado en el presente experimento.

Las gráficas 6, 7, 8 y 9 nos permiten comparar con mayor claridad el comportamiento de cada uno de los grupos vacunados con el inmunógeno congelado contra el grupo inoculado con inmunógeno fresco y grupo testigo de desafío. Como se puede observar los grupos 1 y 2 vacunados con dosis de 1×10^7 y 5×10^7 respectivamente presentan un hematocrito menor al observado en el grupo inoculado con el inmunógeno fresco. No así los grupos 3 y 4 vacunados con 1×10^8 y 5×10^8 respectivamente, los cuales tienen un descenso menor del VCA que el grupo inoculado con inmunógeno fresco. Sin embargo, es importante mencionar que dos de los animales vacunados con la dosis de 5×10^8 enfermaron de babesiosis clínica aguda presentando uno de ellos signología nerviosa clásica de babesiosis tipo cerebral producida por *B. bovis*. En el caso de los animales testigos al desafío se puede observar que estos muere uno el día 16, dos el día 17 y el último el día 19 PIP.

Temperatura

La temperatura rectal en casos de babesiosis debe ser tomado muy en cuenta ya que será la primera variable en la que podemos observar cambios. En el presente estudio se observó que el grupo de animales testigo comienza a presentar un incremento de esta variable a partir del día 11 PIP llegando a ser superior a los 40.5°C del día 14 al día 17 PIP (Gráfica 10). Por otro lado, ninguno de los grupos vacunados presenta fiebre superior a los 40.3°C ; además, los tres grupos que presentaron temperatura superior a los 40°C (grupo 1, 2 y 3), esta solo fue por un día, los días 10, 10 y 11 PIP, lo que podría indicar una reacción con *B. bovis*. Rojas *et al.* (1995), indica que la temperatura de animales vacunados con el inmunógeno fresco a una dosis de 1×10^7 sufrió un incremento

hasta los 40.1°C, el día 19 PIP, lo que indicaría una reacción contra *B. bigemina*. Los resultados de ambos experimentos indican que los animales vacunados son susceptibles de presentar fiebre por arriba de los 40°C, pero esta es menor tanto en días de duración como en grados centígrados que la que se presenta en animales no vacunados (Gráfica 10).

Parasitemia.

El día de inicio de la presencia de parasitemia en los animales de los diferentes grupos y los días de permanencia de esta durante el experimento se observa en el cuadro 4. Aquí se observa que todos los animales presentaron ambas especies de *Babesia* en frotis de sangre periférica teñidos con colorante Giemsa; donde se puede apreciar claramente que en la mayoría de los animales la primera especie en presentarse es *B. bovis* debido a que es transmitida por la larva *Boophilus microplus*. Posteriormente, todos los animales presentaron *B. bigemina* la cual es transmitida por ninfas y garrapatas adultas.

TÍTULOS DE ANTICUERPOS.

En el presente estudio se observó que los títulos de anticuerpos durante la vacunación y detectados mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta empiezan a aparecer a partir del día 13 pos inoculación (PI) llegando al máximo entre los días 74 y 94 PI (Apéndice 2). Estos títulos son inferiores a los observados por Ocampo (1994), trabajando con la cepa BOR y Lona (1994), utilizando la cepa BIS. Esto puede haber ocurrido debido a que en esta ocasión el sistema inmune tuvo que hacer frente a dos

infecciones distintas a un mismo tiempo y este hecho le impidió montar respuestas más altas; sin embargo, el que los títulos se hayan mantenido sin mostrar un decremento hasta el momento del desafío, podría significar la presencia de anticuerpos específicos exclusivamente contra el parásito y no contra el complejo eritrocito-parásito. Los títulos vacunales también indican que aún cuando no fue posible observar *B. bovis* en los frotis sanguíneos durante este tiempo, el protozooario estaba presente en la circulación y que fue debido a las bajas parasitemias (<0.01%) que no pudo detectarse. Durante la confrontación se observa que los títulos de anticuerpos de los animales vacunados sufren en parte, un ligero incremento a partir del día 12 PIP observándose una marcada alza en todos los grupo a partir del día 19 PIP, llegando a sus niveles más altos para el día 36 PIP (Gráfica 11). Estos resultados son similares a los observados por Rojas *et al.* (1995), utilizando ambas especies atenuadas en fresco y bajo un desafío natural.

Cuadro 4. PARASITEMIAS DURANTE LA FASE DE CONFRONTACION

Días/0	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3				Grupo 4				Grupo 5				Grupo 6			
	14	2	32	4	31	7	13	10	44	30	1	27	21	22	42	40	26	24	45	23	11	9	33	39
0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
13	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
14	(-)	(-)	(-)	Bb	(-)	(-)	(-)	b	(-)	b	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	b	(-)	(-)	(-)	Bb	b	b	
15	(-)	b	b	Bb	b	(-)	Bb	b	(-)	Bb	(-)	b	b	(-)	(-)	b	(-)	b	(-)	(-)	Bb	Bb	Bb	(-)
16	(-)	Bb	(-)	Bb	b	b	B	b	(-)	Bb	(-)	Bb	(-)	(-)	Bb	(-)	Bb	b	(-)	Bb	Bb	B	Bb	
17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
18	b	Bb	Bb	(-)	b	Bb	Bb	b	Bb	Bb	(-)	(-)	(-)	Bb	Bb	b	B	Bb	(-)	Bb	RIP	b	(-)	
19	(-)	Bb	B	(-)	(-)	(-)	Bb	b	(-)	(-)	Bb	(-)	(-)	Bb	Bb	(-)	(-)	B	B	RIP		RIP	Bb	
20	(-)	Bb	(-)	(-)	(-)	b	B	b	(-)	b	(-)	(-)	(-)	Bb	RIP	(-)	(-)	B	Bb				Bb	
21	b	(-)	Bb	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Bb	(-)	B	(-)	RIP		b	Bb	B	Bb				RIP	
22	(-)	b	B	(-)	(-)	Bb	B	B	(-)	B	(-)	B	(-)			B	(-)	B	b					
23	(-)	(-)	B	(-)	Bb	B	(-)	B	B	B	B	B	B			B	(-)	B	(-)					
24	(-)	(-)	B	B	Bb	B	(-)	B	B	B	B	B	B			B	(-)	Bb	(-)					
25	B	B	B	B	B	B	(-)	B	B	B	B	B	B	(-)		B	B	B	(-)					
26	B	(-)	B	B	B	B	(-)	B	B	B	B	B	B			B	B	(-)	B					
27	B	(-)	B	(-)	B	B	(-)	(-)	B	B	B	B	(-)	B		B	B	B	(-)					
28	B	B	B	B	B	B	(-)	B	(-)	B	(-)	(-)	B	B		B	B	(-)	B					
30	B	(-)	B	B	(-)	(-)	B	(-)	(-)	(-)	B	(-)	(-)			B	(-)	(-)	B					
31	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)			(-)	(-)	(-)	(-)					
34	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)			(-)	(-)	(-)	(-)					
39	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)			(-)	(-)	(-)	(-)					

(-) = No se observó *Babesia* spp en frotis sanguíneo.

b = *Babesia bovis*

B = *Babesia bigemina*

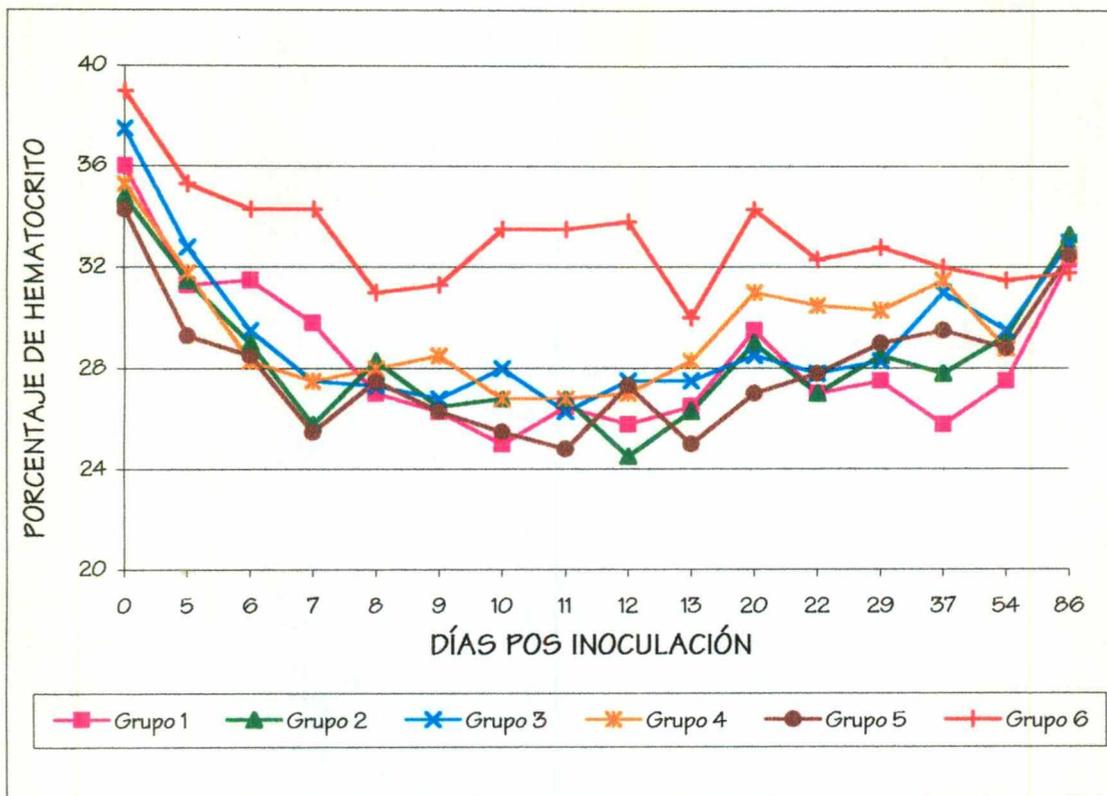
RIP = muerto

VII. CONCLUSIONES

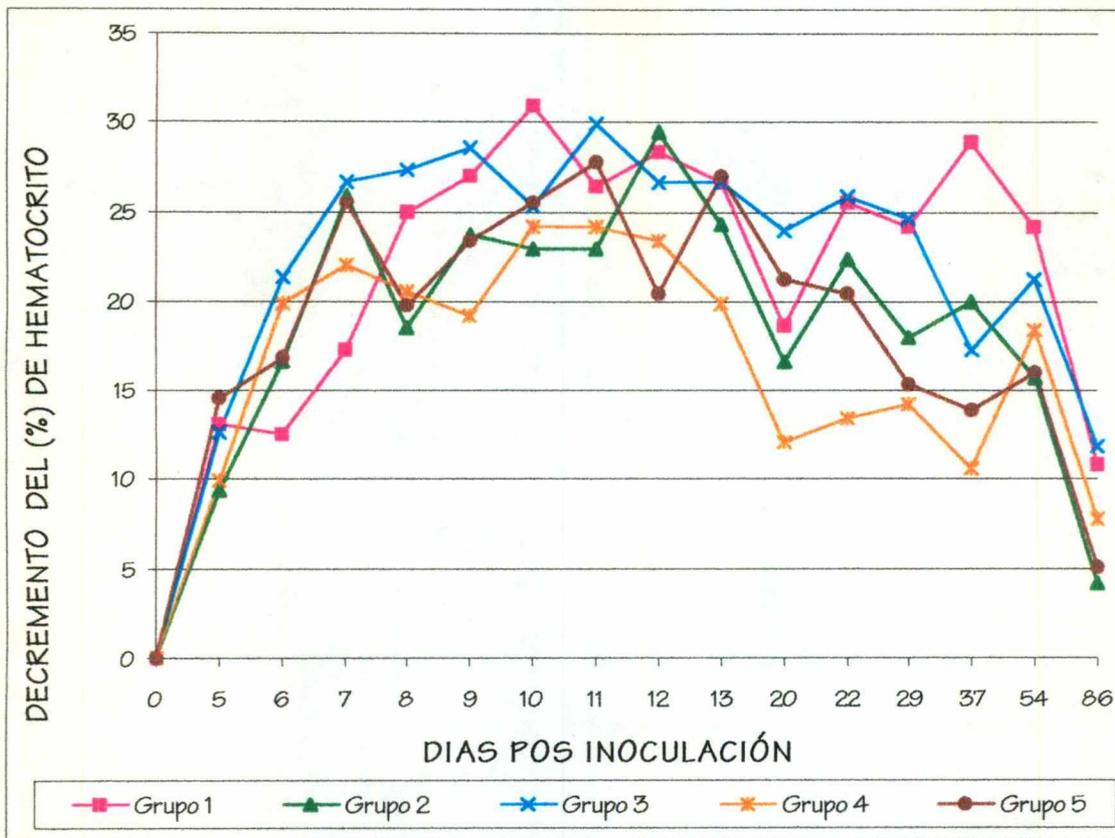
La cepa de *B. bovis* (BOR) clonada e irradiada y mantenida en cultivo *in vitro* y la cepa de *B. bigemina* atenuada por un sin número de pases en cultivo *in vitro* pueden ser utilizadas como inmunógenos atenuados ya que no producen daños severos al ser inoculados en animales susceptibles.

