

+

Protección contra babesiosis bovina con una vacuna mixta de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro* bajo una confrontación de campo. Inmunización en un área libre de la enfermedad

Protection against bovine babesiosis with a mixed *in vitro* culture-derived *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* vaccine under field challenge. Immunization in a disease-free area

Germinal Jorge Cantó Alarcón*,**
Jesús Antonio Álvarez Martínez***
Edmundo Enrique Rojas Ramírez***
Juan Alberto Ramos Aragón***
Juan Joel Mosqueda Gualito***
Carlos Agustín Vega y Murguía***
Julio Vicente Figueroa Millán***

Abstract

In Mexico, there is an attenuated live vaccine against bovine babesiosis that has been shown to confer protection to susceptible cattle immunized and challenged under controlled conditions. Immunized cattle survive a challenge using known numbers of virulent parasites of both *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. However, stress-inducing field situations such as transportation or tick-transmitted infection have not been taken into account. The objective of this study was to evaluate the protective capacity of the combined vaccine in cattle immunized in a tick-free area and then transported to an endemic area. Ten, 18 month old, susceptible Charolais steers were divided into two groups: one group was immunized with 1×10^7 erythrocytes infected with *in vitro* culture-derived *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* parasites; while the second group was immunized with uninfected bovine erythrocytes. Two months later, both groups were transferred to a bovine babesiosis endemic area and allocated in a corral infested with *Babesia*-infected *Boophilus microplus* ticks. Animals remained there for the rest of the experiment and never received ixodicide treatment. Eighteen days post-allocation, all five control animals presented with severe clinical signs characteristic of acute bovine babesiosis, including a rectal temperature (RT) greater than 40.5°C for several days and a decreased packed cell volume (PCV) of 48%. Both protozoan species were found in blood smears and all animals in the control group had to be treated in order to avoid their demise. The immunized cattle also presented both *Babesia* species in peripheral blood samples, increased RT and a 37% PCV reduction, but remained in good corporal condition

Recibido el 26 de enero de 2003 y aceptado el 5 de junio de 2003.

* Centro Nacional de Investigaciones en Fisiología y Mejoramiento Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, km 1, Carretera a Colón, Ajuchitlán, Querétaro, México.

** Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Querétaro, 16 de Septiembre 63, Oriente, 76000, Querétaro, Querétaro, México.

*** Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Km 11.5, Carretera federal Cuernavaca-Cuatla, 62550, Jiutepec, Morelos, México.

and did not require treatment. This study shows the protective capacity conferred to cattle by the combined vaccine when immunized in a Babesia-free area and then transported to an endemic area.

Key words: BABESIA BOVIS, BABESIA BIGEMINA, IMMUNIZATION.

Resumen

En México existe un inmunógeno atenuado contra Babesia bovis y Babesia bigemina, que ha conferido protección a bovinos susceptibles en condiciones controladas. Los bovinos inmunizados con el inmunógeno combinado sobreviven el desafío con dosis conocidas de parásitos virulentos de ambas especies. Sin embargo, las situaciones reales de campo que inducen estrés, como el traslado o la infección transmitida por garrapatas, no se han considerado. El propósito de este trabajo fue evaluar la capacidad inmunoprotectora del inmunógeno atenuado en bovinos inmunizados en una zona libre de Babesia y garrapatas, y movilizarlos a una zona endémica de babesiosis bovina. Diez bovinos de raza Charolais, machos, de 18 meses de edad, se dividieron en dos grupos: Un grupo fue inmunizado con una dosis de 1×10^7 eritrocitos infectados (Ei) con Babesia bovis y Babesia bigemina; el segundo grupo fue inmunizado con eritrocitos no infectados. Dos meses después todos los animales se trasladaron a un potrero localizado en una zona endémica, e infestado con garrapatas Boophilus infectadas con ambas especies de Babesia. Aquí permanecieron durante todo el tiempo que duró el experimento y nunca recibieron tratamiento ixodocida. Dieciocho días después del inicio de la confrontación (PC), los cinco animales del grupo testigo presentaron signos clínicos severos de la enfermedad aguda; en los frotis sanguíneos se encontraron ambas especies del hemoparásito, temperatura rectal (TR) superior a los 40.5°C por varios días y descenso del volumen celular aglomerado (VCA) del 48%, por lo que todos los animales de este grupo tuvieron que ser tratados para evitar su muerte. Los bovinos del grupo inmunizado, aunque también presentaron ambas especies del parásito en sangre periférica, TR elevada y descenso de 37% en el VCA, mantuvieron buena condición corporal y no requirieron tratamiento. Este trabajo demuestra la capacidad de protección conferida por el inmunógeno combinado en bovinos vacunados en una zona libre de garrapatas y movilizados a una zona endémica de babesiosis.

Palabras clave: BABESIA BOVIS, BABESIA BIGEMINA, INMUNIZACIÓN.

