



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**  
**CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA**  
**LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y**  
**ZOOTECNIA**

---

**“MONITOREO CLÍNICO DE BOVINOS ESPLENECTOMIZADOS E  
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Babesia bovis* Y *Babesia  
bigemina*”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:  
JORGE EDUARDO SABORÍO DOMÍNGUEZ**

**BAJO LA DIRECCIÓN DE:**

**DR. JUAN JOSÉ OJEDA CARRASCO    M. EN C. REBECA MONTSERRAT  
SANTAMARIA ESPINOSA**

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES .....	3
	<b>2.1 Situación de la babesiosis bovina en México .....</b>	<b>3</b>
	<b>2.2 Sinonimia.....</b>	<b>6</b>
	<b>2.3 Etiología .....</b>	<b>6</b>
	<b>2.4 Distribución Geográfica .....</b>	<b>11</b>
	<b>2.5 Transmisión .....</b>	<b>12</b>
	<b>2.6 Periodo de incubación.....</b>	<b>12</b>
	<b>2.7 Epidemiología .....</b>	<b>12</b>
	<b>2.7.1 Estabilidad enzoótica.....</b>	<b>13</b>
	<b>2.8 Ciclo biológico de <i>Babesia</i> spp.....</b>	<b>14</b>
	<b>2.9 Generalidades sobre <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....</b>	<b>17</b>
	<b>2.9.1 Ciclo de vida de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....</b>	<b>18</b>
	<b>2.10 Morbilidad y Mortalidad.....</b>	<b>19</b>
	<b>2.11 Patogenia.....</b>	<b>20</b>
	<b>2.11.1 Fisiopatología de la fiebre .....</b>	<b>20</b>
	<b>2.11.2 Fisiopatología de la anemia .....</b>	<b>22</b>
	<b>2.12 Signos clínicos .....</b>	<b>23</b>
	<b>2.13 Inmunología.....</b>	<b>24</b>
	<b>2.14 Lesiones <i>post mortem</i>.....</b>	<b>26</b>
	<b>2.15 Métodos de control para la babesiosis bovina.....</b>	<b>26</b>
	<b>2.15.1 Control del vector .....</b>	<b>26</b>
	<b>2.15.2 Control en la movilización del ganado.....</b>	<b>27</b>
	<b>2.15.3 Uso de ganado resistente .....</b>	<b>27</b>
	<b>2.15.4 Inmunización .....</b>	<b>27</b>
	<b>2.16 Tratamiento.....</b>	<b>28</b>
	<b>2.17 Hematocrito .....</b>	<b>29</b>

<b>2.18 Diagnóstico</b> .....	29
<b>2.18.1 Métodos directos</b> .....	31
<b>2.18.1.1 Frotis sanguíneo</b> .....	31
<b>2.18.1.2 Impronta cerebral</b> .....	31
<b>2.18.1.3 Prueba de hemolinfa</b> .....	31
<b>2.18.1.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</b> .....	32
<b>2.18.2 Métodos indirectos</b> .....	32
<b>2.18.2.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)</b> .....	32
<b>2.18.2.2 Prueba de ELISA</b> .....	32
III. <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	34
IV. <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	36
V. <b>OBJETIVOS</b> .....	37
<b>5.1 Objetivo General</b> .....	37
<b>5.2 Objetivos específicos</b> .....	37
VI. <b>HIPÓTESIS</b> .....	38
VII. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	39
<b>7.1 Materiales</b> .....	39
<b>7.1.1 Material de campo</b> .....	39
<b>7.1.2 Material de laboratorio</b> .....	39
<b>7.1.3 Materiales para la técnica de IFI</b> .....	39
<b>7.1.4 Material biológico</b> .....	40
<b>7.2 Método</b> .....	40
<b>7.2.1 Método de campo</b> .....	41
<b>7.2.2 Método de laboratorio</b> .....	41
<b>7.2.3 Volumen Celular Aglomerado (VCA)</b> .....	42
<b>7.2.4 Frotis sanguíneo</b> .....	42
<b>7.2.5 Porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP)</b> .....	43
<b>7.2.6 Monitoreo serológico</b> .....	44
<b>7.2.7 Inmunofluorescencia indirecta</b> .....	44
<b>7.3 Universo de trabajo</b> .....	44
VIII. <b>IMPLICACIONES ÉTICAS</b> .....	45

IX. RESULTADOS .....	46
<b>9.1. Temperatura rectal (TR)</b> .....	46
<b>9.2. Hematocrito (Hto)</b> .....	48
<b>9.3. Porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP)</b> .....	49
<b>9.4 Monitoreo serológico</b> .....	51
X. DISCUSIÓN .....	56
X. CONCLUSIÓN .....	61
XI. SUGERENCIAS .....	62
XII. BIBLIOGRAFÍA .....	63
XIII. ANEXOS .....	76
<b>14.1 Anexo 1. Elaboración de Solución amortiguadora de fosfato (PBS)</b> ....	76
<b>14.2 Anexo 2. Procedimiento de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta</b> .....	76
<b>(IFI)</b> .....	76
<b>14.3 Anexo 3. Títulos promedios de anticuerpos anti <i>B. bovis</i> a partir del día de seroconversión utilizando diluciones dobles seriadas a partir de 1:80 hasta 1:10240, mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta</b> 78	
<b>14.4 Anexo 4. Títulos promedios de anticuerpos anti <i>B. bigemina</i> partir del día de seroconversión utilizando diluciones dobles seriadas a partir de 1:80 hasta 1:10240, mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.</b> .....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Pérdidas económicas por la garrapata del ganado <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , relacionada con la producción de leche y carne en México en 2013.....	5
<b>Tabla 2.</b> Clasificación Taxonómica de <i>Babesia</i> spp. ....	7
<b>Tabla 3.</b> Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la babesiosis bovina y su propósito. ....	30
<b>Tabla 4.</b> Parámetros evaluados durante el monitoreo clínico y serológico .....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Situación actual en México de <i>Rhipicephalus (Boophilus) spp.</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Figura de un eritrocito de bovino parasitado por un zoito de <i>Babesia spp.</i> mostrando organelos. ....	8
<b>Figura 3.</b> Frotis sanguíneo teñido con Giemsa: <i>B. bovis</i> en el interior de un eritrocito de bovino, bajo el objetivo de 100x. ....	9
<b>Figura 4.</b> Frotis sanguíneo teñido con Giemsa: <i>B. bigemina</i> en el interior de un eritrocito de bovino, bajo el objetivo de 100x. ....	10
<b>Figura 5.</b> Mapas de distribución de las babesiosis bovina en el semestre de julio a diciembre del 2017. ....	11
<b>Figura 6.</b> Ciclo biológico de <i>Babesia spp.</i> .....	15
<b>Figura 7.</b> Ciclo biológico de la garrapata <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , incluyendo los estadios dentro del hospedero y fuera del mismo. ....	18
<b>Figura 8.</b> Mecanismos postulados de la inmunidad innata y adquirida contra <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i> . ....	25
<b>Figura 9.</b> Dibujo de un hematocrito.....	42
<b>Figura 10.</b> Métodos de observación del frotis para la determinación de eritrocitos parasitados. ....	43
<b>Figura 11.</b> Valor promedio de la temperatura rectal (TR°C) post inoculación. ....	47
<b>Figura 12.</b> Valor promedio del volumen celular aglomerado (Hto%) post inoculación. ....	48
<b>Figura 13.</b> Observación microscópica de frotis sanguíneo teñido con Giemsa....	50
<b>Figura 14.</b> Valor promedio del porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) post inoculación. ....	51
<b>Figura 15.</b> Prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	52
<b>Figura 16.</b> Título de anticuerpos anti <i>B. bovis</i> mediante Inmunofluorescencia indirecta.....	53
<b>Figura 17.</b> Título de anticuerpos anti <i>B. bigemina</i> mediante Inmunofluorescencia indirecta.....	54