Los animales inmunizados con inmunógeno mixto congelado a dosis de 1×10^7 , 5×10^7 y 1×10^8 eritrocitos infectados de las cepas BOR y BIS, mostraron que al ser confrontados en una zona endémica infestada de garrapatas *Boophilus* spp. tuvieron una protección sólida del 100% en contra de *Babesia* spp.

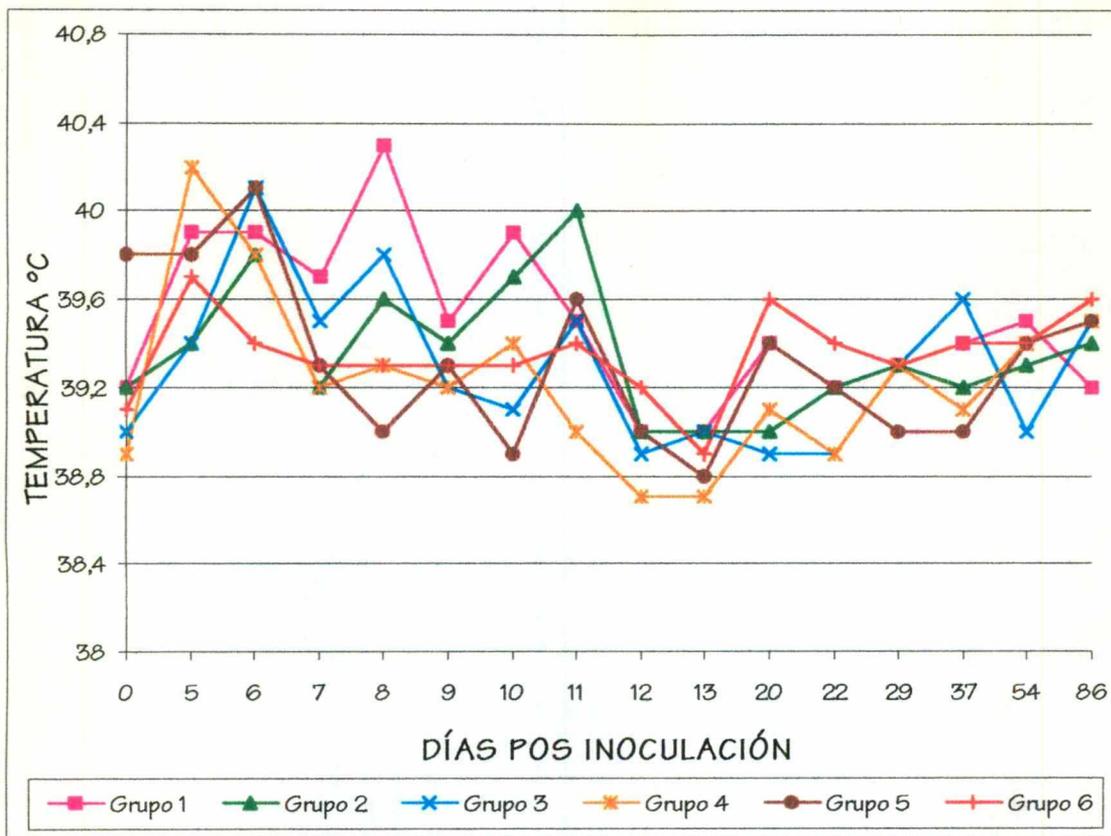
La dosis de inmunógeno mixto congelado que se comportó igual o mejor que el inmunógeno fresco (1×10^7 Ei) y que podría ser utilizado como vacuna es la dosis de 1×10^8 Ei.



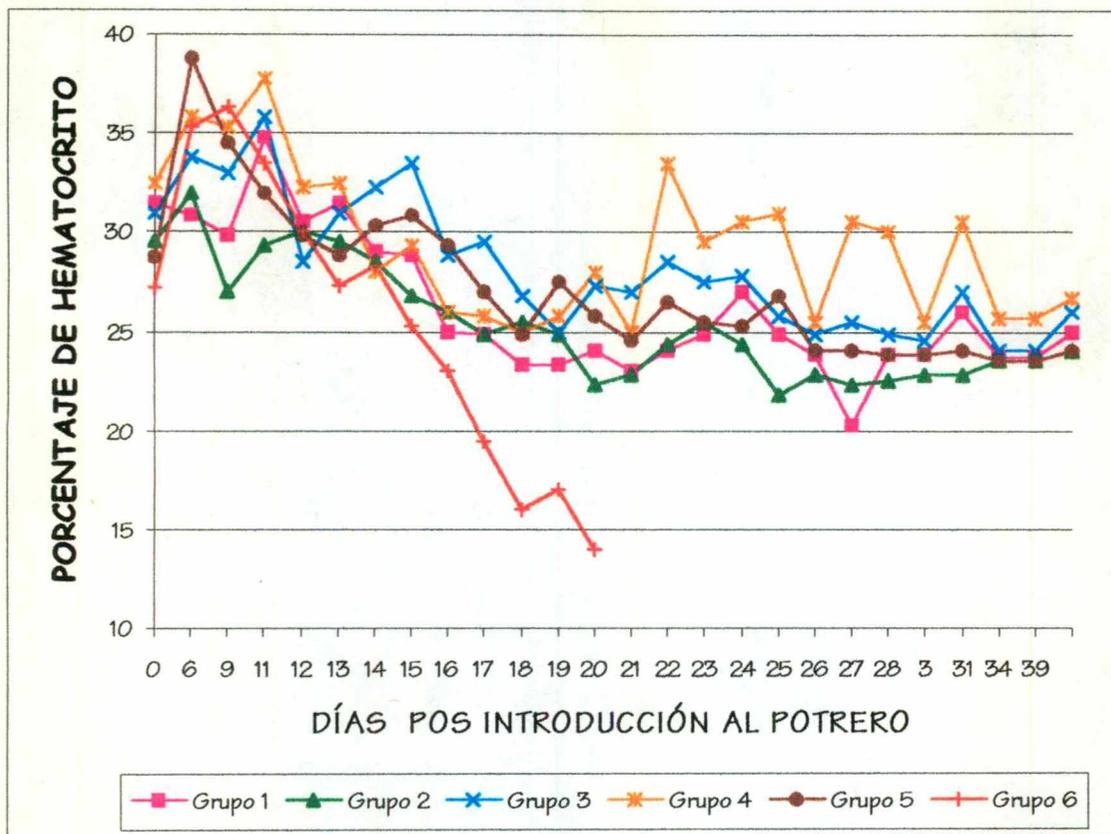
Gráfica 1. Comparación del comportamiento de los porcentajes de hematocrito promedio, de los diferentes grupos de animales vacunados, del día 0 (inoculación) al día 86 pos vacunación. Los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron inoculados con un inmunógeno mixto congelado de *Babesia bigemina* y *B. bovis*, a una dosis de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 y 5×10^8 eritrocitos infectados (Ei) respectivamente, de cada una de las especies. El grupo 5 fue inoculado con las mismas especies y el mismo día a una dosis de 1×10^7 Ei en fresco de cada especie y el grupo 6 (testigo) recibió una dosis de 1×10^7 de eritrocitos normales.



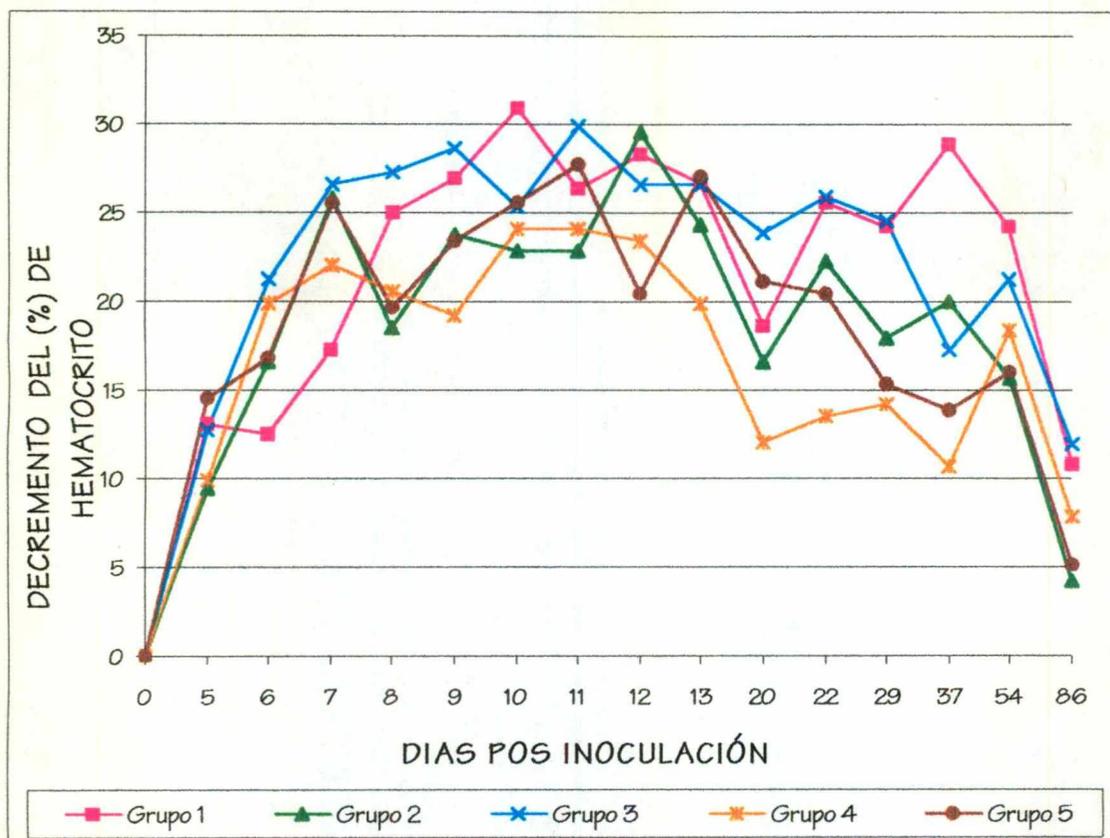
Gráfica 2. Comparación del comportamiento del decremento promedio de los porcentajes de hematocrito, de los diferentes grupos de animales vacunados, del día 0 (inoculación) al día 86 pos vacunación. Los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron inoculados con un inmunógeno mixto congelado de *Babesia bigemina* y *B. bovis*, a una dosis de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 y 5×10^8 eritrocitos infectados (Ei) respectivamente, de cada una de las especies. El grupo 5 fue inoculado con las mismas especies y el mismo día a una dosis de 1×10^7 Ei en fresco de cada especie y el grupo 6 (testigo) recibió una dosis de 1×10^7 de eritrocitos normales.