Introduction

The ability of susceptible cattle to develop strong immunity against future reinfections following infection with Babesia protozoa has been known since the end of the 19th Century.¹ This fact originated the Australian practice of infecting animals free of the disease with blood from cattle that had recuperated from the illness, later providing a specific treatment to avoid their death.² Callow and Mellors³ fine-tuned the process and standardized the number of parasites that needed to be inoculated, obtaining parasites from splenectomized calves, rather than simple protozoan carriers. This method has been applied successfully in various parts of the world.^{4,6} However, a serious disadvantage to this procedure is that the reproduction of Babesia species in calves could contaminate the immunogens with other pathogens, thus disseminating these in other areas.⁷ This risk is eliminated by multiplying the parasite populations in vitro.^{8,9}

The development of in vitro Babesia spp cultures^{8,9}

Introducción

Desde finales del siglo XIX se sabe que los bovinos susceptibles, después de sufrir la infección de protozoarios del género Babesia, son capaces de desarrollar fuerte inmunidad contra futuras reinfecciones.¹ Este hecho dio origen en Australia a la práctica de infectar animales libres de la enfermedad con sangre de bovinos que se habían recuperado de ésta, para aplicar posteriormente un tratamiento específico y evitar su muerte.² Callow y Mellors³ afinaron el proceso y estandarizaron el número de parásitos a inocular, utilizando becerros esplenectomizados como los proveedores de los parásitos, en lugar de simples portadores del protozoario. Esta metodología se ha aplicado con buenos resultados en diversas partes del mundo;^{4,6} sin embargo, una seria desventaja de este procedimiento es que al reproducir las especies de Babesia en becerros, los inmunógenos podrían llegar a contaminarse con otros patógenos y producir su diseminación a otras áreas.⁷ Este riesgo es eliminado mediante la multiplicación de poblaciones del parásito en condiciones in vitro.^{8,9}

has allowed and facilitated the molecular study of the genes that encode parasitic proteins that are potentially protective^{10,11} for their use as vaccines. Vaccines made up of soluble parasitic antigens (SPA) liberated in vivo or in vitro into the plasma of the animal or into the in vitro culture supernatant, have proved their immunoprotective capability in all Babesia species that have been studied to date.¹²⁻¹⁴ However, even though they induce adequate protection in animals against a homologous challenge, this is not the same as what occurs when vaccinated animals are confronted with a heterologous population.¹⁵ When using recombinant proteins as vaccines, multiple studies have been carried out in which results range from null protection¹⁶ and immune responses in animals that are highly variable,¹⁷ to an adequate reduction in parasitemia following vaccination and challenge.^{17,18} Despite the great advances in the last few years there is still no molecular-type commercial biological product against bovine babesiosis, such that it is imperative to continue studies in live populations with low pathogenicity.

In Mexico there are no specific prevention procedures against bovine babesiosis, even though there is a *B. bovis* clone and a *B. bigemina* strain that have proved to be of reduced virulence yet capable of generating sufficient immune response for the animal to resist confrontation against heterologous strains under con-

El desarrollo del cultivo in vitro de *Babesia* spp^{8,9} ha permitido y facilitado el estudio molecular de los genes codificadores de proteínas parasitarias potencialmente protectoras^{10,11} para su uso como vacunas. Las vacunas constituidas por antígenos parasitarios solubles (APS) liberados in vivo o in vitro, en el plasma del animal o en el sobrenadante de cultivo in vitro, han probado su poder inmunoprotector contra todas las especies de *Babesia* hasta ahora estudiadas;¹²⁻¹⁴ sin embargo, aunque inducen una protección adecuada en los animales en contra de un desafío homólogo, esto no es igual cuando los animales vacunados son confrontados con una población heteróloga.¹⁵ En cuanto al uso de proteínas recombinantes como vacuna, se han realizado múltiples estudios con resultados que van de nula protección,¹⁶ respuestas inmunes con alta variación en los animales,¹⁷ hasta una adecuada reducción en las parasitemias posterior a la vacunación y desafío.^{17,18} A pesar de los grandes avances en los últimos años no se ha producido ningún biológico comercial de tipo molecular contra la babesiosis bovina, por lo que es importante continuar los estudios con poblaciones vivas de baja patogenicidad.

En México no se cuenta con procedimientos específicos de prevención contra la babesiosis bovina, aun cuando existe la disponibilidad de una clona de *B. bovis* y una cepa de *B. bigemina*, que han mostrado ser de reducida virulencia y capaces de generar una respuesta inmune suficiente como para resistir la confrontación con cepas

Cuadro 1
VALORES PROMEDIO OBTENIDOS EN LAS DIFERENTES VARIABLES REGISTRADAS DE LOS DOS GRUPOS EXPERIMENTALES DURANTE LA INMUNIZACIÓN EN ZONA LIBRE Y CONFRONTACIÓN EN ZONA ENDÉMICA DE BABESIOSIS
AVERAGE VALUES OBTAINED IN THE VARIOUS VARIABLES MEASURED IN TWO EXPERIMENTAL GROUPS DURING IMMUNIZATION IN A DISEASE-FREE ZONE AND FIELD CHALLENGE IN AN AREA ENDEMIC FOR BABESIOSIS

Variable/Group	Inmunized	Control	Immunized challenged	Control challenged
Animals per group	5	5	5	5
Incubation period (days)	5 ± 0.2	-	14 ± 3.8	11 ± 1.4
Maximum temperature (°C)	40.4 ± 0.7	39.7 ± 0.2	40.2 ± 0.8	41 ± 0.6
Temperature > 39.5°C (days)	6.8 ± 1.8	3.6 ± 1.2	6.6 ± 3.1	10 ± 2.8
Maximum PCV* decrease (%)	33.4 ± 8.8	19.3 ± 4.9	37.3 ± 7.5	47.9 ± 7.7
Animals positive for <i>B. bigemina</i> **	5	0	5	5
Animals positive for <i>B. bovis</i> **	4	0	4	5
<i>B. bigemina</i> parasitemia (days)	1.4 ± 0.5	0	4.2 ± 1.1	5.6 ± 3.5
<i>B. bovis</i> parasitemia (days)	1.4 ± 0.5	0	3.4 ± 2.7	6.8 ± 1.7
Chemotherapy (No. of animals)	0	0	0	5

*PCV = Packed cell volume

**Blood smears

trolled conditions, be they individually^{19,20} or in combined fashion.^{21,22}

Since these studies are always carried out under controlled conditions in confinement, with known challenge doses and without tick-induced stress or adverse environmental conditions for the animals, it would be convenient to know the possible utility of these immunogens in a tick-induced challenge under field conditions.