## I. INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por protozoarios hemoparásitos de amplia distribución en las zonas subtropicales y tropicales de América latina; en México se han reconocido dos especies: *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, cuya presencia y distribución se encuentra asociada con su garrapata vector, *Rhipicephalus (Boophilus) spp.* (Rojas *et al.*, 2004).

*B. bigemina* presenta la distribución más amplia, pero *B. bovis* en general es más patógena. Las infecciones por *B. bovis* se caracterizan por signos nerviosos como resultado del secuestro de eritrocitos infectados en capilares cerebrales, mientras que las infecciones por *B. bigemina* ocasionan una patología hemolítica severa, pero no se observa signología nerviosa (Zintl *et al.*, 2003).

El mayor impacto ocasionado por el protozoario ocurre en la industria ganadera (Álvarez y Figueroa, 2007), lo que provoca grandes pérdidas económicas (Yokoyama *et al.*, 2002); se estima que más de 900 millones de cabezas de ganado están en riesgo de contraer la enfermedad (Singh *et al.*, 2008) y se ha atribuido a la babesiosis bovina causando pérdidas económicas superiores a los 800 millones de dólares anuales (Betancourt, 1996). La magnitud se refleja con altas tasas de morbilidad y mortalidad en el ganado (Álvarez y Cantó, 1985).

Debido a las altas tasas de morbilidad y mortalidad que ocasiona la babesiosis en el ganado bovino de nuestro país, además de las pérdidas económicas que representa esta enfermedad. Se han redoblado esfuerzos en la investigación para la instrumentación de métodos diagnósticos más eficaces y de inmunógenos profilácticos contra la enfermedad. Un ejemplo es el caso de la creación de una vacuna viva atenuada contra *B. bovis* y *B. bigemina*, este inmunógeno fue desarrollado en el CENID-SAI del INIFAP, la cual ha demostrado una protección del 80% para los bovinos vacunados contra cepas virulentas de *Babesia* (Cantó *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2004) y un 70% para animales bajo condiciones extremas de campo (Cantó *et al.*, 2003). Sin embargo, la vacuna no se encuentra comercialmente disponible y solo se puede obtener en convenios directos con el

INIFAP. Por lo tanto se sigue en la búsqueda y desarrollo de investigaciones que lleven a un diagnóstico e identificación más eficaz de la babesiosis bovina en México. En el presente trabajo se esplenectomizaron e infectaron experimentalmente bovinos con cepas de *B. bovis* y *B. bigemina* provenientes de aislados de campo, con el objetivo de recuperar y conservar la cepa de ambos protozoarios en el germoplasma de la unidad de *Babesia* en el INIFAP-SAI, con el fin de utilizarla como material biológico para investigaciones posteriores que contribuyan a la prevención y control de la enfermedad.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Situación de la babesiosis bovina en México

México es un país con un gran potencial ganadero, cabe mencionar que los estados que limitan con el Golfo de México se encuentran entre las regiones ganaderas más importantes, primordialmente en producción extensiva de ganado de carne y semi-intensiva de ganado de doble propósito. Desafortunadamente, las características climáticas de estas regiones las convierte en zonas de riesgo por la presencia natural de enfermedades infecciosas y parasitarias que afectan al ganado bovino (Ramírez-Romero *et al.*, 2011). La presencia de las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) spp.*, ahora reclasificadas en el género *Rhipicephalus*, determina la presencia de *B. bovis* y *B. bigemina*. Debido a que *Babesia* spp. requiere de la garrapata para completar su ciclo de vida, por lo tanto, las zonas libres del vector también se consideran libres de babesiosis. (Callow *et al.*, 1997; Bock *et al.*, 2004). En México, se ha informado la presencia de ambas especies de protozoarios, su prevalencia presenta variaciones que van desde 4.54% hasta 96% (Osorno, 1978; Álvarez y Cantó, 1985).

El Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) en 2017 registró el inventario total de la población nacional de bovinos de carne y leche siendo de 34, 277, 868. Estando en los tres primeros lugares los estados de Veracruz, Jalisco y Chiapas. Por otro lado, la campaña nacional de control de la garrapata de la fiebre del ganado bovino en México informó que el 65% de territorio nacional está infestado con *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Figura 1).

Basado en esta información, el número estimado de bovinos en riesgo por infestación de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es de 24'973,983 bovinos. Aunado a este dato se han invertido gran cantidad de recursos en campañas sanitarias para el control de la garrapata en el ganado (Ramírez-Romero *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Situación actual en México de *Rhipicephalus (Boophilus) spp.*

Fuente: (SAGARPA-SENASICA, 2018)

Con la existente presencia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el territorio nacional, se mantiene una zona permanente de cuarentena a lo largo de la frontera mexicana para evitar su reintroducción a EE.UU. dentro de esta zona diferentes asociaciones se dedican a la vigilancia y monitoreo de animales infestados con esta garrapata exótica (CFSPH, 2007). Esto exige para México, medidas profilácticas eficientes, ya que gran parte de la producción bovina, es dirigida hacia la exportación para EE.UU. al no cumplirse los requerimientos sanitarios esto tendrá un impacto negativo hacia la economía y producción del país.

Rodrigues y Leite (2013), realizaron un estudio analizando las pérdidas en la producción de leche causadas por el vector *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Brasil, estos autores estimaron que las garrapatas son responsables de la reducción

de 90.24 L de leche por vaca durante el periodo de lactación. Basado en esta información las pérdidas estimadas de la producción de ganado lechero en México son de \$ 68'878,69 dólares, mientras que las pérdidas económicas estimadas provocadas por el vector de la garrapata en ganado de carne son de \$ 504'729,382 dólares (Tabla 1). Por lo tanto, las pérdidas económicas totales atribuidas a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en los hatos mexicanos pueden aproximarse a \$ 573'608,076 dólares (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

**Tabla 1.** Pérdidas económicas por la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, relacionada con la producción de leche y carne en México en 2013.