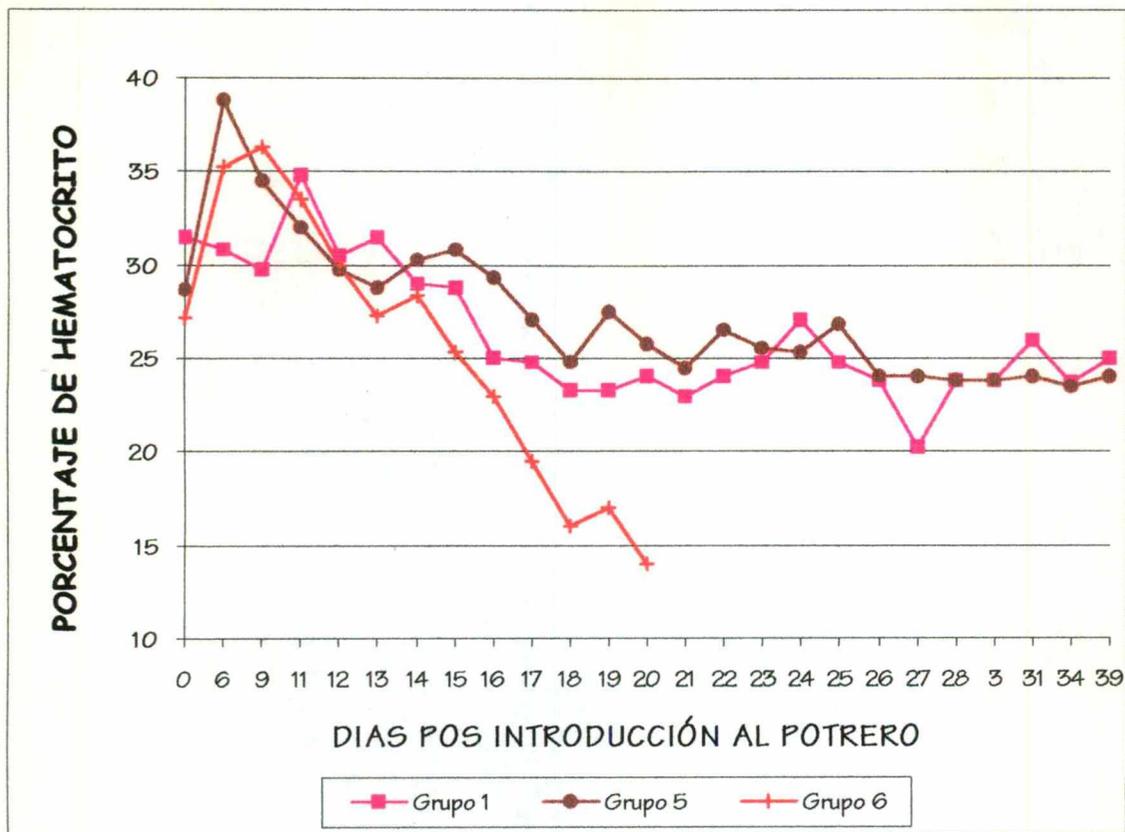
Gráfica 3. Comparación del comportamiento de la temperatura promedio, de los diferentes grupos de animales vacunados, del día 0 (inoculación) al día 86 pos vacunación. Los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron inoculados con un inmunógeno mixto congelado de *Babesia bigemina* y *B. bovis*, a una dosis de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 y 5×10^8 eritrocitos infectados (Ei) respectivamente, de cada una de las especies. El grupo 5 fue inoculado con las mismas especies y el mismo día a una dosis de 1×10^7 Ei en fresco de cada especie y el grupo 6 (testigo) recibió una dosis de 1×10^7 de eritrocitos normales.



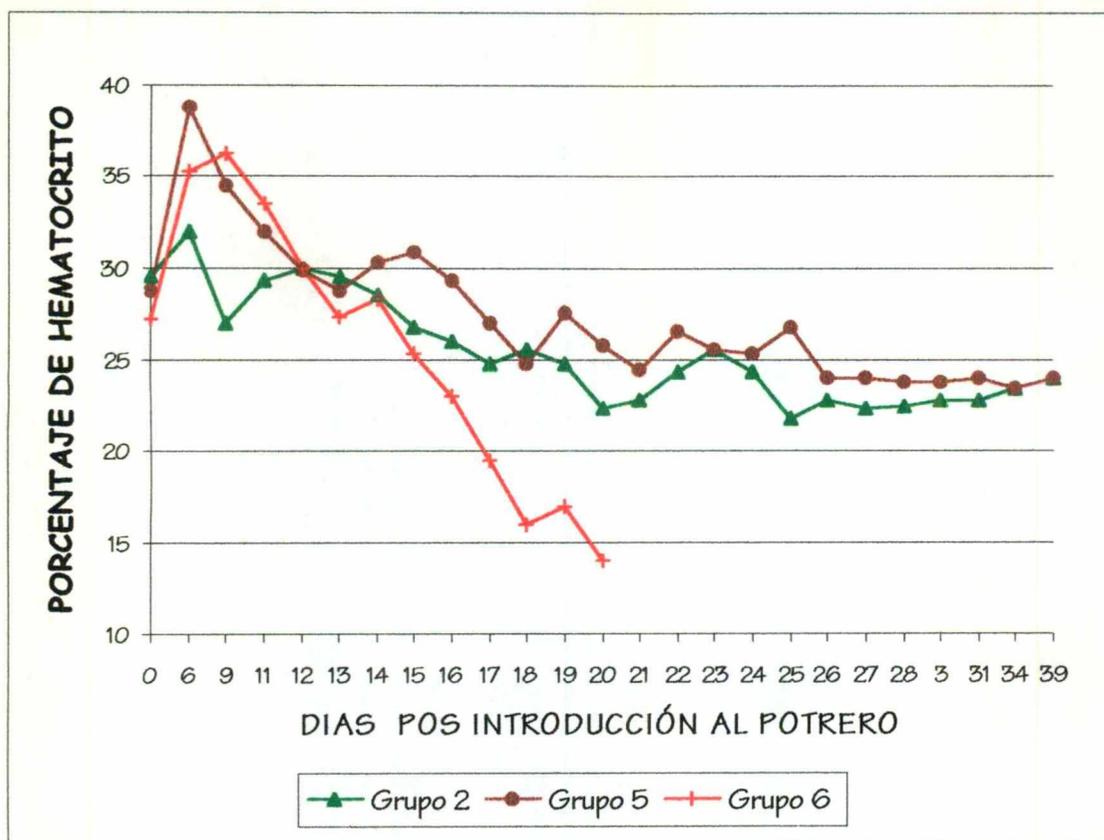
Gráfica 4. Comparación del comportamiento de los porcentajes de hematocrito promedio, de los diferentes grupos de animales vacunados, del día 0 al día 39 pos introducción al potrero (PIP). Los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron inoculados previamente (116 días antes) con un inmunógeno mixto congelado de *Babesia bigemina* y *B. bovis*, a una dosis de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 y 5×10^8 respectivamente, de cada una de las especies. El grupo 5 fue inoculado con las mismas especies y el mismo día a una dosis de 1×10^7 en fresco de cada especie y el grupo 6 (testigo) recibió una dosis de 1×10^7 de eritrocitos normales. Seis de los animales murieron, del grupo 6 dos el día 26, uno el día 27 y uno el día 29 PIP y el del grupo 4 uno el día 28 y el otro día 30 PIP-



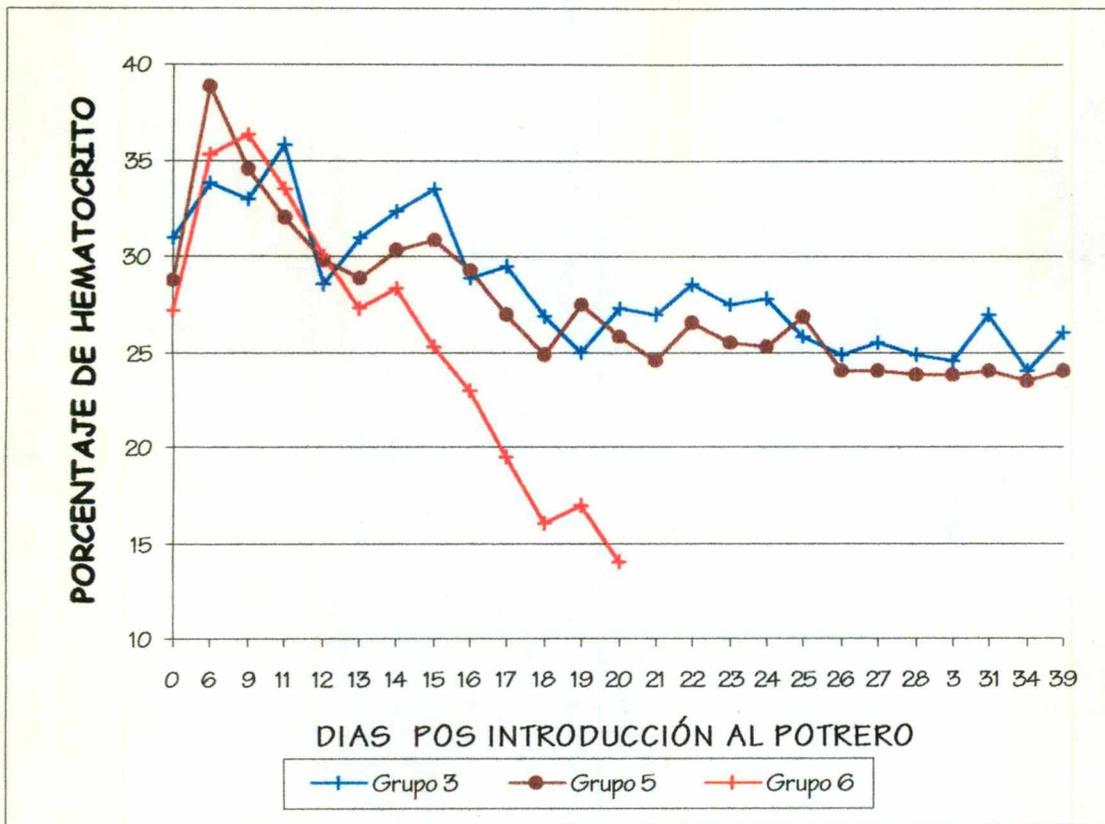
Gráfica 5. Comparación del comportamiento del decremento promedio de los porcentajes de hematocrito, de los diferentes grupos de animales vacunados, del día 0 al día 39 pos introducción al potrero (PIP).. Los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron inoculados previamente (116 días antes) con un inmunógeno mixto congelado de *Babesia bigemina* y *B. bovis*, a una dosis de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 y 5×10^8 respectivamente, de cada una de las especies. El grupo 5 fue inoculado con las mismas especies y el mismo día a una dosis de 1×10^7 en fresco de cada especie y el grupo 6 (testigo) recibió una dosis de 1×10^7 de eritrocitos normales. Seis de los animales murieron, del grupo 6 dos el día 26, uno el día 27 y uno el día 29 PIP y el del grupo 4 uno el día 28 y el otro día 30 PIP-



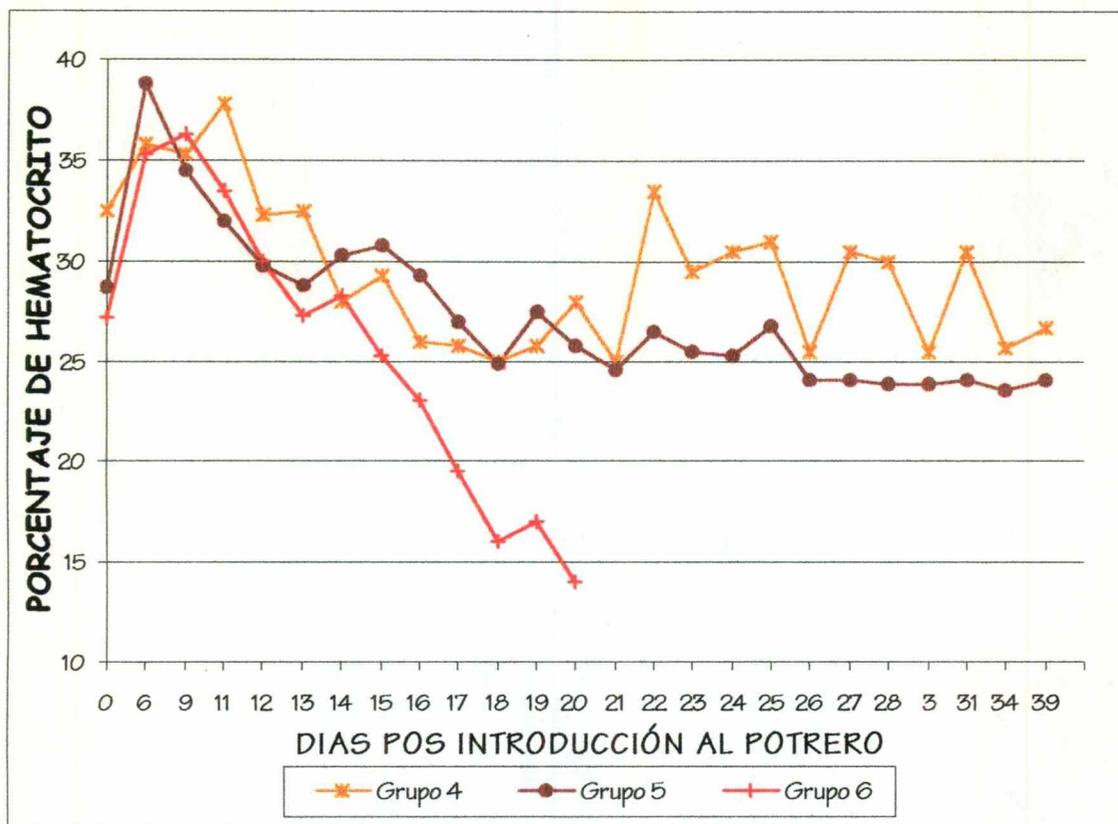
Gráfica 6. Comparación del comportamiento de los porcentajes de hematocrito promedio, de los grupos 1, 5 y 6 de animales experimentales, del día 0 al día 39 pos introducción al potrero (PIP). El grupo 1 fue inoculado previamente (116 días antes) con un inmunógeno mixto congelado de *Babesia bigemina* y *B. bovis*, a una dosis de 1×10^7 , de cada una de las especies. El grupo 5 fue inoculado con las mismas especies y el mismo día a una dosis de 1×10^7 en fresco de cada especie y el grupo 6 (testigo) recibió una dosis de 1×10^7 de eritrocitos normales. Los cuatro animales del grupo 6 murieron dos el día 26, uno el día 27 y uno el día 29 PIP.