Material and methods

Two in vitro culture-derived *Babesia* populations, the BOR *B. bovis* clone⁸ and the BIS *B. bigemina* strain,⁹ were used. Ten, greater than 18-month-old, susceptible Charolais steers from a tick-free area in the state of Sonora were used.

Two groups of five randomly selected cattle were housed at the "GB" ranch, located in the El Marques municipality, in the state of Queretaro, Mexico, located at 20° 09' North latitude and 100° 09' West longitude, and with a primarily semi-dry temperate climate and 547 mm of annual rainfall. The first group received an intramuscular inoculation of the combined BOR clone and BIS strain at a dose of 1×10^7 infected erythrocytes per species. The second group, the control, received a dose of 2×10^7 non-infected erythrocytes via the same route.

Rectal temperature (RT) was recorded daily and blood samples were collected for packed cell volume (PCV) determination using a microhematocrit, as well as for determination of percentage of parasitized erythrocytes (PPE) using a Giemsa-stained blood smear. RT and PVC values were statistically analyzed as repeated measures, using a divided parcel model, where the large parcel was represented by the animal within the treatment. Blood for indirect immunofluorescence (IIF) techniques for measuring the kinetics of the antibodies against the protozoa, using *B. bovis* as the antigen and cattle anti-IgG as the conjugate, was collected by jugular venipuncture on the day of immunization and every two days after that until the end of the immunization period (14 days), and then from the first day of the challenge (day 74). This blood was collected in plain vacuum tubes and serum was conserved at -20°C until use.

Seventy days after the immunization (p.i.), animals were transported to a corral that was infested with *Boophilus* ticks, located in the "La Posta" experimental field, in Paso del Toro, in the state of Veracruz, Mexico, whose exact location was 15°50' North latitude and 96°10' West longitude, with a subtropical humid climate and 1 321 mm of annual rainfall. Animals were exposed to tick infestation during the rest of the study period, and no acaricide treatment was applied.

heterólogas en condiciones controladas en forma individual^{19,20} o combinadas.^{21,22}

Debido a que estos estudios siempre se han realizado bajo condiciones controladas de confinamiento, con dosis de confrontación conocidas y sin ningún tipo de estrés, producido por garrapatas o por condiciones ambientales adversas para los animales, resulta conveniente conocer la posible utilidad de los inmunógenos a una confrontación producida por garrapatas en condiciones naturales.

Material y métodos

Se utilizaron dos poblaciones de *Babesia* derivadas de cultivo in vitro: la clona BOR de *B. bovis*⁸ y la cepa BIS de *B. Bigemina*.⁹ Como animales experimentales se usaron diez bovinos de la raza Charolais, machos, con edad superior a los 18 meses, provenientes de una zona libre de garrapatas del género *Boophilus* de Sonora.

En el rancho "GB", en el municipio de El Marqués, Querétaro, México, entre los 20° 09' latitud Norte y los 100° 09' longitud Oeste, con clima preponderante templado semi-seco y con precipitación anual de 547 mm, se formaron en forma aleatoria dos grupos de cinco bovinos cada uno. El primer grupo recibió vía IM un inóculo combinado de la clona BOR y la cepa BIS a dosis de 1×10^7 Ei de cada especie. El segundo grupo permaneció como testigo a la infección y recibió una dosis de 2×10^7 eritrocitos no infectados por la misma vía.

Diariamente se registró la TR y se colectaron muestras de sangre periférica para la determinación del VCA por el método de microhematócrito y el porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) mediante frotis sanguíneos teñidos con colorante de Giemsa. Los valores de TR y VCA se analizaron estadísticamente como mediciones repetidas, utilizando un modelo de parcelas divididas donde la parcela grande está representada por el animal dentro del tratamiento. Para medir la cinética de anticuerpos contra el protozoario mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI),²³ utilizando *B. bovis* como antígeno y conjugado anti-IgG de bovino, el día de la inmunización y cada dos días hasta el término del periodo de inmunización (14 días) y posteriormente a partir del día de la confrontación (día 74), se obtuvo sangre por punción yugular con tubos al vacío sin anticoagulante; el suero resultante se conservó en congelación a -20°C hasta el momento de su uso.

Sesenta días después de la inmunización (PI), los animales fueron transportados a un potrero, infestado por garrapatas *Boophilus*, situado en el campo experimental "La Posta", en Paso del Toro, Veracruz, México, situado a los 15° 50' de latitud Norte y 96° 10' latitud Oeste, con clima subtropical húmedo y precipitación anual de 1 321 mm, donde los animales se expusieron libremente a la infestación por garrapatas

So as to avoid the death of the animals if at all possible, it was determined that any animal that would evolve to the point of death without receiving any treatment, would be counted as if dead once the following criteria had been met: temperature greater than 40.5°C for three consecutive days; a PCV decrease greater than 40%; as well as anorexia, loss of body condition, prostration, hemoglobinuria, lack of coordination and ataxia.