	Población en riesgo	Pérdidas en lactación (litros)	Pérdidas anuales de leche (litros)	Precio al productor (US\$/litro)	Pérdida total (US\$)
Ganado lechero	1,734,735	90.24 (Rodrigues y Leite, 2013)	156,542,486	0.44 SIAP-SAGARPA	68,878,694
Ganado de carne	Población en riesgo 23,239,248	Pérdida diaria de peso (g/garrapata/cabeza)	Pérdida anual de peso (kg)	Precio al productor (US\$/kg)	Pérdidas totales (US\$)
<i>B. Taurus</i>	3,904,184	1.37 (Jonsson, 2006)	183,514,997	1.61(SIAP-SAGARPA, 2013)	295,459,145
<i>B. Indicus</i>	6,502,345	1.18 (Jonsson, 2006)	111,742,243	1.61(SIAP-SAGARPA, 2013)	179,905,011
<i>B. Indicus x B. taurus</i>	12,832,719	1.18 (Jonsson, 2006)	18,239,271	1.61 (SIAP-SAGARPA, 2013)	29,365,226
					504,729,382

Fuente: Adaptado de Rodríguez-Vivas *et al.* (2017).

Teniendo en cuenta lo anterior, es vital realizar trabajos de investigación que contribuyan a la prevención y control lo cual ayude a encontrar las condiciones óptimas de producción para revertir el déficit que México tiene con respecto a importación de leche y carne de origen bovino, ocasionado por el protozoario (García *et al.*, 2003). Tal es el caso del INIFAP que ha desarrollado una vacuna mixta atenuada contra *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, utilizando una clona

irradiada de *Babesia bovis* y una cepa de *Babesia bigemina* que ha sido atenuada por un número indefinido de pases en cultivo *in vitro* (Rodríguez, 1985; Vega *et al.*, 1985). Esta vacuna ha demostrado inducir una respuesta inmune que protege a más del 80% de animales que han sido vacunados (Figuroa *et al.*, 1994; Cantó *et al.*, 1996; García *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1996). La existencia de estas vacunas facilita el poder inducir protección y evaluar o caracterizar la respuesta inmune desarrollada por animales protegidos para diferenciarla de la respuesta desarrollada por animales no protegidos (Rodríguez, 1985., Cantó *et al.*, 1996).

## **2.2 Sinonimia**

La babesiosis bovina también, conocida también como, fiebre de garrapatas, fiebre de Texas, piroplasmosis, ranilla roja, hemoglobinuria enzoótica, ictericia maligna, red wáter o enfermedad de la tristeza (Vizcaíno, 1980; Mateus, 1990; Goés *et al.*, 2007; Hunfeld *et al.*, 2008).

## **2.3 Etiología**

El género *Babesia* pertenece al *Phylum Apicomplexa* (Tabla 2), un linaje eucariota a principios de la ramificación, que se caracteriza por la presencia de un complejo apical y un citoesqueleto único distinto de la de otros eucariotas (Gordon y Sibley, 2005).

Son apicomplexas típicos con reproducción alternante (sexual-asesual) y complejo apical, aunque incompleto, con roptrias, anillo polar y micronemas (Figura 2) (Cordero del Campillo, 1999).

Estos son organismos protozoos que no poseen cilios, ni pseudópodos, ni flagelos; con excepción de algunos microorganismos que son flagelados se alimentan por pinocitosis a partir de glóbulos rojo, el movimiento de estos zoítos se realiza por deslizamiento y contracciones corporales (Cordero del Campillo, 1999; Muñoz, 2016).

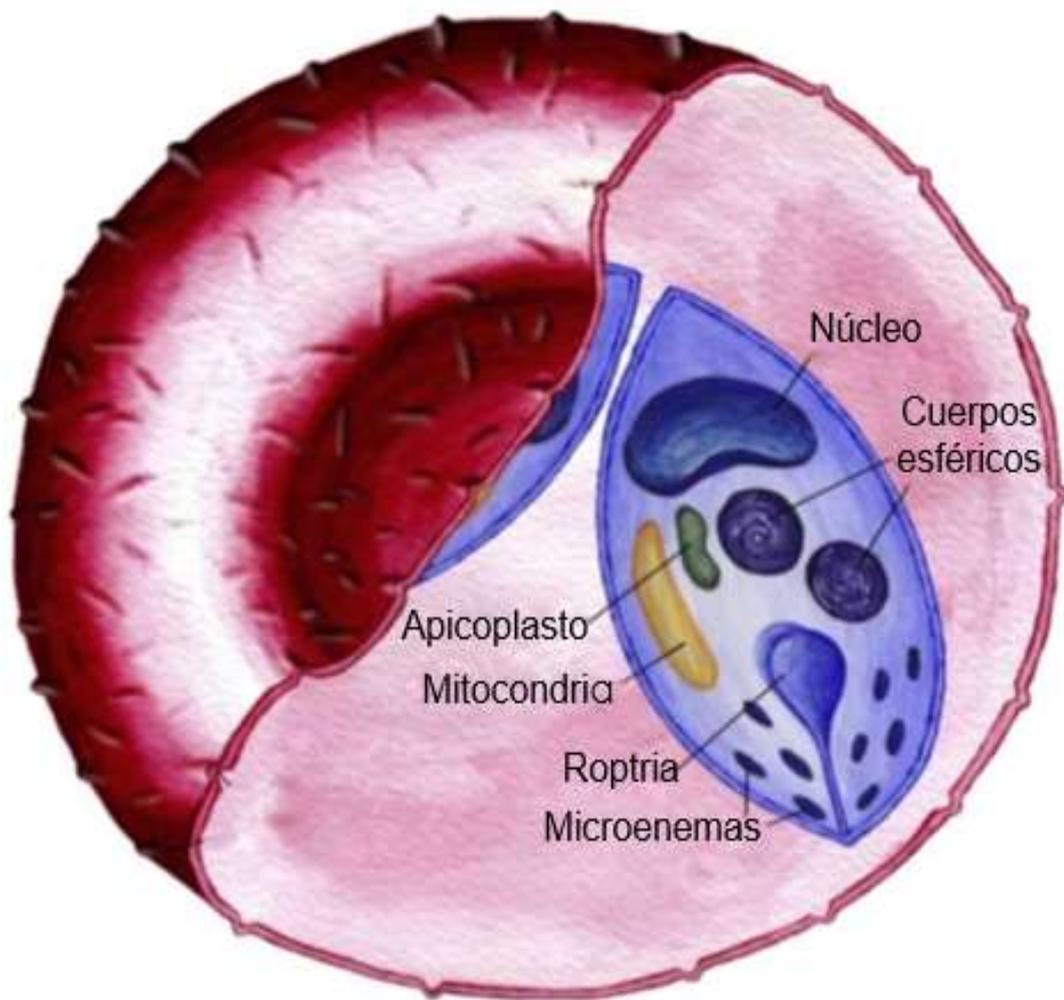
**Tabla 2.** Clasificación Taxonómica de *Babesia* spp.