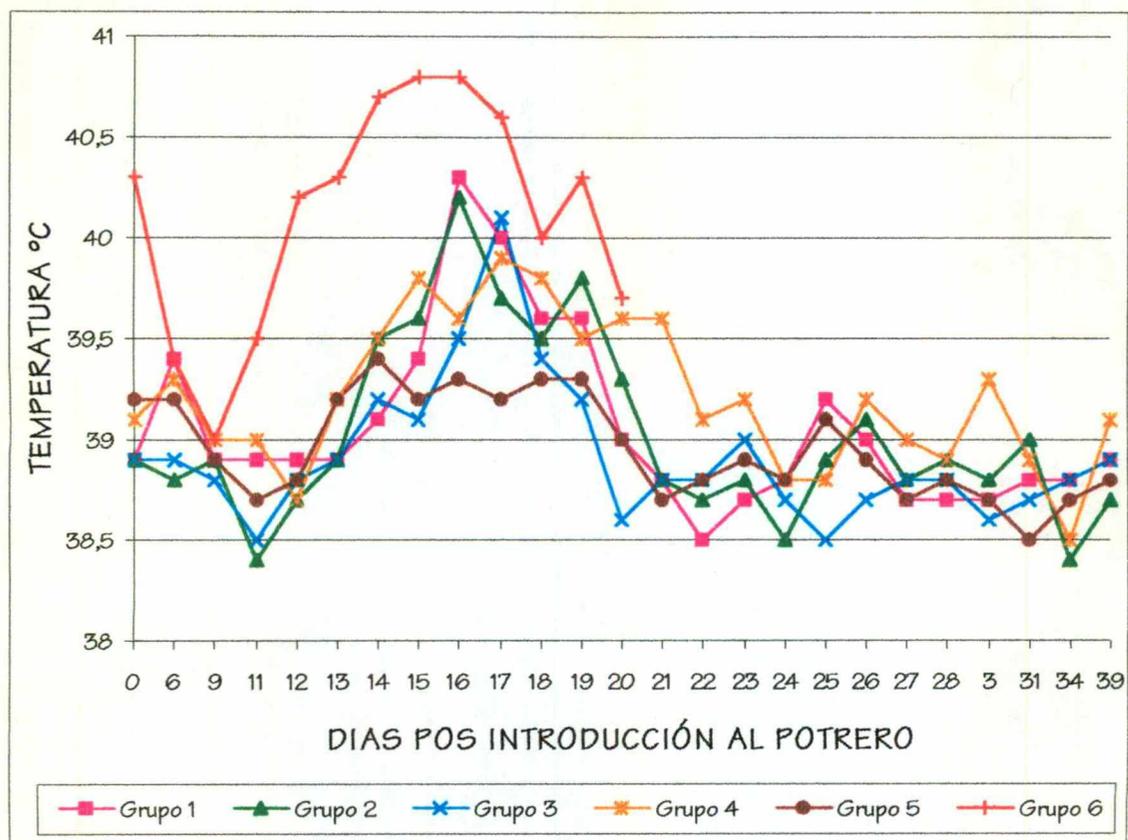
Gráfica 7. Comparación del comportamiento de los porcentajes de hematocrito promedio, de los grupos 2, 5 y 6 de animales experimentales, del día 0 al día 39 pos introducción al potrero (PIP). El grupo 2 fue inoculado previamente (116 días antes) con un inmunógeno mixto congelado de *Babesia bigemina* y *B. bovis*, a una dosis de 5×10^7 , de cada una de las especies. El grupo 5 fue inoculado con las mismas especies y el mismo día a una dosis de 1×10^7 en fresco de cada especie y el grupo 6 (testigo) recibió una dosis de 1×10^7 de eritrocitos normales. Los cuatro animales del grupo 6 murieron dos el día 26, uno el día 27 y uno el día 29 PIP.



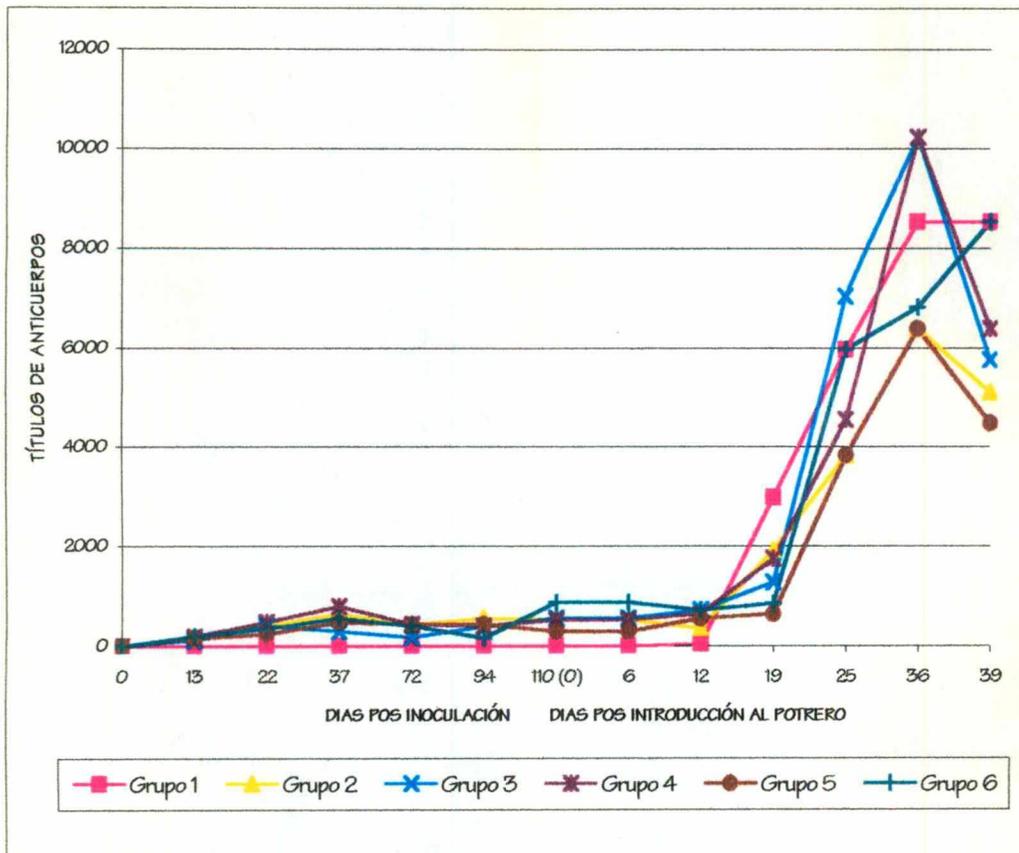
Gráfica 8. Comparación del comportamiento de los porcentajes de hematocrito promedio, de los grupos 3, 5 y 6 de animales experimentales, del día 0 al día 39 pos introducción al potrero (PIP). El grupo 3 fue inoculado previamente (116 días antes) con un inmunógeno mixto congelado de *Babesia bigemina* y *B. bovis*, a una dosis de 1×10^8 , de cada una de las especies. El grupo 5 fue inoculado con las mismas especies y el mismo día a una dosis de 1×10^7 en fresco de cada especie y el grupo 6 (testigo) recibió una dosis de 1×10^7 de eritrocitos normales. Los cuatro animales del grupo 6 murieron dos el día 26, uno el día 27 y uno el día 29 PIP.



Gráfica 9. Comparación del comportamiento de los porcentajes de hematocrito promedio, de los grupos 4, 5 y 6 de animales experimentales, del día 0 al día 39 pos introducción al potrero (PIP). El grupo 4 fue inoculado previamente (116 días antes) con un inmunógeno mixto congelado de *Babesia bigemina* y *B. bovis*, a una dosis de 5×10^8 , de cada una de las especies. El grupo 5 fue inoculado con las mismas especies y el mismo día a una dosis de 1×10^7 en fresco de cada especie y el grupo 6 (testigo) recibió una dosis de 1×10^7 de eritrocitos normales. Los cuatro animales del grupo 6 murieron dos el día 26, uno el día 27 y uno el día 29 PIP. Dos animales del grupo 4 murieron el día 28 y 30 PIP respectivamente.



Gráfica 10. Comparación del comportamiento de la temperatura promedio, de los diferentes grupos de animales vacunados, del día 0 al día 39 pos introducción al potrero (PIP). Los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron inoculados previamente (116 días antes) con un inmunógeno mixto congelado de *Babesia bigemina* y *B. bovis*, a una dosis de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 y 5×10^8 respectivamente, de cada una de las especies. El grupo 5 fue inoculado con las mismas especies y el mismo día a una dosis de 1×10^7 en fresco de cada especie y el grupo 6 (testigo) recibió una dosis de 1×10^7 de eritrocitos normales. Seis de los animales murieron, del grupo 6 dos el día 26, uno el día 27 y uno el día 29 PIP y el del grupo 4 uno el día 28 y el otro día 30 PIP.



Gráfica 11. Títulos de anticuerpos mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta, de los diferentes grupos de animales vacunados, durante todo el experimento, es decir, de los días de pos vacunación y pos introducción al potrero (PIP). Los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron inoculados previamente (116 días antes) con un inmunógeno mixto congelado de *Babesia bigemina* y *B. bovis*, a una dosis de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 y 5×10^8 respectivamente, de cada una de las especies. El grupo 5 fue inoculado con las mismas especies y el mismo día a una dosis de 1×10^7 en fresco de cada especie y el grupo 6 (testigo) recibió una dosis de 1×10^7 de eritrocitos normales. Seis de los animales murieron, del grupo 6 dos el día 26, uno el día 27 y uno el día 29 PIP y el del grupo 4 uno el día 28 y el otro día 30 PIP-

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Aboytes, T.R. y Vega, M.C. A.; 1985. Cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. En: Quiroz, R.H.; 1994. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. 2ª ed. Noriega editores. 187-199.
- Aguirre, D.H., Mangold, A.J., Gaido, A.B., Ríos de, L.G. y Guglielmore, A.; 1989. Evaluación de la infectividad de una vacuna congelada en nitrógeno líquido elaborada en base a *Babesia bigemina* atenuada. *Rep. Med. Vet.* 70:142.
- Alonso, M., Fadruga, M., Blandino, T., Gómez, E. y Baudín, C.; 1991. Atenuación de una cepa cubana de *B. bovis* con fines inmunoprolácticos. *Rev. Salud Anim.* 13: 81.
- Álvarez, J.A. y Cantó, G.J.; 1991. Diagnóstico de la babesiosis. En: Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. Editado por Quiroz, H. UNAM. México, D.F. 62-74
- Álvarez, J.A.; 1991. Métodos más comunes para la prevención de la babesiosis bovina. En: 2º Seminario Internacional de Parasitol. Anim. *División educación continua.* 200-208.
- Álvarez, M. y Cantó, G.J.; 1985. Epidemiología de la babesiasis. En: Parasitología, vol. conmemorativo del 25 Aniv. de la *Soc. Mex. Parasitol.* 1: 54-72.
- Babes, V.; 1888. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boef. *C.R. Hebs Seances Acad. Sci. Paris.* 14:692-694.
- Barnett, S. F.; 1974. Economical Aspects of protozoan tick-borne disease of livestock in parts of the world other than Britain. *Bull Off. Int. Epiz.* 84: 83-196.
- Bishop, J.P. and Adams, L.J.; 1974. *Babesia bigemina*: Immune response of cattle inoculated with irradiated parasites. *Exp. Parasitol.* 35: 35-45.
- Bock, R.E., De Vos, A.J., Kingston, T.G., Shields, I.A. and Dalgliesh, R.J.; 1991. Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. *Vet. Parasitol.* 43: 45-46.
- Broklesby, D.W., Purnell, R.E., Sellwood, S.A.; 1972. The effect irradiation on intraerythrocytic *Babesia major*. *Br. Vet. J.* 128: ii-v.
- Buening, G.M., Kuttler, K.L. and Rodríguez, S.D.; 1986. Evaluation of cloned *Babesia bovis* organism as a live immunogen. *Vet. Parasitol.* 22: 235-24.
- Calder, A.M.J., Dame, B.J., Courtney, H.V.; 1990. The application of recombinant DNA technology to epidemiological studies of babesiosis. *Newsletter Anaplaemosis babesiosis Network* 2(3): 5-7. Citado por: Álvarez, M. y Cantó, G.J.; 1985. Epidemiología de la Babesiasis. En: Parasitología, vol. conmemorativo del 25 Aniv. de la *Soc. Mex. parasitol.* 1: 54-72.
- Callow, L.L. and Hoyte, H.M.; 1961. Transmission experiments using *B. bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* spp. and cattle tick, *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* 37: 381-390.
- Callow, L.L. and Mellors, L.T.; 1966. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomized cattle. *Aust. Vet. J.* 42: 464-465.
- Callow, L.L. y Tammemagi, L.; 1967. Vaccination against bovine babesiosis: Infectivity and virulence of blood from animals either recovered from or reacting to *Babesia argentina*. *Aust. Vet. J.* 49: 249-256.
- Callow, L.L., Mellors, L.T. and McGregor, W.; 1979. Reduction of virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. *Int. J. Parasitol.* 9: 633-638.