Results

At the time of immunization *B. bovis* was found in the blood smears of four of the animals, while *B. bigemina* was found in that of the five immunized cattle. The cattle that received the mixed inoculum had fevers of up to 40.4°C by day eight p.i. (Table 1). The mean percentage decrease of PCV was 34 in immunized animals and 19 in control animals, when compared to the basal values. The PPE was less than 0.01% in all cases and lasted, on average, 1.4 days for both species of hemoparasite (Table 1). By day 14 p.i., the animals showed serology titers of, on average, 1:3 700, with a decrease in these values to an average of 1:448 by the day they were transported to the Paso de Toro pasture in Veracruz (Figure 1).

Blood smears showed all cattle to be infected with both species of protozoan (< 1%), thus proving that the challenge was adequate. The RT in both groups of animals increased above 40°C, on one occasion for the vaccinated group, and for six consecutive days for the control group, though this was not significant ($P > 0.05$). Control group animals showed the increase from day ten p.i., and values were 1.8°C greater, on average, than the individual values at the moment of challenge. In the vaccinated group, the average increase was of

durante todo el estudio, sin que se les aplicara tratamiento acaricida.

Con el propósito de evitar la muerte de los animales cuando eso fuese posible, se determinó que un animal que evolucionara hacia la muerte de no recibir ninguna intervención, al llenar ciertos requisitos se consideraría muerto. Fiebre por arriba de los 40.5°C durante tres días consecutivos y descenso del VCA superior a 40%; además, debería de presentar: anorexia, enflaquecimiento, prostración, hemoglobinuria e incoordinación y ataxia.

Resultados

En la inmunización se observó en frotis sanguíneos presencia de *B. bovis* en cuatro de los animales y *B. bigemina* en los cinco bovinos inmunizados; los bovinos que recibieron el inóculo mixto presentaron fiebre de hasta 40.4°C para el día ocho PI (Cuadro 1). El porcentaje promedio del VCA sufrió un decremento de 34 puntos en los animales inmunizados y de 19 puntos en los animales testigo con respecto al valor basal; el PEP fue < 0.01% en todos los casos y tuvo un promedio de duración de 1.4 días con ambas especies del hemoparásito (Cuadro 1). Para el día 14 PI los animales seroconvirtieron con un título promedio de 1:3 700; se observó disminución en los títulos promedio de 1:448 el día de la introducción al potrero en Paso del Toro, Veracruz (Figura 1).

Mediante los frotis sanguíneos se observó que todos los bovinos presentaron ambas especies del protozoario < 1%, lo que demostró que la confrontación fue adecuada. La TR en ambos grupos de animales llegó a ser superior a los 40°C; en una ocasión para el grupo vacunado, y durante seis días consecutivos para el grupo testigo, sin observar diferencias significativas ($P > 0.05$). En los animales del grupo testigo se observó que el incremento inicia a partir del día diez PC, llegando a ser de 1.8°C superior en promedio con respecto al valor individual al

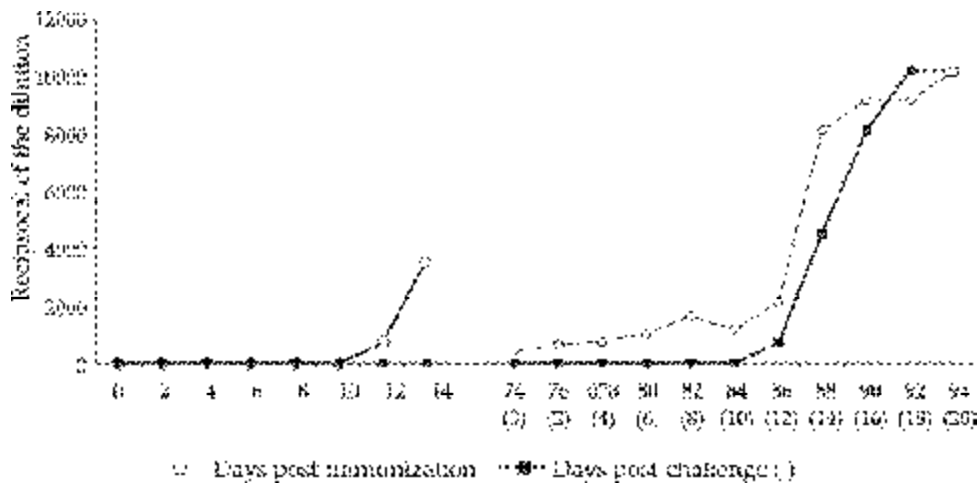


Figura 1. Títulos promedio por grupo de anticuerpos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta contra *Babesia* spp en animales vacunados y testigos. Average titers of antibodies against *Babesia* spp per group using an indirect immunofluorescence technique in vaccinated and control animals.

0.5°C when compared against individual temperatures at the moment of challenge (Figure 2). PCV results showed a continual decrease in value, both in the vaccinated and control groups, reaching percentages of 30.5 and 44.1, respectively, as compared to the initiation of the challenge. Figure 3 shows how values decreased continually from the second day p.i. in both groups, though they were always greater in the control group. Even though the 13.6% difference between both groups observed at day 20 p.i. was not significant ($P > 0.05$), it was broad. A decision was made to treat animals in the control group due to the marked decrease in their PCV and increased RT and due to the poor clinical condition they were in. One received treatment on day 16 p.i., when it presented a PCV decrease of 50% and RT of 40.5°C; a second on day 17 p.i., when it presented a PCV decrease of 50% and RT of 40.9°C; two more on

inicio de la confrontación; mientras que el grupo vacunado presentó un incremento promedio de 0.5°C en relación a la temperatura de cada animal al inicio de la confrontación (Figura 2). Los resultados del VCA mostraron descenso continuo en los valores tanto del grupo vacunado como del testigo llegando a porcentajes de 30.5 y de 44.1, respectivamente, con respecto al inicio de la confrontación. En la Figura 3 se puede apreciar a partir del segundo día PC un descenso continuo en los valores tanto del grupo vacunado como del testigo, siempre mayor en el grupo testigo. Aunque la diferencia observada, de 13.6%, el día 20 PC entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$), sí fue amplia. Se decidió realizar el tratamiento en los animales del grupo testigo debido al marcado descenso en el VCA e incremento de TR, pero debido al mal estado clínico en el que se encontraban. Un animal recibió tratamiento el día 16 PI cuando presentaba descenso del VCA de 50% y TR de 40.5°C; uno el día 17 con