---

<b>Reino</b>	<b>Protista</b>
<b>Subreino</b>	<i>Protozoo</i>
<b>Filo</b>	<i>Apicomplexa</i>
<b>Clase</b>	<i>Aconoidasida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Piroplasmata</i>
<b>Orden</b>	<i>Piroplasmida</i>
<b>Familia</b>	<i>Babesiidae</i>
<b>Género</b>	<i>Babesia</i>
<b>Especie</b>	<i>Bovis/Bigemina</i>

---

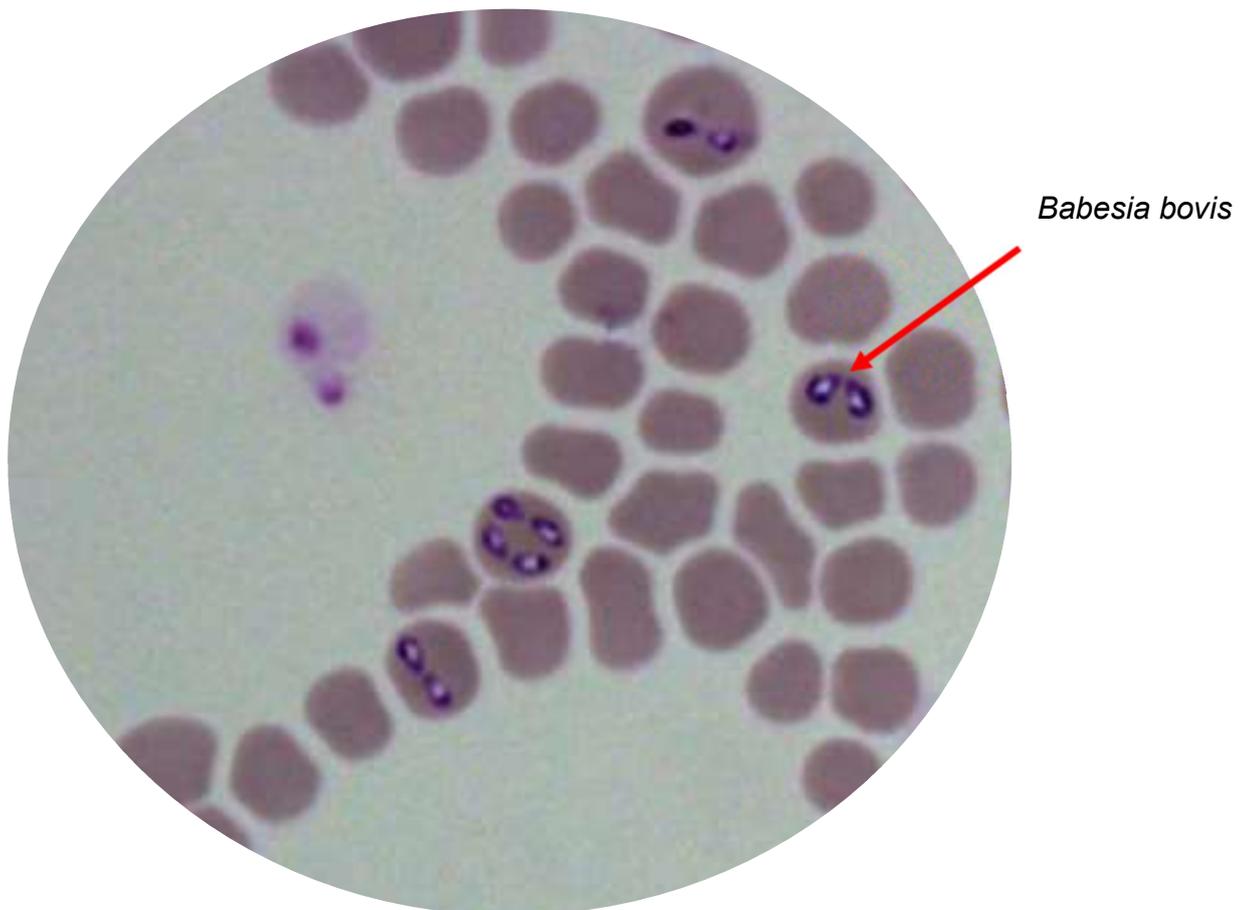
Fuente: Adaptado de Levine (1971).



**Figura 2.** Figura de un eritrocito de bovino parasitado por un zoito de *Babesia* spp. mostrando organelos.

Fuente: Adaptado de Gohil *et al.* (2010)

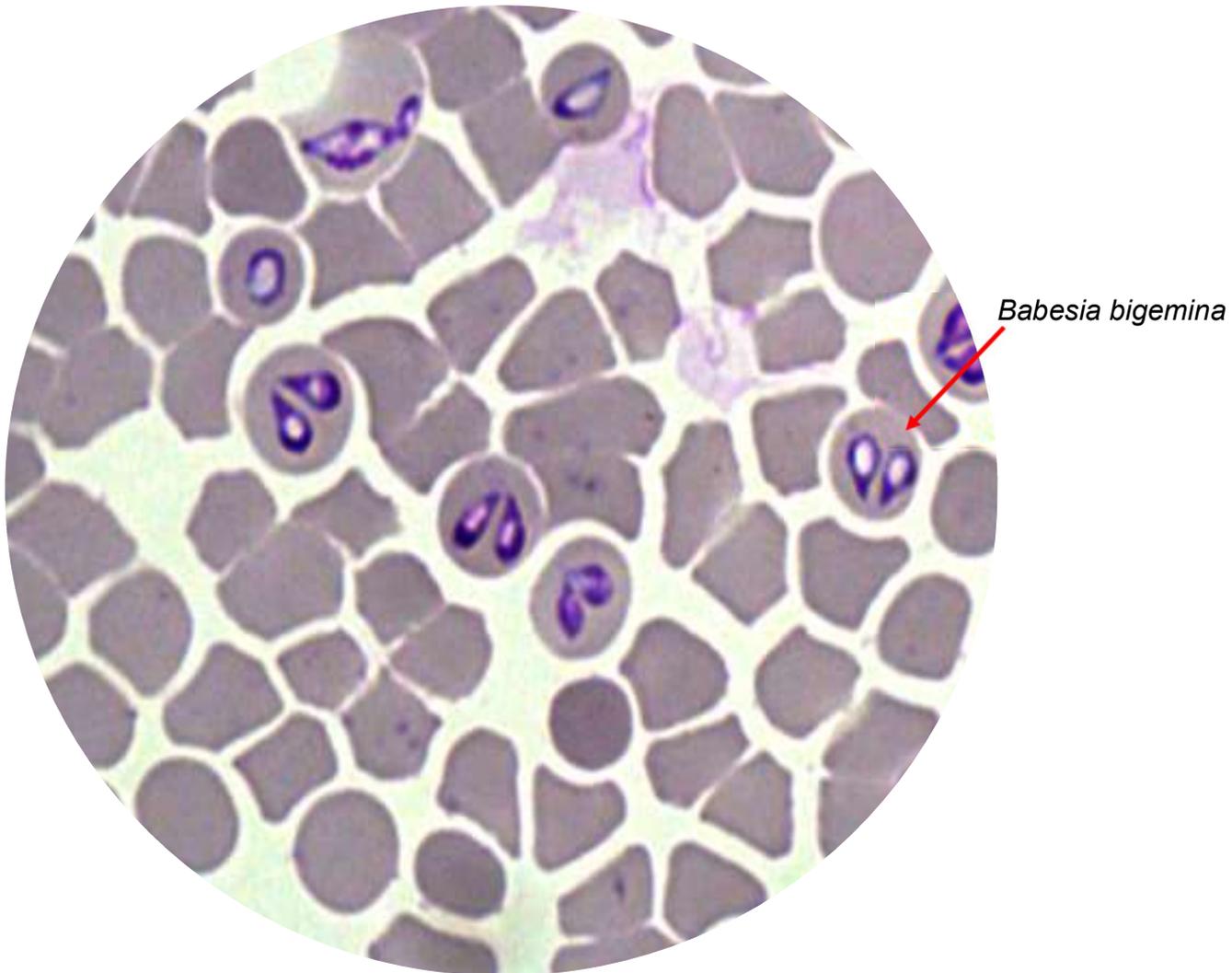
*B. bovis* puede presentarse en forma redondeada o anillada, alargada y en forma de pera (piriforme), ocupando una posición cerca de la periferia de la célula y más rara vez en la superficie de los glóbulos rojos. En frotis sanguíneos (Figura 3), las células parasitadas tienden a situarse en grupos. La forma redondeada mide 1 a 2.5 micras y la piriforme mide 2 a 2.5 micras. (Solorio y Rodríguez, 1997a).