- Callow, L.L.; 1985. *Babesia bigemina* in ticks grown on nonbovine host and its transmission to these hosts. *Parasit.* 55: 375-381.
- Callow, L.L.; 1963. *Babesia* spp. in the brains of clinically normal cattle and their detection by a brain smear technique. *Aust. Vet. J.* 39: 25-31.
- Callow, L.L.; 1984. Protozoal and Rickettsial Diseases. In: Animal Health in Australia . Vol. 5 *Australian Government Publishing service.* 123-160.
- Cantó, G.J., Figueroa, J.V., Martínez, J.A., Ramos, J. A., Vega, C.A.; 1996. Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *B. bovis* derivada de cultivo *in vitro*. *Tec. Pec. Mex.* 34(3): 127-134.
- Castro, E.R. and Canabéz, F.; 1968. Propiedades biológicas y características de *Babesia bigemina*. Efectos de radiaciones iónicas sobre la infecciosidad de sangre total infectada. *Bol. Chileno. Parasitol.* 23: 30-33.
- Dalglish, R.J. and Stewart, N.P.; 1978. The extraction of infective *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* from tick eggs and *Babesia bigemina* from unfeed larval ticks. *Aust. Vet. J.* 54: 454-555. Citado por: Álvarez, M. y Cantó, G.J.; 1985. Epidemiología de la Babesiosis. En: Parasitología, vol. conmemorativo del 25 Aniv. de la *Soc. Mex. parasitol.* 1: 54-72
- Dalglish, R.J., Callow, L.L., Mellors, L.T., and McGregor, W.; 1981. Development of highly infective *Babesia bigemina* vaccine of reduced virulence. *Aust. Vet. J.* 57: 8-12.
- De Vos, A.J.; 1978. Immunogenicity and pathogenicity of three South African strains of *B. bovis* in *Bos indicus* cattle. *Onderstepoort J.Vet. Res.* 45: 119-124.
- Delegación Mexicana, FAO; 1981. Estimación de pérdidas económicas por enfermedades de la ganadería mexicana durante el año de 1980. *Bull. off. Int. Eplz.* 93: 903-915.
- Erp, E.; 1979. Cultive of erythrocytic stages of *Babesia*. *Proceedings: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MALARIA AND BABESIOSIS.* México.
- FAO. ; 1978. Report on the second FAO. Export consultation of Research on tick-borne disease and their vectors.
- Figueroa, J.V., Cantó, G.J., Álvarez, J.A., Lona, R, Ramos, J.A. y Vega , C.A. 1998. Capacidad protectora de una cepa de *B. bigemina* derivada de cultivo *in vitro*. *Rev.Tec. Pec. Mex.* En prensa.
- Friedhoff, K.T. and Smith, R.D.; 1981. Transmission of *Babesia* by ticks. En: babesiosis. Ed. Ristic, M. and Kreier J. *Academic Press, Inc,* New York, U.S.A. 267-321.
- García, Z.S.; 1991. Avances en el conocimiento de la epidemiología de la babesiosis. En: Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal Oaxtepec, Morelos. 172-179.
- Guglielmoné, A.; 1989. La inmunización contra anaplasmosis y babesiosis. Experiencias en Argentina. Memorias: Seminario Internacional sobre: diagnóstico, epidemiología y control de enfermedades hemoparasitarias. Bogotá. D.E. Colombia. 121-126.
- Hernández, O.R., Álvarez M.J. A., Buening, G.N., Cantó, G.J., Monroy, B.M., Ramos, A.J.A y Vega , M. C.A.; 1990. Diferencias en la virulencia y la inducción de protección de aislamientos de *Babesia bigemina* derivados de cultivo *in vitro*. *Tec. Pec. Mex.* 28: 51-61.
- Jack, R.M. and Ward, P.A.; 1981. Mechanisms of entry of *Plasmodia* and *Babesia* to in red cells. En: Babesiosis. Ed. Ristic M. and Kreier J.P. *Academic Press Inc.* 445-457.

- Jennings, F.W.; 1981. The anaemias of parasitic infections. In: Pathophysiology of parasitic infections. Ed- Souleby, E.J.L. *Academic Press Inc.* New York, U.S.A. 53-102.
- Johnston, L.A.Y., Leatch, G. and Jones, P.N.; 1978. The duration of latent infection and functional immunity in Draughtmaster and Hereford cattle following natural infection with *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. *Aust. Vet. J.*, 54: 14-18.
- Kuttler, K.L., Zaugg, J.L. and Yunker, C.E.; 1988. The pathogenicity and immunological relationship of virulent and tissue culture adapted *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.* 27: 239-244.
- Kuttler, K.L.; 1986. Enfermedades exóticas de los animales, su prevención, su diagnóstico y control. *Comisión México-Americana para la prevención de fiebre aftosa*. México, D.F., 39-58.
- Levine, N.D., Corlies, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J. Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich III, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprage, V., Vura, J. and Wallace, F.G.; 1980. A new revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27(1): 97-58.
- Levine, N.D.; 1982. Apicomplexa. in: Sinopsis and clasificación de living organisms. *McGraw-Hill Co.*, 571-587.
- Lona, R.; 1994. Evaluación de la capacidad protectora de una cepa de *Babesia bigemina* mantenida en cultivo *in vitro*. Tesis de Licenciatura de EMYZ, UAQ.
- Mahoney, D.F.; 1977. *Babesia* of Domestic Animals. In: Parasitic Protozoa. Edited by Ristic, M. and Kreier J.P. *Academic Press* 4: 1-52.
- Mahoney, D.F. and Mirre, G.B.; 1979. A note on the transmission of *Babesia bovis* by the one host tick *Boophilus microplus*. *Res. Vet. Sci.* 26: 253-254.
- Mahoney, D.F. and Ross, D.R.; 1972. Epizootiological factors in the control of bovine babesiasis. *Aust. Vet. J.* 48: 292-298. Citado por: Álvarez, M. y Cantó, G.J.; 1985. Epidemiología de la Babesiasis. En: Parasitología, vol. conmemorativo del 25 Aniv. de la *Soc. Mex. parasitol.* 1: 54-72.
- Mahoney, D.F.; Wright, I.G. and Kreier, P.J.; 1973. *Babesia argentina*. Infectivity and immunogenicity of irradiated blood parasites for splenectomized calves. *Int. J. Parasitol.* 3: 209-217.
- McKosker, T.J.; 1981. The global importance of babesiosis. En: Ristic, M. And Kreier, I. *Babesiosis*. *Academic press*, New York, N.Y. 1-124.
- Morel, P.C.; 1989. Tick-borne Diseases of Livestock in Africa. En: Manual of tropical Veterinary Parasitology. Edited by Institut d' Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux y Technical Centre for Agricultural and Rural Co-operation . Published by: *CAB International*. English edition. 353-390.
- Mosqueda, J.J., Rojas, E.E., Álvarez, J.A., Figueroa, J.V., Hernández R., Ramos J.A. y Vega, C. A.; 1994. Evaluación de la transmisibilidad de una cepa irradiada de *Babesia bovis* por garrapatas *Boophilus microplus*. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Acapulco, México. 185.
- Nari, A., Solari, M.A. y Cradizo, H.; 1979. Hemovacuna para el control de *Babesia* spp. Y *Anaplasma marginale* en Uruguay. *Veterinaria.* 15: 137.
- Ocampo, J.; 1994. Evaluación de la capacidad protectora de una clona irradiada de *Babesia bovis*. Tesis de Licenciatura. UNAM Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan.

- Osorno, E.M.; 1978. Babesiosis en México. Estudio recapitulativo. *Vet. Mex.* 9: 203-216.
- Phillips, R.S.; 1970. Resistance of mice and rats to challenge by *B. rodhaini* after inoculation with irradiated celules infected with *B. rodhaini*. *Nature* (London) 227:1255.
- Phillips, R.S.; 1971. Immunity of rats and mice following injection with ^{60}Co irradiated *Babesia rodhaini* infected red cell. *Parasitol.* 62: 221.
- Potgieter, F.T. and Els, H.J.; 1977. Light and electron macroscopic observation on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymph and nonreplet females of *Boophilus decoloratus*. *Ondersteport J. Vet. Res.* 44: 213-232. En: Álvarez, M. y Cantó, G.J.; 1985. Epidemiología de la Babesiosis. En: Parasitología, vol. conmemorativo del 25 Aniv. de la *Soc. Mex. parasitol.* 1: 54-72.
- Purnell, R. W.; 1978. Vaccines against piroplasms. *Symp. Brit. Soc. Parasitol.* Vol. 18, *Blackwell Scientific Publication*, Oxford, U.K., 25-63.
- Quiroz, R.H.; 1994. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. 2ª ed. *Noriega editores.* 187-199.
- Riek, R.F.; 1964. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilbourne) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. Agric. res.* 15: 802-821.
- Ristic, M.; 1981. Babesiosis. En: Ristic, M. Y McIntyre, I. (eds.). *Diseases of cattle in the tropics.* *Martinus Nijhoff Publishers The Hage.* 443-468.
- Rojas, E.E., Figueroa, J.V., Vega, C.A., Ramos, J.A., Álvarez, J.A., Mosqueda, G.J.J., Cantó G.J. y Valencia, C.S.; 1995. Evaluación de un inmunógeno combinado de *B. bovis* y *B. bigemina*. I. Desafío de campo de bovinos inmunizados antes de su introducción a una zona endémica. *Vet. Méx.* 26(D2):27.
- Rodríguez, S.D., 1985. Immunochemical characterization of *Babesia bovis* clones. Ph D. Dissertation. *University of Missouri, Columbia.*
- Rodríguez, S.D., Buening, G.M. y Carson, C.A.; 1993. Caracterización bioquímica preliminar de *Babesia bovis* irradiadas con ^{60}Co . *Tec. Pec. Mex.* 31: 16-24.
- Rodríguez, S.D., Buening, G.M., Green, T.J., and Carson, C.A.; 1983. Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Inf. Immun.* 42: 15-18.
- Rodríguez, S.D.; 1991. Inmunoprofilaxis de la Babesiosis bovina. En: Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. *U.N.A.M. México, D.F.* 18-30
- Rogers, R.J., Dimmock, C.K., DE Vos, K.A.J., and Rodwell, B.J.; 1988. Bovine Leucosis virus contamination of a vaccine produced *in vivo* against bovine Babesiosis and Anaplasmosis. *Aust. Vet. J.* 65: 285-287.
- Rogers, R.J.; 1971. An evaluation of tick fever outbreaks in northern Queensland in recent years. *Aust. Vet. J.* 47. 415-417. Citado por: Álvarez, M. y Cantó, G.J.; 1985. Epidemiología de la babesiosis. En: Parasitología, vol. conmemorativo del 25 Aniv. de la *Soc. Mex. parasitol.* 1: 54-72.
- Rudzinska, M.A.; 1981. Morphologic aspects of Host-cell-parasite relationships in Babesiosis. En: Babesiosis. Ed. Ristic M. and Kreier J.P. *Academic Press Inc.* 445-457.
- Salas, T.E., García, G.J., Ramos, A.J., Rodríguez, R.E., Aboytes, T.R., Buening, G.M. y Vega, C.A.; 1988. Patogenia de una clona irradiada de *B. bovis* obtenida en cultivo *in vitro*. *Tec. Pec. Méx.* 26: 36-45.
- Schalm, W.O., Jain, C.N. and Carroll, E.J.; 1975. *Veterinary Hematology* 3ª edición. *Lea and Febiger.* 25-31,45-47.