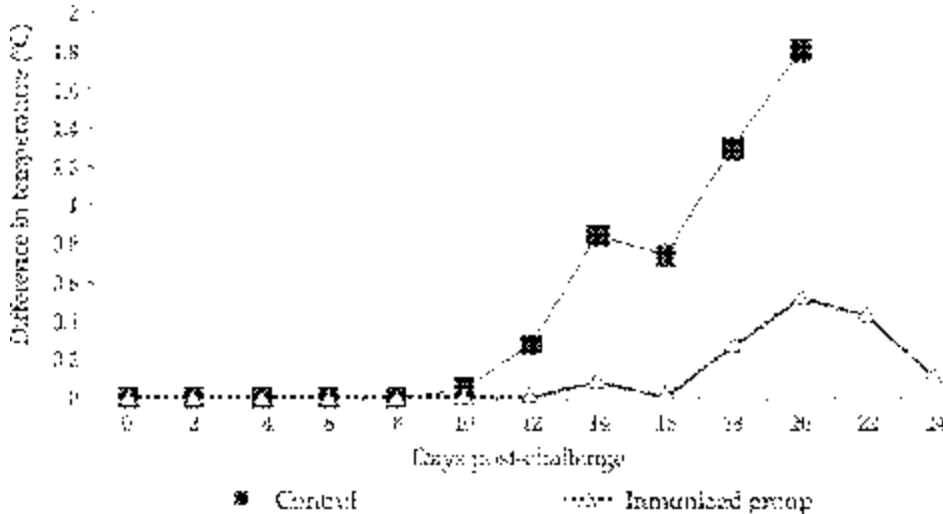


Figura 2. Promedio por grupo de los incrementos de temperatura rectal en animales vacunados contra *Babesia* spp y testigo con relación a la temperatura observada al inicio de la confrontación. Average rectal temperature increases per group in animals vaccinated against *Babesia* spp and in control animals, as compared to temperatures observed at the beginning of the challenge.

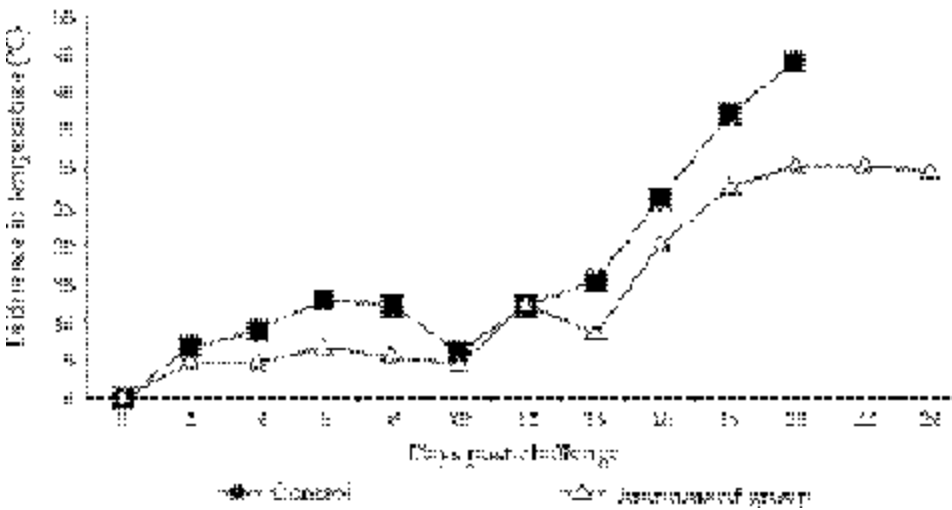


Figura 3. Promedio por grupo del porcentaje de descenso del volumen celular aglomerado en animales vacunados contra *Babesia* spp y testigo posterior a la confrontación de campo. Average decrease in packed cell volume per group in animals vaccinated against *Babesia* spp and in control animals following field challenge.

day 18 p.i., when they presented a PCV decrease of 56% and 42%, respectively, and RTs of 41.3°C; and the last one on day 20 p.i., upon presenting a 40% PCV decrease and RT of 40.3°C. The animals were also prostrate, had pale mucous membranes, marked loss of condition and neurological signs. In contrast, and despite an important drop in PCV, with a maximum average of 30.5% on day 20 p.i., none of the immunized animals required treatment, given that none presented signs heralding death, and began to show increased PCV values from day 22 p.i.. By day 45 p.i., the average drop in PCV and RT in the immunized animals were 15% and 38.6°C, respectively, added to a clear recovery of body condition. Even though this study did not include a follow-up of weight gain or loss in the animals studied, it is important to point out that during the time period in which the animals remained at pasture, from the beginning of the challenge until day 20 p.i., the immunized group registered an average loss of only 4 kg per animal, compared to an average loss of 20 kg per animal observed in the non-immunized group.