**Figura 3.** Frotis sanguíneo teñido con Giemsa: *B. bovis* en el interior de un eritrocito de bovino, bajo el objetivo de 100x.

Fuente: Fotografía Laboratorio Unidad de Babesiosis, (CENID-SAI INIFAP).

*B. bigemina* se presenta en el interior del eritrocito ocupando un espacio entre el centro y margen, de forma redondeada, ovalada o irregular (Figura 4). La forma de pera, mide de 3 a 4 micras de largo por 0.8 a 1.2 micras de ancho. Los parásitos se aproximan y se encuentran por sus extremos puntiagudos (Solorio y Rodríguez, 1997a).

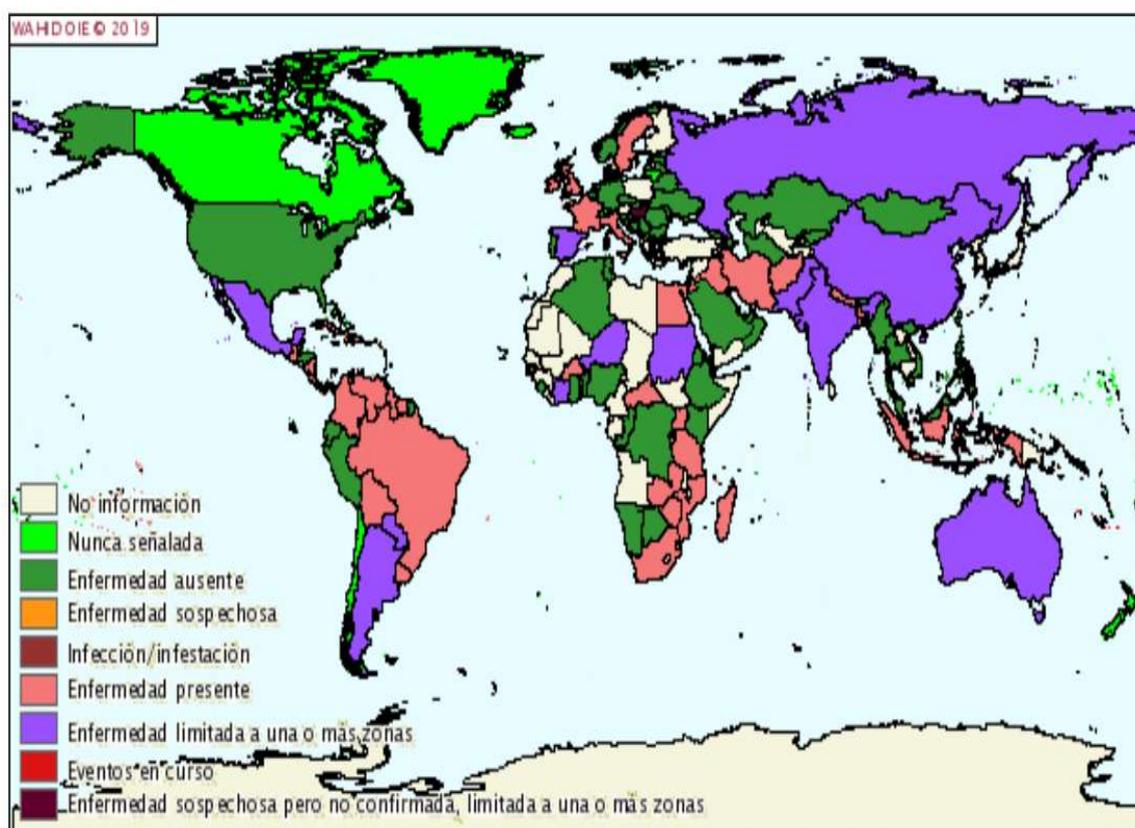


**Figura 4.** Frotis sanguíneo teñido con Giemsa: *B. bigemina* en el interior de un eritrocito de bovino, bajo el objetivo de 100x.

Fuente: Fotografía Laboratorio Unidad de Babesiosis (CENID-SAI INIFAP).

## 2.4 Distribución Geográfica

La babesiosis bovina se puede encontrar en cualquier lugar donde existan garrapatas, ya que es el principal vector, este tiene una amplia distribución en zonas tropicales, subtropicales y templadas de América Latina (Rojas *et al.*, 2004). Sin embargo, *B. bovis* y *B. bigemina* también tienen una presencia mundial importante (Figura 5), se han realizado reportes en Asia, África, partes del Sur de Europa y Australia (CFSPH, 2008).



**Figura 5.** Mapas de distribución de las babesiosis bovina en el semestre de julio a diciembre del 2017.

Fuente: WAHID-OIE© (2018).

## 2.5 Transmisión

Las especies de *Babesia* se transmiten mediante garrapatas que se infectan al ingerir parásitos que se encuentran en la sangre del bovino infectado. Los principales vectores de *B. bigemina* y *B. bovis* son *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (CFSPH, 2008).

Entre los factores que favorecen la transmisión del agente se menciona al estadio de la garrapata. Por su parte, las condiciones meteorológicas que se consideran como factores importantes son la temperatura y humedad relativa. La ovoposición a temperaturas de 30° a 37°C, induce el desarrollo de estadios infectivos de *B. bovis* y *B. bigemina* en los huevos de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) spp.* y un nivel óptimo de 80% de humedad relativa es necesario para un eficiente desarrollo (Hodgson, 1991; Álvarez y Cantó, 1985).

## 2.6 Periodo de incubación

Los signos de las infecciones de *B. bigemina* y *B. bovis* generalmente aparecen dos a tres semanas después de la infestación con garrapatas, sin embargo, con la inoculación directa en sangre, el período de incubación puede ser de tan sólo cuatro a cinco días para *B. bigemina* y de 10 a 12 días para *B. bovis* (CPSHF, 2008).