- Shaetri, U.V.; 1986. Cerebral babesiosis in bovines in Masathaguada Region. Citado por: Álvarez, M. y Cantó, G.J.; 1985. Epidemiología de la babesiosis. En: Parasitología, vol. conmemorativo del 25 Aniv. de la *Soc. Mex. parasitol.* 1: 54-72.
- Smith, R.; 1980. Epidemiología de la Anaplasmosis y Babesiosis bovinas. Inter-American meeting of agricultural Sciences- O.A.S. II *Interamerican meeting of Directors of Animal Health, Redisa 2/4*. Citado por: Álvarez, M. y Cantó, G.J.; 1985. Epidemiología de la Babesiosis. En: Parasitología, vol. conmemorativo del 25 Aniv. de la *Soc. Mex. parasitol.* 1: 54-72.
- Smith, R.D.; 1978. Ciclo biológico de *Babesia* en la garrapata. En: Ciencia Veterinaria. Ed Moreno R. U.N.A.M., México D.F. 2: 233-264.
- Smith, R.D.; 1984. Epidemiology of Babesiosis. In: Malaria and Babesiosis, research findings.
- Smith, T. And Kilbourne, F.L.; 1893. Investigations to in the nature causation and prevention of Texas or southern cattle fever. U.S. Department of Agriculture, Bureau of animal. *Ind, Bull.* 1: 1-301.
- Solari, A.; 1983. Actividades desarrolladas en hematozoarios por el CIVET Miguel A. Rubino. En: Seminario perfil das Atividades Desemvolvidas contra o Carrapato dos Bovinos no nos países limitrofos do Cone Sul. *Anais. Porto alegre, R.S. Brasil.* 36.
- Todorovic, R.A. and Carson, C.A.; 1981. Methods for measuring the immunological response to *Babesia*. In: Babesiosis. Ristic, M. and Kreier J.P. *Academic Press.* 383-409.
- Todorovic, R.A. and Tellez, C.H.; 1975. The premunition of adult cattle against babesiosis and anaplasmosis in Colombia, South America. *Trop. Anim. Health Prod.* 7: 125-131.
- Uilenberg, G.; 1994. Significance of tick-borne hemoparasitic diseases to animal health in the tropics. En: FAO, 1994. Use of applicable biotechnological methods for diagnosing hemoparasites. FAO Roma. 188.
- Vega, C.A., Buening, G.M., Green, T.J. and Carson, C.A.; 1985. *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am. J. Vet. Res.* 46: 416-420.
- Vizcaino, A.O.G. y Urrego, M.G.; 1986. Inmunopatología de una vacuna experimental bivalente de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* irradiada con Cobalto 60. En: Congreso de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 15 resúmenes. Bucaramanga, Colombia. 10.
- Wright, I.G., Mahoney, D.F., Mirre, G.B., Goodger, B.V. and Kerr, J.D.; 1982. The irradiation of *Babesia bovis*. II- The immunogenicity of irradiated parasites for intact cattle and splenectomized calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 3: 591-601.
- Wright, I.G., Goodger, B.V. and Mahoney, D.F.; 1980. The irradiation of *Babesia bovis* 1. The difference in pathogenicity between irradiated and non-irradiated populations. *Z. Parasitenkd.* 63: 47.
- Wright, I.G., Goodger, B.V., McKenna, R.V. and Mahoney, D.F.; 1981. Virulent and avirulent strains of *Babesia bovis*: the relationship between parasite protease content and pathophysiological effect of strain. *J. Protozool.* 28(1): 118-120.
- Wright, I.G.; 1972. Studies on the pathogenesis of *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in splenectomized *Bos taurus* calves. *Res. Vet. Sci.* 15: 299-305.
- Wright, I.G.; 1973. Osmotic fragility of erythrocytes in acute *Babesia argentina* and *B. bigemina* infections in splenectomized *Bos taurus*. *Res. Vet. Sci.* 15: 299-305.
- Wright, I.G., Mirre, G.B., Mahoney, D. F. and Goodger, B.V.; 1983. Failure of *Boophilus microplus* to transmit irradiated *B. bovis*. *Res. Vet. Sci.* 34: 124-125.

Yunker, C.E., Kuttler, K.L. and Johnson, L.W.; 1987. Attenuation of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Vet. Parasitol.* 24: 7-13.

APÉNDICE I

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *B. bovis* Y *B. bigemina*.

PROCEDIMIENTO:

Antígeno utilizado: frotis de *B. bovis* con parasitemia superior al 10%.

- 1) Sacar laminillas (frotis) que contienen el antígeno que previamente fueron preparados y guardados en congelación a -70°C .
- 2) Se seca el antígeno al vacío durante 60 minutos y posteriormente se fija, utilizando acetona durante 30 min.
- 3) Se hacen diluciones de los sueros problema y controles positivo y negativo a 1:80 en solución amortiguadora de fosfatos (SAF).
- 4) Se dibujan de 10 a 12 círculos en la laminilla utilizando lápiz de tinta negra.
- 5) Sueros controles: POSITIVO, se coloca una gota del suero positivo en el primer círculo del extremo superior izquierdo de la laminilla. NEGATIVO, se coloca una gota del suero negativo en el primer círculo del extremo inferior de la laminilla.
- 6) Sueros problema: con una pipeta Pasteur se pone una gota del suero en su respectivo círculo.
- 7) Posteriormente se incuba la laminilla en la cámara húmeda durante 30 min. a 37°C .
- 8) Lavar con PBS dos veces en una caja Coplin con agitador magnético durante 5 min.
- 9) Secar laminillas frente a un ventilador.
- 10) Agregar conjugado en dilución 1:30 en una gota en cada círculo.
- 11) Incubar en una cámara húmeda 30 min.
- 12) Lavar dos veces con PBS en caja Copling con agitador magnético durante 5 min.

- 13) Lavar una sola vez con agua destilada en caja Copling con agitador magnético durante 5 min.
- 14) Secar las laminillas.
- 15) Colocar una gota de glicerina fosfatada en dilución 1:40 en cada círculo y cubrir con un cubreobjetos.
- 16) Observar en un microscopio de luz ultravioleta.

APENDICE 2

Datos de la temperatura rectal y volumen corpúscular aglomerado de la fase de vacunación

DIAS POS INOCULACIÓN

GRUPO 1 (Congelado 1×10^7)

No. Del @	0		5		6		7		8		9		10		11	
	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA
14	39,6	40,0	39,4	32,0	39,8	32,0	39,3	32,0	42,2	26,0	39,5	26,0	39,0	26,0	39,5	26,0
2	38,8	37,0	40,0	34,0	40,0	33,0	40,0	28,0	40,0	30,0	39,7	29,0	40,7	26,0	39,5	27,0
32	39,6	35,0	39,7	29,0	39,8	33,0	39,3	31,0	38,8	26,0	39,4	24,0	39,8	25,0	39,6	25,0
4	38,9	32,0	40,4	30,0	40,0	28,0	40,0	28,0	40,2	26,0	39,4	26,0	40,0	23,0	39,5	28,0
MEDIA	39,2	36,0	39,9	31,3	39,9	31,5	39,7	29,8	40,3	27,0	39,5	26,3	39,9	25,0	39,5	26,5
DESVEST	0,435	3,367	0,427	2,217	0,115	2,38	0,404	2,062	1,409	2	0,141	2,062	0,699	1,414	0,05	1,291

GRUPO 2 (Congelado 5×10^7)

31	39,6	38,0	39,8	35,0	39,5	32,0	39,4	26,0	40,0	28,0	39,6	29,0	40,0	27,0	40,0	25,0
7	38,8	32,0	39,8	26,0	39,8	23,0	39,2	25,0	40,1	25,0	39,2	22,0	39,8	22,0	40,7	24,0
13	39,0	32,0	38,9	30,0	39,7	28,0	39,4	23,0	39,3	29,0	39,8	26,0	40,0	25,0	39,5	28,0
10	39,2	37,0	39,0	35,0	40,1	33,0	38,7	29,0	39,0	31,0	39,0	29,0	38,9	33,0	39,6	30,0
MEDIA	39,2	34,8	39,4	31,5	39,8	29,0	39,2	25,8	39,6	28,3	39,4	26,5	39,7	26,8	40,0	26,8
DESVEST	0,342	3,202	0,492	4,359	0,25	4,546	0,33	2,5	0,535	2,5	0,365	3,317	0,525	4,646	0,545	2,754

GRUPO 3 (Congelado 1×10^6)

44	38,7	37,0	39,0	32,0	40,8	30,0	38,7	27,0	41,3	27,0	38,9	23,0	39,1	22,0	40,2	24,0
30	39,5	35,0	39,5	30,0	39,8	29,0	40,1	24,0	39,5	25,0	38,9	25,0	38,7	31,0	39,4	25,0
1	38,7	38,0	39,2	33,0	40,2	31,0	39,2	28,0	39,2	29,0	39,1	29,0	38,9	28,0	39,2	28,0
27	39,1	40,0	39,7	36,0	39,4	28,0	39,0	31,0	38,2	28,0	39,9	30,0	39,5	33,0	39,3	30,0
MEDIA	38,8	37,5	39,4	32,8	40,1	29,5	39,5	27,5	39,8	27,3	39,2	26,8	39,1	28,0	39,5	28,3
DESVEST	0,383	2,0817	0,3109	2,5	0,5972	1,291	0,4867	2,8868	1,01	1,7078	0,4761	3,304	0,3416	4,9686	0,457	2,63

GRUPO 4 (Congelado 5×10^6)

21	38,7	36,0	40,2	31,0	39,2	29,0	38,9	28,0	39,1	28,0	39,4	28,0	39,7	24,0	39,3	25,0
22	39,4	39,0	39,5	38,0	40,0	32,0	39,3	33,0	39,4	32,0	39,4	34,0	39,7	32,0	38,7	34,0
42	39,2	32,0	40,4	26,0	39,8	23,0	39,3	23,0	39,4	28,0	38,8	28,0	38,5	28,0	38,9	24,0
40	38,1	34,0	40,7	32,0	40,2	29,0	39,2	26,0	39,3	28,0	39,2	28,0	39,5	25,0	39,2	24,0
MEDIA	38,9	35,3	40,2	31,8	39,8	28,3	39,2	27,5	39,3	28,0	39,2	28,5	39,4	28,8	39,0	26,8
DESVEST	0,5802	2,9861	0,5099	4,9244	0,4435	3,7749	0,1893	4,2032	0,1414	2,6284	0,2828	3,7859	0,5745	3,594	0,275	4,8563

GRUPO 5 (Fresco 1×10^7)

26	40,0	34,0	40,1	29,0	40,5	31,0	38,6	29,0	39,3	28,0	38,8	21,0	38,4	25,0	39,8	21,0
24	39,2	34,0	39,2	30,0	40,5	31,0	39,2	27,0	38,8	28,0	39,0	31,0	39,0	25,0	39,5	27,0
45	39,9	37,0	40,0	30,0	39,7	29,0	40,3	25,0	38,8	28,0	40,0	27,0	39,3	27,0	40,0	26,0
23	39,9	32,0	40,0	28,0	39,7	23,0	39,0	21,0	39,1	28,0	39,3	28,0	39,0	25,0	39,4	25,0
MEDIA	39,8	34,3	39,8	29,3	40,1	28,8	39,3	26,8	39,0	27,8	39,3	28,3	38,9	25,5	39,6	24,8
DESVEST	0,3687	2,0616	0,4193	0,9574	0,4619	3,7859	0,7274	3,4157	0,2449	1	0,5252	4,113	0,3775	1	0,263	2,63

GRUPO 6 (Testigo GRNI 1×10^7)

11	39,7	36,0	40,1	36,0	39,8	33,0	39,3	31,0	39,1	32,0	39,9	30,0	39,5	29,0	39,6	31,0
9	39,4	39,0	39,8	40,0	39,4	36,0	39,3	32,0	39,3	31,0	39,2	34,0	39,2	34,0	39,9	37,0
33	39,2	38,0	39,5	31,0	39,5	29,0	39,4	27,0	39,1	27,0	39,2	28,0	39,8	30,0	39,2	28,0
39	38,1	43,0	39,3	34,0	38,7	39,0	39,2	34,0	39,5	35,0	38,8	42,0	38,8	41,0	39,0	39,0
MEDIA	39,1	39,0	39,7	35,3	39,4	34,3	39,3	31,0	39,3	31,3	39,3	33,5	39,3	33,5	39,4	33,8
DESVEST	0,698	2,944	0,35	3,775	0,465	4,272	0,082	2,944	0,191	3,304	0,457	6,191	0,427	5,447	0,403	5,123

Datos de la temperatura rectal y volumen corpúscular aglomerado de la fase de vacunación

DIAS POS INOCULACIÓN

GRUPO 1 (Congelado 1x10⁷)