Regarding specific anti-Babesia antibodies, detected via IIF technique during the challenge period, a secondary response was observed by day seven in the immunized group, with titers of 10 240 of day 20 p.i.. While in the control group the immune response did not commence until day 12 p.i., with titers of 10 240 only being reached at day 18 p.i. (Figure 1).

Discussion

Two of the main problems encountered when using live populations of hemoparasites as immunizing agents are: the possibility that these might cause such severe reactions in the immunized animals that the latter shall require treatment; and that some other pathogen will be transmitted through the inoculated blood. Both of these inconveniences were avoided in the present study since the low pathogenicity of the *in vitro* culture-derived populations was proved upon inoculating these into susceptible calves. Furthermore, the use of these populations eliminated the need for splenectomized calves for the reproduction of Babesia, thus avoiding contamination problems.

The results obtained during vaccination, in which a 34.2% decrease in PCV was detected in the immunized group, could indicate an increase in the pathogenicity of the immunogen used, much as in results obtained by Cantó et al.,²¹ who observed a 21.4% decrease when using the same immunogen in Holstein cattle born in the same municipality where the study was carried out. However, on that occasion the animals were from

40.9°C de TR y descenso del VCA de 50%; dos el día 18 con descensos del VCA de 56% y 42% y TR de 41.3°C en ambos casos; por último, uno el día 20 con descenso de 40% de VCA y TR de 40.3°C. Los animales además se encontraban postrados, las mucosas pálidas, con enflaquecimiento muy marcado y presencia de signos nerviosos. En contraste, y a pesar de una caída importante en el VCA, con un promedio máximo de 30.5% para el día 20 PC, ninguno de los animales inmunizados requirió tratamiento, ya que no presentaron signos que indicaran su posible muerte, y comenzaron a recuperar sus valores de VCA a partir del día 22 PC. Para el día 45 PC los promedios de descenso de VCA y TR del grupo de animales inmunizados fue de 15% y 38.6°C, mostrando también clara recuperación corporal. Aunque el estudio no contempló el seguir las ganancias o pérdidas de peso de los animales en estudio, es importante mencionar que durante el tiempo que los animales permanecieron en pastoreo, desde que inició la confrontación hasta el día 20 PC, el grupo inmunizado registró una pérdida promedio de sólo 4 kg por animal contra una disminución de 20 kg por animal que se observó en promedio en el grupo no inmunizado.

En relación con los títulos de anticuerpos específicos contra Babesia, detectados mediante la técnica de IFI durante el periodo de confrontación, se observó una respuesta secundaria para el día siete en el grupo inmunizado, con títulos de 10 240 el día 20 PC, mientras que en el grupo testigo se observó el inicio de la respuesta inmune para el día 12 PC, con títulos de 10 240 para el día 18 PC (Figura 1).

Discusión

Dos de los principales problemas que se presentan al utilizar poblaciones vivas de hemoparásitos como agentes inmunizantes, son la posibilidad de que ellos mismos puedan causar reacciones tan severas que los animales inmunizados requieran tratamiento, y que se llegue a transmitir algún otro patógeno en la sangre inoculada. Estos dos inconvenientes se evitaron en este estudio, al comprobarse la baja patogenicidad de las poblaciones cultivadas *in vitro* al inocularlas en becerros susceptibles; además al utilizar estas poblaciones, se elimina el uso de becerros esplenectomizados para la reproducción de Babesia con lo cual se evitan posibles contaminantes.

Los resultados obtenidos durante la vacunación, en los que se detectó disminución del VCA de 34.2% en los animales del grupo inmunizado, podría indicar un incremento en el grado de patogenicidad del inmunógeno utilizado, como los resultados obtenidos por Cantó et al.,²¹ quienes al utilizar el mismo inmunógeno en bovinos Holstein nacidos en el municipio donde se realizó el estudio, observaron un descenso de 21.4%. Sin embargo, en esta ocasión los animales provenían de una zona

an area lacking in water and probably had a very short time to climatize (seven days) prior to the start of the study such that the decrease in cellular concentration could have been due to physiological adaptation to a new environment, especially since the control group showed a considerable PCV decrease (19.3%).

Upon transportation to the challenge pasture it was observed that the challenge was almost immediate when the animals arrived at the endemic zone, and *B. bovis* was detectable in blood smears of control animals from day 11 p.i.. Given that it is the larval stage of *B. microplus* that transmits *B. bovis*, the prepatent period observed in this study coincides with that found in the literature.²⁴ The 32% PCV decreases observed in the immunized group and the 44% decreases observed in the control group, though not significant, do point to a less satisfactory evolution in the control animals, especially when viewed in light of the presentation of other, more severe, clinical signs. The decreases observed are greater than those found in a previous similar study under controlled confinement conditions. In that case an 8.8% decrease was observed in the immunized group and a 31.3% decrease was observed in the control group. The differences between both studies could indicate the difficulty faced by the animals in mounting an adequate immune response when faced with stressful situations caused by an adverse environment.

Studies by various authors using radiation-attenuated *Babesia* spp populations, calf passages or in vitro cultures, indicate that when challenged, animals tend to present PCV reductions that range from 14 to 50%.^{25,26}

The most realistic method for evaluating the immunity conferred by the immunizing agents employed is to measure the intensity of the infection during the challenge under natural conditions. In the present study this characteristic was manifested given that calves remained in the pasture infested by *Boophilus* spp without receiving any acaricide treatment. The immunized animals resisted a field challenge that was severe enough to produce clear signs of illness, including prostration, pale mucous membranes, loss of condition and neurological signs, in the control animals. The latter were treated, three of them on two separate occasions, with a specific drug, so as to avoid their demise. The physical appearance of the animals, though not numerically pondered, did indicate an overall better state of health in the vaccinated versus the control animals.