## 2.7 Epidemiología

Este concepto se basa en la coexistencia de tres factores; vector, parásito y hospedador, además, de estar condicionada por la presencia de factores bióticos y abióticos que afectan la transmisión (Benavides, 1992; Jonsson *et al.*, 2008; Regassa *et al.*, 2003). Estos factores interactúan entre si determinado la presencia de la babesiosis en una región (Guglielmone, 1995).

### 2.7.1 Estabilidad enzoótica

La Norma Oficial Mexicana NOM-019-ZOO-1994, Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus* spp. Define la Estabilidad enzoótica: como la condición en la que una gran proporción de la población animal es inmune a la babesiosis y se conserva un equilibrio entre el agente causal y el hospedero.

En estas zonas endémicas se presenta un equilibrio entre el número de vectores, la tasa de inoculación del agente y la calidad de respuesta del sistema inmune del bovino, cuya consecuencia es la manifestación de una inmunidad de hato y ausencia de problemas clínicos. Bajo estas circunstancias, la infección de los animales en una edad donde todavía poseen inmunidad pasiva suficiente para resistir la enfermedad, es un elemento clave del proceso (McCosker, 1981; García, 1989; Brown *et al.*, 1990; Solís, 1991). Ya que esta inmunidad, es transferida desde la madre, que perdura aproximadamente hasta los 9 meses de edad (Carrique *et al.*, 2000; Regassa *et al.*, 2003).

A partir de esta edad se desarrolla una inmunidad adquirida condicionada por la constante inoculación de parásitos, lo cual permitirá que el reto inmunológico permanente garantice a los hospedadores la ausencia de signos de la enfermedad (Bentancourt, 1996; Jonsson *et al.*, 2008).

Cuando la tasa de inoculación no es elevada para asegurar la transmisión continua del parásito, entre el vector y la población, pueden resultar brotes de babesiosis (Ramírez-Cruz *et al.*, 1997), esta situación es conocida como inestabilidad enzoótica. Aquí las infecciones se encuentran acompañadas de cuadros clínicos, además de la presencia de brotes epizoóticos, lo que desencadenara disminuciones en los sistemas de producción de carne y leche, déficit en la reproducción debido a la alteración en la calidad del semen y la generación de abortos, postración en animales de trabajo y finalmente, muerte del animal.

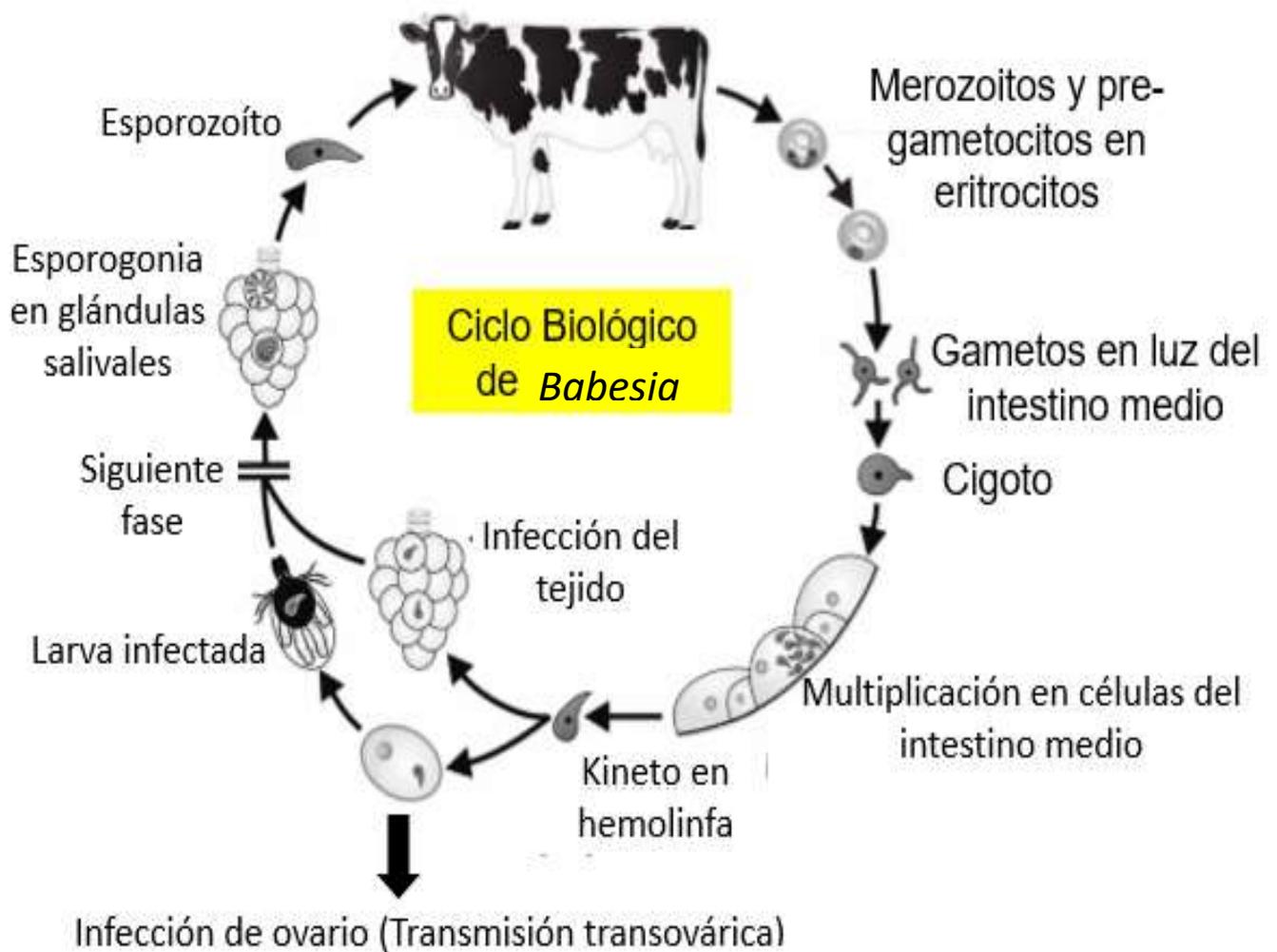
Aunado a este se presenta incremento en los costos de manejo del sistema de producción, debido al tratamiento con fármacos, atención médica veterinaria y además del control de vectores (Blood, 2002; Ogden *et al.*, 2005; Vieira y Sastre, 2007; Jonsson *et al.*, 2008).

Aunque los brotes de la babesiosis están relacionados con la primera exposición de los animales jóvenes al protozooario; hay evidencia de que el manejo, estado nutricional del hospedero y condiciones del ambiente son factores que contribuyen a la aparición de brotes de babesiosis (Mohamed y Yagoub, 1990; Jorgensen *et al.*, 1992; Payne y Scott, 1992.)