No. Del @	12		13		20		22		29		37		54		86	
	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA
14	39,0	27,0	39,0	23,0	39,0	32,0	38,7	24,0	39,1	29,0	39,2	26,0	39,5	28,0	39,3	32,0
2	39,2	30,0	38,7	32,0	39,8	27,0	39,4	29,0	39,3	28,0	39,2	26,0	39,8	22,0	38,5	32,0
32	38,3	21,0	39,2	26,0	39,2	30,0	39,5	32,0	39,5	26,0	39,2	26,0	39,3	31,0	39,4	31,0
4	39,5	25,0	39,1	25,0	39,7	29,0	39,1	23,0	39,4	27,0	39,8	25,0	39,2	29,0	39,5	34,0
MEDIA	39,0	25,8	39,0	26,5	39,4	29,5	39,2	27,0	39,3	27,5	39,4	25,8	39,5	27,5	39,2	32,3
DESVEST	0,51	3,775	0,216	3,873	0,386	2,082	0,359	4,243	0,171	1,291	0,3	0,5	0,265	3,873	0,457	1,258

GRUPO 2 (Congelado 5x10⁷)

31	39,2	24,0	39,0	25,0	39,4	28,0	39,1	30,0	39,3	29,0	38,9	29,0	39,3	31,0	39,7	36,0
7	39,4	23,0	39,1	23,0	38,4	28,0	39,2	21,0	38,9	25,0	39,1	27,0	39,0	29,0	39,5	35,0
13	38,2	22,0	39,4	26,0	39,0	26,0	39,3	28,0	39,4	28,0	39,7	27,0	39,1	27,0	39,2	31,0
10	39,1	29,0	38,6	31,0	39,0	34,0	39,0	29,0	39,4	32,0	38,9	28,0	39,6	30,0	39,0	31,0
MEDIA	39,0	24,5	39,0	26,3	39,0	29,0	39,2	27,0	39,3	28,5	39,2	27,8	39,3	29,3	39,4	33,3
DESVEST	0,532	3,109	0,33	3,403	0,412	3,464	0,129	4,082	0,238	2,887	0,379	0,957	0,265	1,7078	0,311	2,63

GRUPO 3 (Congelado 1x10⁶)

44	38,7	22,0	38,4	23,0	38,8	29,0	39,0	24,0	38,6	29,0	38,8	29,0	38,3	27,0	38,4	31,0
30	39,2	30,0	39,5	28,0	38,4	26,0	38,9	27,0	39,2	27,0	40,2	29,0	38,8	27,0	38,4	33,0
1	39,0	29,0	39,6	30,0	39,1	30,0	38,5	31,0	39,3	28,0	39,5	29,0	38,9	29,0	39,2	32,0
27	38,5	29,0	38,6	31,0	39,3	29,0	39,0	29,0	39,0	29,0	38,9	37,0	39,1	35,0	38,8	36,0
MEDIA	38,9	27,8	39,0	27,5	38,9	28,5	38,9	27,8	39,3	28,3	38,6	31,0	39,0	29,5	39,5	33,0
DESVEST	0,3109	3,6968	0,6131	3,6968	0,3916	1,7321	0,238	2,8661	0,25	0,8574	0,5323	4	0,2217	3,78594	0,2517	2,16

GRUPO 4 (Congelado 5x10⁶)

21	38,7	28,0	38,9	25,0	39,1	30,0	38,9	28,0	39,2	30,0	39,3	28,0	39,4	30,0	39,5	35,0
22	38,4	32,0	38,5	35,0	39,2	37,0	38,8	41,0	39,5	28,0	39,2	42,0	39,3	26,0	39,3	31,0
42	38,9	28,0	38,5	25,0	39,0	27,0	39,0	28,0	39,0	28,0	39,4	26,0	39,6	30,0	39,4	36,0
40	38,7	24,0	38,7	28,0	39,0	30,0	38,8	29,0	39,6	35,0	38,5	30,0	39,1	29,0	39,7	28,0
MEDIA	38,7	27,8	38,7	28,3	39,1	31,0	38,9	30,5	39,3	30,3	38,1	31,5	39,4	28,8	39,5	32,5
DESVEST	0,2062	3,4641	0,1915	4,717	0,0957	4,2426	0,0957	7,1414	0,2754	3,304	0,4062	7,188	0,2062	1,89297	0,1708	3,697

GRUPO 5 (Fresco 1x10⁷)

28	38,9	28,0	38,5	27,0	39,8	28,0	39,3	31,0	39,2	29,0	39,0	31,0	39,4	30,0	39,5	35,0
24	39,0	29,0	39,5	28,0	38,8	28,0	39,4	26,0	39,2	30,0	39,3	30,0	39,3	28,0	39,3	31,0
45	39,2	29,0	38,4	28,0	39,7	28,0	39,3	28,0	38,8	30,0	39,0	31,0	39,6	30,0	39,4	36,0
23	39,0	25,0	38,8	21,0	39,2	26,0	38,9	26,0	38,9	27,0	38,8	26,0	39,1	29,0	39,7	28,0
MEDIA	39,0	27,3	38,8	25,0	39,4	27,0	39,2	27,8	39,0	29,0	39,0	29,5	39,4	28,8	39,5	32,5
DESVEST	0,1258	2,0618	0,4967	2,708	0,4846	1,1547	0,2217	2,3629	0,2062	1,4142	0,2062	2,3805	0,2082	1,89297	0,1708	3,697

GRUPO 6 (Testigo GRNI 1x10⁷)

11	39,8	28,0	39,0	30,0	40,1	27,0	39,7	31,0	39,7	28,0	39,8	31,0	39,7	31,0	39,5	34,0
9	38,8	31,0	38,8	29,0	39,6	37,0	39,3	36,0	39,1	38,0	39,0	30,0	39,3	31,0	39,5	33,0
33	39,5	27,0	39,3	30,0	39,6	28,0	39,4	30,0	39,4	29,0	39,9	28,0	39,5	29,0	39,7	30,0
39	38,5	34,0	38,4	34,0	39,0	45,0	39,2	32,0	39,1	36,0	39,2	39,0	39,1	35,0	39,5	30,0
MEDIA	39,2	30,0	38,9	30,8	39,6	34,3	39,4	32,3	39,3	32,8	39,4	32,0	39,4	31,5	39,6	31,8
DESVEST	0,603	3,162	0,377	2,217	0,45	8,461	0,216	2,63	0,287	4,992	0,403	4,83	0,258	2,5166	0,1	2,062

DIAS POS INTRODUCCIÓN AL POTRERO

Grupo 1 (Congelado 1x10⁷)

No. Del @	0		6		9		11		12		13		14		15	
	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA
14	38,7	31	39,7	29,0	39,0	29,0	38,9	33,0	38,6	30,0	38,7	31,0	38,0	32,0	38,5	35,0
2	39,2	35	39,6	31,0	39,0	30,0	38,5	39,0	39,0	34,0	39,0	35,0	39,0	33,0	39,0	26,0
32	39	32	39,2	35,0	38,6	29,0	39,0	31,0	38,9	29,0	39,0	32,0	38,7	25,0	39,8	29,0
4	38,7	28	39,2	28,0	39,0	31,0	39,0	36,0	39,0	29,0	38,7	28,0	39,5	26,0	40,1	25,0
MEDIA	38,9	31,5	39,4	30,8	38,9	29,8	38,9	34,8	38,9	30,8	38,9	31,6	39,1	29,0	39,4	28,8
DESVEST	0,2449	2,8868	0,263	3,0957	0,2	0,9574	0,238	3,5	0,1893	2,3805	0,1732	2,8868	0,3317	4,0825	0,7326	4,5

GRUPO 2 (Congelado 5x10⁷)

31	39,6	27	38,7	37,0	39,0	32,0	38,2	33,0	39,4	30,0	39,6	27,0	40,1	23,0	40,1	23,0
7	38,7	28	38,5	30,0	38,5	24,0	38,3	24,0	38,0	27,0	38,7	28,0	38,6	29,0	38,5	30,0
13	38,5	30	39,0	29,0	39,0	26,0	38,3	27,0	38,7	30,0	38,5	30,0	39,8	31,0	40,3	26,0
10	38,7	33	39,0	32,0	38,9	26,0	38,8	33,0	38,7	33,0	38,7	33,0	39,6	31,0	39,4	28,0
MEDIA	38,875	29,5	38,8	32,0	38,9	27,0	38,4	29,3	38,7	30,9	38,9	29,8	39,5	28,8	39,6	28,8
DESVEST	0,4924	2,6458	0,2449	3,559	0,238	3,4841	0,2708	4,5	0,5715	2,4495	0,4924	2,6458	0,65	3,7859	0,8139	2,9661

GRUPO 3 (GRNI 1x10⁶)

44	38,4	28	38,8	30,0	38,5	31,0	38,2	37,0	38,4	28,0	38,4	28,0	38,8	32,0	39,3	30,0
30	39,3	32	39,1	34,0	39,2	32,0	38,8	34,0	39,8	27,0	39,3	32,0	40,0	30,0	39,7	28,0
1	38,6	32	38,7	33,0	38,6	31,0	38,8	31,0	38,5	32,0	38,6	32,0	38,9	33,0	38,5	34,0
27	39,4	32	39,0	38,0	39,0	38,0	38,2	41,0	38,6	27,0	39,4	32,0	38,9	34,0	39,0	42,0
MEDIA	38,925	31	38,9	33,8	38,8	33,0	38,8	35,8	38,8	28,8	38,9	31,0	39,2	32,3	39,1	33,6
DESVEST	0,4992	2	0,1828	3,304	0,3304	3,3665	0,3484	4,272	0,6551	2,3805	0,4992	2	0,5688	1,7078	0,5058	6,1914

GRUPO 4 (Congelado 5x10⁶)

21	38,9	31	39,1	35,0	39,3	33,0	38,9	40,0	38,5	29,0	38,9	31,0	39,3	31,0	39,3	30,0
22	39	44	39,5	44,0	38,6	44,0	39,0	43,0	38,7	42,0	39,0	44,0	39,3	28,0	39,4	36,0
42	38,9	29	38,9	28,0	38,9	31,0	38,7	30,0	38,4	28,0	38,9	29,0	38,7	27,0	39,1	27,0
40	39,8	28	39,5	36,0	39,3	33,0	39,2	38,0	39,0	30,0	39,8	26,0	40,7	26,0	41,5	24,0
MEDIA	39,15	32,5	39,3	35,8	39,0	35,3	39,0	37,8	38,7	32,3	39,2	32,5	39,5	28,0	39,8	29,3
DESVEST	0,4359	7,9373	0,3	6,5511	0,3403	5,909	0,2082	5,5603	0,2846	6,5511	0,4359	7,9373	0,8485	2,1602	1,1238	5,1235

GRUPO 5 (Fresco 1x10⁷)

28	38,3	31	38,9	37,0	38,4	35,0	38,2	28,0	38,2	32,0	38,3	31,0	38,7	35,0	38,4	36,0
24	40,8	30	39,4	37,0	39,0	36,0	39,0	30,0	39,4	29,0	40,8	30,0	40,5	31,0	40,5	25,0
45	38,9	30	39,3	39,0	39,3	35,0	38,6	38,0	38,8	31,0	38,9	30,0	39,1	33,0	38,8	36,0
23	38,9	24	39,1	30,0	39,0	30,0	38,9	34,0	38,8	27,0	38,9	24,0	39,3	22,0	39,1	26,0
MEDIA	39,225	28,75	39,2	35,8	38,9	34,5	38,7	32,0	38,8	29,8	39,2	28,8	39,4	30,3	39,2	30,8
DESVEST	1,0874	3,2018	0,2217	3,9476	0,3775	3,3166	0,3594	3,6515	0,4899	2,2174	1,0874	3,2018	0,7746	5,7373	0,9129	6,0759

GRUPO 6 (Testigo GRNI 1x10⁷)

11	40,2	27	39,7	35,0	39,2	32,0	39,0	33,0	39,9	31,0	40,2	27,0	40,6	28,0	41,2	26,0
9	41,1	29	39,2	36,0	39,0	35,0	40,4	32,0	40,9	30,0	41,1	29,0	40,9	32,0	41,2	26,0
33	39,9	28	39,6	32,0	38,9	34,0	39,6	30,0	39,3	30,0	39,9	28,0	40,7	25,0	41,2	23,0
39	40	27	39,0	38,0	38,7	44,0	38,8	39,0	40,6	29,0	40,0	27,0	40,6	28,0	39,7	26,0
MEDIA	40,3	27,25	39,4	36,3	39,0	38,3	39,8	33,5	40,2	30,0	40,3	27,3	40,7	28,3	40,8	25,3
DESVEST	0,5477	1,2583	0,3304	2,5	0,2082	5,3151	0,7188	3,673	0,7182	0,8165	0,5477	1,2583	0,1414	2,8723	0,75	1,5