Concerning the importance of antibodies, Mahoney²⁷ points out that the administration of immune serum or a mixture of IgG1 and IgG2 to animals free from the disease, prior to challenge with homogenous isolates, confers protection, thus indicating the importance of

con escasez de agua y probablemente el corto tiempo de aclimatación (siete días) que tuvieron los bovinos antes del inicio del estudio ocasionó que parte de la disminución en la concentración celular se debiera al proceso de adaptación fisiológica a un nuevo entorno ambiental, ya que los animales del grupo testigo presentaron disminución considerable del VCA (19.3%).

A la confrontación se observó que ésta fue casi inmediata a la llegada de los animales a la zona endémica de babesiosis, y se pudo detectar *B. bovis* en frotis sanguíneos de los animales testigo a partir del día 11 PC. Dado que es el estadio larval de *B. microplus* el que transmite *B. bovis*, el periodo prepatente observado en este trabajo coincide con la literatura.²⁴ Los descensos en el VCA de 32% para los bovinos del grupo inmunizado y del 44% para los animales del grupo testigo, aunque no fueron estadísticamente significativos, sí señalan una evolución menos satisfactoria los animales testigo, aunado a la presentación de otros signos clínicos más severos. Los descensos observados son superiores a lo encontrado en un estudio similar previo en condiciones controladas de confinamiento, en el que se determinaron disminuciones de 8.8% para el grupo inmunizado y de 31.3% para el grupo testigo. Las diferencias entre ambos estudios podrían indicar la dificultad que tienen los animales en montar una respuesta inmune adecuada al sufrir situaciones de estrés originadas por el entorno ambiental adverso.

Los estudios de diversos investigadores que utilizan poblaciones atenuadas de *Babesia* spp por irradiación, pases en becerros o cultivo in vitro, indican que a la confrontación se llegan a presentar reducciones en el VCA que van de 14% al 50%.^{25,26}

La forma más realista para evaluar la inmunidad conferida por los productos inmunizantes utilizados es medir la intensidad de la infección durante la confrontación en condiciones naturales. En el presente estudio se manifestó esta característica, ya que los becerros permanecieron en el potrero infestado con *Boophilus* spp sin recibir tratamiento acaricida. Los animales inmunizados resistieron la confrontación de campo, que fue tan severa que produjo signos claros de la enfermedad como postración, mucosas pálidas, pérdida de peso y signos nerviosos en los animales testigo, que fueron tratados, tres de ellos en dos ocasiones con el fármaco específico para evitar su muerte. Las características del aspecto físico, si bien no se ponderaron numéricamente indicaron tendencia a mejoría del estado general de los animales vacunados contra los testigos.

En relación con la importancia de los anticuerpos, Mahoney²⁷ señala que la administración pasiva de suero inmune o de una mezcla de IgG1 e IgG2 a animales libres de la enfermedad para su posterior desafío con aislados homogéneos, transfiere protección, lo que indica la importancia de los anticuerpos protectores. Asimismo,

protective antibodies. Likewise, he mentions that even though the administration of antibodies confers protection against *in vivo* challenge, the exposure of parasitized erythrocytes to antibodies *in vitro* has no effect on parasite viability, thus indicating that antibodies mediate their protective effects through other components, such as macrophages or the complement fixation system. Furthermore, Brown and Palmer²⁸ indicate that only animals who have been successfully immunized or those who have managed to resolve an acute infection acquire immunity against subsequent challenges, probably due to the development of an efficient immune response. Thus, in the vaccinated animals decreased antibody titers were detected prior to the challenge and these could be associated to the more benign evolution of disease seen following the challenge. Antibody levels remained high, making it possible to associate these to a protective quality against more acute forms of the disease.

From these results it is concluded that the mixed fresh *B. bovis* and *B. bigemina* immunogen, when administered in a 1×10^7 parasitized erythrocyte dose, confers adequate protection in cattle immunized prior to their introduction to an endemic zone. The variables analyzed that allowed us to distinguish the immunogen's protective effects were prostration, ataxia and weight loss, permitting a clear distinction between immunized and control animals.

Acknowledgements

The authors wish to thank the State Commission for Farming Protection from the state of Queretaro for access to the "GB" ranch for the first phase of the study, and Carmen Rojas Martínez for providing the attenuated *in vitro* culture-derived parasites.

Referencias

1. Connaway JW, Frances M. Texas Fever. *Amissori Agric Exp Sta Bull* 1899;48:1-5.
2. Callow LL. Tick-borne livestock disease and their vectors. Australian methods of vaccination against anaplasmosis and babesiosis. *Wild Anim Rev* 1976;18:9-15.
3. Callow LL, Mellors LT. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomized cattle. *Aust Vet J* 1966;42:464-470.
4. Nari A, Solari MA, Gradizo H. Hemovacuna para el control de *Babesia* spp y *Anaplasma marginale* en Uruguay. *Veterinaria* 1979;15:137-147.
5. Brizuela CM, Ortellado CA, Sanabria E, Torres O, Ortigosa D. The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. *Vet Parasitol* 1998;76:27-41.
6. Alonso M, Fadrada M, Blandino T, Gómez E, Baudín C. Atenuación de una cepa cubana de *Babesia bovis* con fines inmunoprolifáticos. *Rev Salud Anim* 1991;13:81-88.

menciona que aunque la administración de anticuerpos produce protección contra la confrontación *in vivo*, la exposición de eritrocitos parasitados a anticuerpos en un sistema *in vitro*, no tuvo efecto sobre la viabilidad de los parásitos, lo que indica que los anticuerpos median la protección a través de otros componentes, como macrófagos o el sistema de fijación de complemento. Asimismo, Brown y Palmer²⁸ indican que sólo animales inmunizados exitosamente o aquellos que han podido resolver una infección aguda adquieren inmunidad contra una confrontación subsiguiente, probablemente debido al desarrollo de una respuesta inmune eficiente. Así, en los animales vacunados se detectó incremento en los títulos de anticuerpos previos al desafío que podrían asociarse a la evolución más benigna observada después de la confrontación. Los anticuerpos se mantuvieron elevados, pudiendo así asociarlos a una capacidad protectora contra formas más agudas de la enfermedad.