Datos de temperatura rectal y volumen corpúscular aglomerado de fase de confrontación

DIAS POS INTRODUCCIÓN AL POTRERO

GRUPO 1 (Congelado 1x10⁷)

No. Del	16		17		18		19		20		21		22		23	
	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA
14	39,6	27,0	39,5	25,0	39,4	25,0	39,8	25,0	39,1	27,0	38,9	23,0	38,5	30,0	38,5	29,0
2	39,9	25,0	39,2	27,0	39,1	28,0	38,7	25,0	38,6	25,0	38,9	25,0	38,6	28,0	38,7	28,0
32	40,5	22,0	41,5	23,0	41,2	18,0	40,8	18,0	39,7	18,0	38,9	18,0	38,2	16,0	39,0	19,0
4	41,2	28,0	39,8	24,0	38,7	24,0	39,0	27,0	38,5	28,0	38,5	28,0	38,5	24,0	38,6	25,0
MEDIA	40,3	25,0	40,0	24,8	39,6	23,3	39,6	23,3	39,0	24,0	38,8	23,0	38,5	24,0	38,7	24,8
DESVEST	0,7071	2,1602	1,0298	1,7078	1,1045	3,594	0,9394	4,9244	0,55	5,4772	0,2	3,559	0,1732	5,8878	0,216	4,1932

GRUPO 2 (Congelado 5x10⁷)

31	39,5	22,0	38,9	27,0	38,8	24,0	38,5	28,0	38,5	27,0	38,7	28,0	38,7	28,0	39,2	28,0
7	40,6	30,0	39,6	27,0	40,0	28,0	40,5	28,0	39,9	22,0	39,0	21,0	38,8	23,0	38,5	28,0
13	41,4	28,0	41,4	24,0	40,5	24,0	40,8	20,0	39,5	18,0	38,3	18,0	38,3	20,0	38,6	21,0
10	39,4	28,0	39,0	21,0	39,0	28,0	39,5	27,0	39,2	24,0	39,0	28,0	39,1	28,0	38,8	27,0
MEDIA	40,2	28,0	39,7	24,8	39,8	25,8	39,8	24,8	39,3	22,3	38,8	22,8	38,7	24,3	38,8	28,8
DESVEST	0,9535	3,266	1,1587	2,8723	0,877	1,0149	1,0436	3,2016	0,5909	4,6458	0,3317	5,3774	0,3304	3,5	0,3086	3,1091

GRUPO 3 (GRNI 1x10⁸)

44	39,1	29,0	39,9	28,0	39,5	28,0	39,0	23,0	38,5	28,0	39,0	28,0	40,1	32,0	38,6	29,0
30	40,4	25,0	40,4	31,0	38,8	22,0	38,9	22,0	39,0	25,0	38,7	24,0	38,7	25,0	39,3	21,0
1	39,1	30,0	39,6	27,0	39,7	28,0	39,7	25,0	38,5	23,0	38,6	21,0	38,2	23,0	38,6	23,0
27	39,3	31,0	40,3	32,0	39,6	31,0	39,0	30,0	38,5	33,0	38,7	35,0	38,2	34,0	39,3	37,0
MEDIA	39,5	28,8	40,1	29,5	39,4	28,8	39,2	25,0	38,6	27,3	38,8	27,0	38,8	28,8	39,0	27,8
DESVEST	0,6238	2,63	0,3687	2,3805	0,4082	3,7749	0,3687	3,559	0,25	4,3493	0,1732	6,0553	0,8981	5,3229	0,4041	7,188

GRUPO 4 (Congelado 5x10⁸)

21	38,3	29,0	39,6	25,0	39,0	24,0	38,5	28,0	39,0	31,0	39,2	30,0	38,8	29,0	38,8	23,0
22	38,3	30,0	39,0	33,0	38,5	35,0	38,4	38,0	38,5	35,0	38,7	31,0	39,3	38,0	39,5	36,0
42	38,9	22,0	40,0	28,0	41,0	23,0	41,7	21,0	41,3	18,0	40,9	14,0	RIP			
40	40,9	23,0	41,0	19,0	40,6	18,0	39,5	18,0	RIP							
MEDIA	39,6	28,9	39,9	25,8	39,8	25,9	39,6	25,8	39,6	28,0	39,6	25,0	39,1	33,5	39,2	29,5
DESVEST	0,8889	4,0825	0,8408	5,7373	1,2121	7,1647	1,5327	9,535	1,4933	8,8882	1,1533	9,5394	0,3536	6,384	0,495	9,1824

GRUPO 5 (Fresco 1x10⁷)

28	38,2	35,0	39,5	34,0	39,3	27,0	39,1	31,0	38,7	32,0	38,5	28,0	38,7	28,0	38,7	28,0
24	41,0	21,0	39,2	34,0	38,5	18,0	38,8	23,0	38,5	25,0	38,7	23,0	38,5	25,0	38,6	25,0
45	38,8	37,0	38,9	18,0	39,0	33,0	39,1	32,0	39,1	28,0	38,8	28,0	39,0	32,0	39,5	28,0
23	39,2	24,0	39,2	22,0	40,2	21,0	40,3	24,0	39,5	20,0	38,6	21,0	38,8	21,0	38,7	21,0
MEDIA	39,3	29,3	39,2	27,0	39,3	24,8	39,3	27,5	39,0	25,8	38,7	24,5	38,8	28,5	38,9	25,8
DESVEST	1,2055	7,932	0,2449	8,2462	0,7141	6,8521	0,8852	4,8547	0,4435	4,9244	0,1291	3,1091	0,2082	4,6547	0,4193	3,3166

GRUPO 6 (Testigo GRNI 1x10⁷)

11	41,5	24,0	41,3	18,0	41,0	14,0	RIP									
9	40,7	22,0	39,3	17,0	RIP											
33	40,3	23,0	40,5	20,0	RIP											
39	40,5	23,0	41,3	23,0	40,7	18,0	40,3	17,0	39,7	14,0	RIP					
MEDIA	40,8	23,0	40,6	19,5	40,9	18,0	40,3	17,0	39,7	14,0						
DESVEST	0,528	0,8165	0,9452	2,8458	0,2121	2,8284										

Datos de temperatura rectal y volumen corpuscular aglomerado de fase de confrontación

DIAS POS INTRODUCCIÓN AL POTRERO

Grupo 1 (Congelado 1x10⁷)

No. Del @	24		25		26		27		28		30		31		34		39	
	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA	TEMP	VCA
14	38,4	28,0	38,9	30,0	39,1	24,0	39,0	25,0	38,8	26,0	38,6	23,0	38,8	27,0	38,8	24	38,9	28
2	39,0	28,0	39,9	22,0	38,6	25,0	38,4	16,0	38,8	20,0	38,6	21,0	38,8	26,0	38,9	25	39	26
32	38,7	24,0	38,8	21,0	39,1	20,0	38,4	16,0	38,6	22,0	38,9	25,0	38,9	26,0	38,8	20	38,8	22
4	38,9	30,0	39,3	26,0	39,1	26,0	38,8	24,0	38,8	27,0	38,7	26,0	38,5	25,0	38,7	28	38,9	27
MEDIA	38,8	27,0	39,2	24,8	39,0	23,8	39	20,3	38,7	23,8	38,7	23,8	38,8	26,0	38,8	23,8	38,9	28,8
DESVEST	0,265	2,582	0,4092	4,113	0,25	2,63	0,3	4,9244	0,1155	3,304	0,141421	2,2174	0,1732	0,8165	0,0616	2,63	0,0616	2,2174

GRUPO 2 (Congelado 5x10⁷)

31	38,3	22,0	38,8	20,0	38,7	23,0	38,8	22,0	39,3	21,0	38,7	23,0	38,9	23,0	38,8	24	38,7	25
7	38,5	25,0	38,8	24,0	39,3	20,0	38,9	20,0	39,0	20,0	38,5	18,0	38,7	21,0	38,3	22	38,7	22
13	38,4	22,0	38,8	23,0	39,3	23,0	38,8	22,0	38,4	24,0	39,1	22,0	39,5	21,0	38,2	23	38,6	24
10	38,9	28,0	39,0	20,0	39,2	25,0	38,8	25,0	39,0	25,0	38,9	28,0	38,9	26,0	38,5	25	38,7	25
MEDIA	38,5	24,3	38,9	21,8	39,1	22,8	38,8	22,3	38,9	22,5	39	22,8	39,0	22,8	38,5	23,6	38,7	24,0
DESVEST	0,263	2,8723	0,1	2,0616	0,2872	2,0616	0,05	2,0616	0,3775	2,3805	0,258199	4,113	0,3464	2,3629	0,2846	1,291	0,05	1,4142

GRUPO 3 (GRNI 1X10⁶)

44	38,3	33,0	38,2	29,0	39,6	22,0	38,7	25,0	38,5	24,0	38,5	23,0	38,9	26,0	38,6	24	38,8	25
30	38,6	22,0	38,8	22,0	38,5	25,0	39,1	22,0	38,7	21,0	38,6	24,0	38,6	25,0	39,1	22	39,1	22
1	38,4	24,0	38,3	23,0	38,8	22,0	38,6	23,0	38,9	23,0	38,5	22,0	38,5	23,0	38,6	22	38,8	23
27	39,3	32,0	38,7	29,0	37,7	30,0	38,6	32,0	38,9	31,0	38,6	29,0	38,7	34,0	38,6	26	38,9	26
MEDIA	38,7	27,8	38,5	28,8	38,7	24,8	38,8	25,6	38,8	24,6	38,6	24,5	38,7	27,0	38,7	23,6	38,9	24,0
DESVEST	0,4509	5,5903	0,2944	3,7749	0,7883	3,7749	0,238	4,5092	0,1915	4,3493	0,057735	3,1091	0,1708	4,830	0,250	1,915	0,141	1,826

GRUPO 4 (Congelado 5x10⁶)

21	38,8	29,0	39,0	29,0	39,0	25,0	39,1	27,0	38,8	28,0	39,5	21,0	38,8	23,0	38,6	25	39,3	26
22	38,8	32,0	38,5	33,0	39,3	26,0	38,8	34,0	39	32,0	39,0	30,0	38,9	38,0	38,5	27	38,9	28
42																		
40																		
MEDIA	38,8	30,5	38,8	31,0	39,2	25,5	39,0	30,5	38,9	30,0	39,3	25,5	38,9	30,5	38,6	26,0	39,1	27,0
DESVEST	0	2,1213	0,3536	2,8284	0,2121	0,7071	0,2121	4,9497	0,1414	2,8284	0,383553	6,364	0,0707	10,607	0,0707	1,4142	0,2826	1,4142

GRUPO 5 (Fresco 1x10⁷)

26	38,6	27,0	38,7	27,0	38,6	23,0	38,7	27,0	38,8	24,0	38,7	25,0	38,4	26,0	38,7	26	38,6	28
24	38,3	24,0	38,8	28,0	38,5	23,0	38,7	20,0	39,0	21,0	39	25,0	38,2	23,0	38,8	20	38,9	21
45	39,9	26,0	40,4	24,0	39,5	28,0	38,7	25,0	38,3	26,0	38,8	27,0	38,7	27,0	38,7	25	38,4	25
23	38,5	24,0	38,6	28,0	38,8	24,0	38,8	24,0	39,1	24,0	38,3	18,0	38,7	20,0	38,7	24	38,4	24
MEDIA	38,8	25,3	39,1	28,8	38,9	24,0	38,7	24,0	38,8	23,8	38,7	23,8	38,5	24,0	38,7	23,8	38,6	24,0
DESVEST	0,7274	1,5	0,8539	1,893	0,4508	1,4142	0,05	2,9439	0,3559	2,0616	0,294362	3,9476	0,2449	3,1623	0,05	2,63	0,2363	2,1602

GRUPO 6 (Testigo GRNI 1x10⁷)

11																		
9																		
33																		
39																		
MEDIA																		
DESVEST																		

APENDICE 2

TITULOS DE ANTICUERPOS PROMEDIO POR CADA GRUPO
OBTENIDOS POR LA PRUEBA SEROLÓGICA DE IFI

DIAS	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
0	0	0	0	0	0	0
13	0	160	120	200	160	200
22	0	400	400	480	240	350
37	0	640	300	800	480	560
72	0	430	180	440	440	400
94	0	560	390	400	440	160
10 (0)	0	520	560	520	300	880
6	0	520	560	520	300	880
12	40	360	720	640	560	720
19	2986,6	1920	1280	1760	640	853
25	5973,3	3840	7040	4560	3840	5973,3
36	8533,3	6400	10240	10240	6400	6823,6
39	8533,3	5120	5760	6400	4480	8533,3