De estos resultados se concluye que el inmunógeno mixto de *B. bovis* y *B. bigemina* fresco, a dosis de 1×10^7 Ei de cada especie del protozoario, confiere adecuada protección a bovinos inmunizados antes de ser introducidos a una zona endémica de la enfermedad. Las variables que permitieron distinguir el efecto del inmunógeno en protección fueron prostración, ataxia y pérdida de peso que se logró diferenciar claramente entre los animales inmunizados y los del grupo testigo.

Agradecimientos

Se agradece al Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria de Querétaro por facilitar las instalaciones del rancho "GB" para la primera fase del estudio y a Carmen Rojas Martínez por proveer los parásitos atenuados a partir del cultivo *in vitro*.

7. Rogers RJ, Dimmock CK, De Vos AJ, Rodwen BJ. Bovine leucosis virus contamination of vaccine produced *in vivo* against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust Vet J* 1988;65:285-290.
8. Rodriguez SD, Buening GM, Green TJ, Carson CA. Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Infect Immun* 1983;42:15-19.
9. Vega CA, Buening GM, Green TJ, Carson CA. *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am J Vet Res* 1985;46:416-420.
10. Scheffers TP, Montenegro-James S. Vaccines against babesiosis using soluble parasite antigen. *Parasitol Today* 1995;11:456-462.
11. James MA, Levy MG, Ristic M. Isolation and partial characterization of culture-derived soluble *Babesia bovis* antigens. *Infect Immun* 1981;31:358-361.
12. Smith RD, Carpenter J, Cabrera A, Gravelly SM, Erp EE, Osorno MB, et al. Bovine Babesiosis: vaccination against tick-borne challenge exposure with culture-derived *Babesia bovis* immunogens. *Am J Vet Res* 1979;40:1678-1682.

13. Echaide IE, de Echaide ST, Guglielmo AA. Live and soluble antigens for cattle protection to *Babesia bigemina*. *Vet Parasitol* 1993;51:35-40.
14. Carcy B, Precigout E, Vaventin A, Gorenflot A, Schrevel J. A 37-kilodalton glycoprotein of *Babesia divergens* is a major component of a protective fraction containing low molecular mass culture-derived exoantigens. *Infect Immun* 1995;63:811-817.
15. Allred DR, Cinque RM, Lane TJ, Ahrens KP. Antigenic variation of parasite-derived antigens on the surface of *Babesia bovis* infected erythrocyte surface. *Infect Immun* 1994;62:91-98.
16. Hines SA, Palmer GH, Jasmer DP, Goff WL, McElwain TF. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. *Infect Immun* 1995;63:349-352.
17. Wright IG, Casu R, Commins MA, Dalrymple BP, Gale KR, Goodger BV, et al. The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Vet Parasitol* 1998;44:3-13.
18. Dalrymple BP. Molecular variation and diversity in candidate vaccine antigens from *Babesia*. *Acta Trop* 1993;53:227-238.
19. Cantó GJ, Figueroa JV, Alvarez JA, Ramos JA, Vega CA. Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de cultivo in vitro. *Tec Pecu Mex* 1996;34:127-134.
20. Figueroa JV, Cantó GJ, Álvarez JA, Lona GR, Ramos JA, Vega CA. Capacidad protectora de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo in vitro. *Tec Pecu Mex* 1998;36:95-101.
21. Cantó GJ, Figueroa JV, Ramos JA, Álvarez JA, Mosqueda JJ, Vega CA. Evaluación de la patogenicidad y capacidad protectora de un inmunógeno fresco combinado de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. *Vet Mex* 1999;30:215-220.
22. Cantó GJ, Ramos JA, Rojas EE, Vega CA, Oviedo V, Figueroa JV, et al. Evaluación de la inocuidad y protección de un inmunógeno derivado de cultivo in vitro de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* multiplicado en bovinos. *Tec Pecu Mex* 2002;40:127-138.
23. Goldman M, Pipano E, Rosenberg AS. Fluorescent antibody tests for *Babesia bigemina* y *Babesia berbera*. *Res Vet Sci* 1972;13:77-82.
24. Friedhoff KT, Smith RD. Transmission of *Babesia* by ticks. In: Ristic M, Kreier JP, editors *Babesiosis*. New York: Academic Press 1981:267-321
25. Buening GM, Kuttler KL, Rodríguez SD. Evaluation of a cloned *Babesia bovis* organism as a live immunogen. *Vet Parasitol* 1986;22:235-241.
26. Bock RE, de Vos AJ, Kingston TG, Shields IA, Dalglish RJ. Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. *Vet Parasitol* 1992;43:45-49.
27. Mahoney DF. The immune response to babesiosis. In: Morrison WL editor *The ruminant immune system in health and disease*. Cambridge: Cambridge University Press 1986:539-545.
28. Brown WC, Palmer GH. Designing blood stage vaccines against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Parasitol Today* 1999;7:275-281.