## **2.8 Ciclo biológico de *Babesia* spp.**

El ciclo biológico de la babesiosis es un proceso complejo formado por tres elementos: el vector, el parásito y el hospedero (Álvarez y Cantó, 1985). En donde se alternan dos fases reproductivas para el desarrollo del protozooario; una fase asexual que se desarrolla en los eritrocitos del hospedero vertebrado y una fase sexual en el hospedero invertebrado (Figura 6).

*Babesia* spp. utiliza estrategias de adaptación que le han permitido desarrollar interacciones de larga duración con sus hospedadores; la parasitemia baja en el vertebrado, así como la transmisión transovárica y transintestinal en la garrapata permiten una equilibrada dinámica que permite la persistencia de *Babesia* spp. a largo plazo en el ecosistema (Chauvin *et al.*, 2009).



**Figura 6.** Ciclo biológico de *Babesia* spp.

Fuente: Adaptado de Hajdušek *et al.* (2013).

El bovino se infecta durante la fase de ingurgitación de la garrapata por la inoculación de esporozoítos de *Babesia* spp. con la saliva. Los esporozoítos penetran directamente en los eritrocitos, donde se desarrollan todas las fases del parásito. Primero se producen dos merozoítos por fisión binaria (Chauvin *et al.*, 2009).

Los merozoítos producidos en los eritrocitos dejan la célula huésped e inmediatamente invaden a más eritrocitos produciéndose merogonias sucesivamente. La multiplicación es asíncrona y se puede presentar varias etapas de división del parásito en el torrente sanguíneo al mismo tiempo. Esta división asexual continúa indefinidamente hasta que el huésped muere o el parásito es eliminado (Hodgson, 1991; Chauvin *et al.*, 2009).

Cuando los eritrocitos infectados con *Babesia* son ingeridos por las garrapatas, la mayoría de los parásitos son destruidos, sin embargo algunos estadios del parásito sobreviven tales como los pre-gametocitos para posteriormente convertirse en gametocitos que se fusionaran en el lumen del tracto digestivo para formar un cigoto alargado de 8 a 10  $\mu\text{m}$  de longitud y contará con un organelo parecido al pico de una cabeza de flecha que facilitara la penetración hacia las células del intestino medio. Una vez que el cigoto se ha internalizado, este se transforma en una fase móvil, denominada oocineto. El oocineto escapa del epitelio del intestino medio e invadirá los tejidos del cuerpo de la garrapata incluyendo los ovarios donde muchos huevos serán infectados con el protozoario (transmisión transovárica). (Chauvin *et al.*, 2009; Vasco, 2013).

Posteriormente *Babesia* se multiplicara asexualmente, continuando como esporogonia y el desarrollo de numerosos kinetos; la infección con *Babesia* se va adquiriendo durante una etapa de la vida de la garrapata a la siguiente (transmisión transtadial) (Vasco, 2013). El desarrollo más significativo de *Babesia* ocurre cuando los kinetos invaden las células de la glándula salival para después convertirse en esporozoítos infectivos. Esto sucede dentro de las primeras 24 horas después de la fijación de la garrapata con el hospedero vertebrado, la diferenciación de los kinetos a los esporozoítos infectivos sucede a una estimulación en la alimentación o un estímulo de la temperatura de (37°C) (Dalglish J *et al.*, 1978). Los esporozoitos representan la fase infecciosa del parásito en el huésped mamífero. Los parásitos *B. bovis* generalmente pueden ser infecciosos dos a tres días posteriores a que se prenden a las larvas de las garrapatas y se pueden transmitir a través de las larvas. Por el contrario, *B. bigemina* madura

aproximadamente nueve días después de que la larva de garrapata se prende y sólo se transmite a través de ninfas y adultos (Vasco, 2013). Después de un complicado proceso miles de esporozoítos son formados en cada célula ascinar infectada de la glándula salival. Los esporozoítos maduran dentro de los primeros 5 días de que la garrapata comienza a alimentarse; este período es importante porque la mayoría de los esporozoítos llegan a infectar durante un período corto de alimentación en el hospedero invertebrado, transmitiéndose por medio de la saliva de la garrapata (Young y Morzaria, 1986).

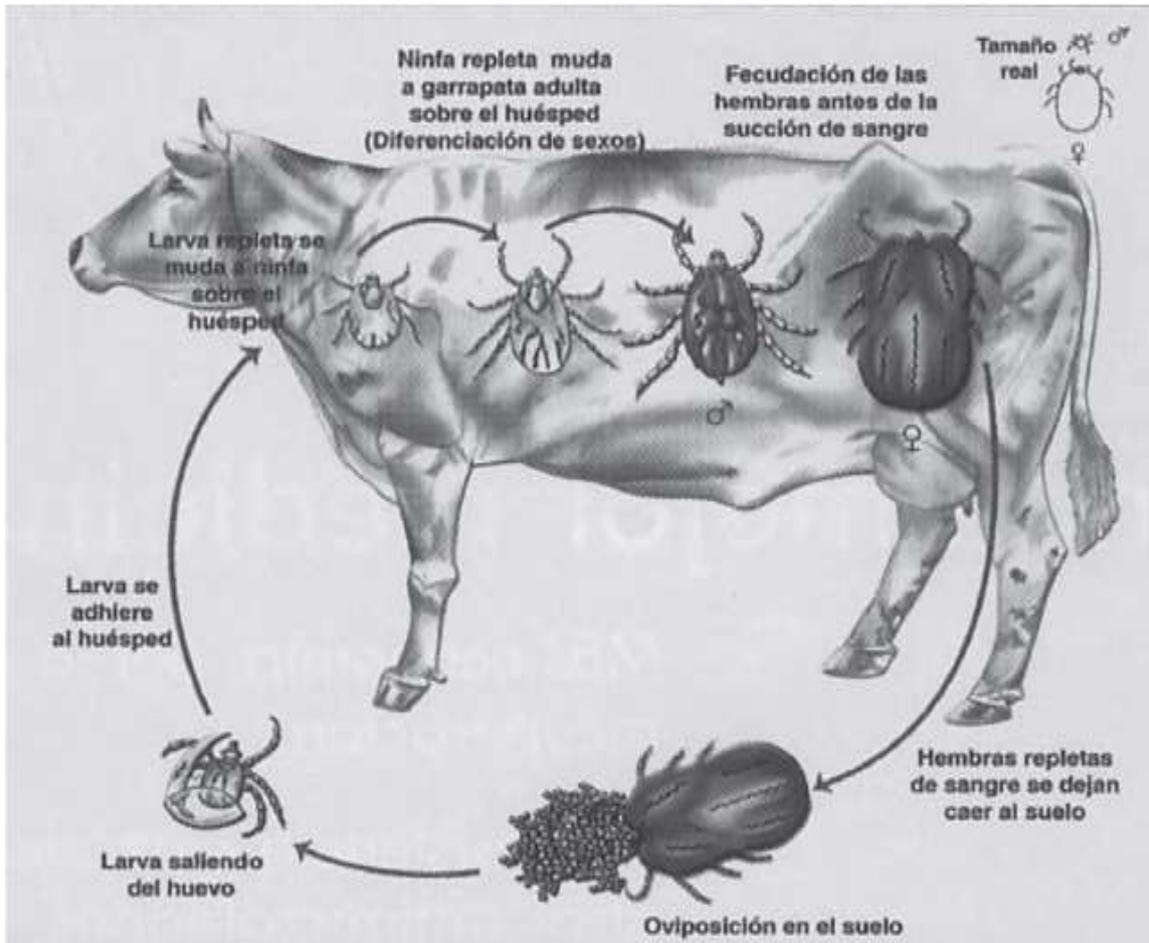
## **2.9 Generalidades sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

La garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es responsable de graves daños económicos causados por pérdida de sangre del bovino a través de las picaduras y alimentación de las garrapatas, lesiones a pieles y ubres, inyección de toxinas en la saliva de la garrapata, debilidad del ganado, mortalidad causada por las enfermedades que transmiten como la babesiosis, pérdidas en la ganancia de peso vivo, en la producción de leche y por el gasto en ixodicidas para su control (Fernández y García 1994). La garrapata presenta cuatro estadios biológicos de desarrollo: huevo, larva, ninfa y adulto.

1. Huevo: Los huevecillos son muy pequeños, miden en promedio 554µm de largo por 409µm de ancho (Gallardo y Morales, 1999).
2. Larva: Las larvas son de color rojizo y únicamente tienen 3 pares de patas; cuentan con el tamaño de 0.9mm, se les encuentra en masas en la tierra, en el pasto o en los potreros en que ha sido pastoreado el ganado infestado (Metcalf y Flint, 1982).
3. Ninfa: Las ninfas presentan la misma coloración que las larvas son más grandes y presentan un par adicional de patas (Metcalf y Flint, 1982).
4. Adulto: Poseen un capitulum corto y derecho. Las patas son de color amarillo pálido y existe un amplio espacio entre el primer par de patas y el hipostoma (aparato bucal). El cuerpo tiene forma entre ovalada y rectangular y el escudo es ovalado y más ancho en la porción anterior. El hipostoma es corto y derecho (CFSPH, 2007).

### 2.9.1 Ciclo de vida de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es una garrapata de un sólo hospedero; es decir, que pasa todos sus estadios de vida en un animal (CFSPH, 2007). El ciclo de vida de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, se muestra en la figura 7.



**Figura 7.** Ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, incluyendo los estadios dentro del hospedero y fuera del mismo.

Fuente: Rodríguez-Vivas *et al.* (2006).

Inicia con la eclosión del huevo ovopositado por la garrapata hembra en un sitio húmedo y protegido de la luz, del cual emerge la larva. Donde permanece resguardada para después buscar un hospedador del cual alimentarse (Waladde *et al.*, 1996). Una vez que las larvas se adhieren al hospedador ocurrirá la primera muda para convertirse en ninfa, esta fase se seguirá alimentando de la sangre del hospedador y ocurrirá una segunda muda e donde la garrapata se convertirá en la fase adulta (Sonenshine *et al.*, 2002; Anderson y Magnarelli, 2008). En esta fase se presenta la diferenciación sexual de las garrapatas y sucede el apareamiento, después de lo cual la garrapata hembra repleta de sangre cae del hospedador en donde busca un lugar húmedo y protegido en el cual poner sus huevos, después de la ovoposición la garrapata hembra muere completando así el ciclo de vida de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Waladde *et al.*, 1996; Sonenshine *et al.*, 2002; Anderson y Magnarelli, 2008).

## **2.10 Morbilidad y Mortalidad**

Los índices de mortalidad son altamente variables. El tratamiento y la exposición previa a la vacunación, como así también la especie y cepa del parásito, pueden afectar el resultado. Los bovinos pueden desarrollar una resistencia de por vida a una especie después de la infección; también se puede observar cierto grado de protección contra otras especies de *Babesia* (CFSPH, 2008). Sin embargo, esto también dependerá del estado fisiológico del animal, edad, sexo, condición corporal, nutrición, lugar de procedencia, entre otros. Se tiene conocimiento que en zonas endémicas donde la transmisión de garrapatas es elevada durante toda el año, los animales tiende a contraer la infección cuando son jóvenes, creando una inmunidad adquirida volviéndolos inmunes, sin embargo, este equilibrio puede verse alterado, debido a factores como; cambio de clima y si se realizan tratamientos acaricidas que disminuirían la cantidad de garrapatas por lo cual, los animales no se infectaran durante el periodo inicial crítico generando brotes de la enfermedad (Ramírez-Cruz *et al.*, 1997) .

La susceptibilidad a la enfermedad varía según la raza y sus cruzas. *Bos indicus* y las cruzas de *B. indicus* con *Bos taurus* son más resistentes que *B. taurus*. En razas

totalmente susceptibles, es posible que muera hasta más del 50% de los animales adultos no tratados y hasta el 10% de los animales tratados (CFSPH, 2008).

## **2.11 Patogenia**

En la babesiosis se pueden desarrollar diferentes tipos de acciones patógenas, tales como: acción mecánica (ruptura de glóbulos rojos); acción tóxica (liberación y excreción de productos tóxicos tras el metabolismo de los zoítos, demostrada a nivel de SNC) y acción expoliadora en cuanto compete por determinadas sustancias del organismo hospedador como es el caso de la hemoglobina en los eritrocitos (Cordero del Campillo, 1999).

Las cepas virulentas de *B. bovis* provocan un síndrome de shock ocasionado por la hipotensión, combinado con inflamación generalizada, no específica; trastornos de la coagulación y secuestro de los eritrocitos en los capilares; en cambio con las cepas de *B. bigemina*, los efectos patogénicos se relacionan más con la lisis de eritrocitos (Manual Merck de Veterinaria, 2007).

Las infecciones con *B. bovis* son más patógenas debido a la signología nerviosa que sugieren un mal pronóstico. Sin embargo, las infecciones con *B. bigemina* que presenten hemoglobinuria presentan un pronóstico reservado (CFSPH, 2008).

Si el animal sobrevive se convierte en portador, tiempo en el cual se mantiene una infección subclínica inocua mediante un delicado equilibrio inmunológico entre protozoarios y anticuerpos (Blood *et al.*, 1987).

### **2.11.1 Fisiopatología de la fiebre**

Uno de los signos clínicos principales y característicos de la babesiosis es el aumento de la temperatura. En los bovinos los rangos normales de temperatura van de 38 a 40°C, dependiendo de diversos factores, como la raza, edad y el ambiente en el que se encuentre localizado; la fiebre o pirexia es la alteración o adaptación de la termorregulación normal, como respuesta a reacciones sistemáticas o infecciosas (Trigo y Valero, 2004).

La fiebre es provocada por una variedad de pirógenos como; complejos inmunitarios, causas de inflamación, fármacos o exposición a microorganismos tales como lo son *B. bovis* y *B. bigemina*. Estos agentes estimularan la producción de pirógenos endógenos, estos pueden ser liberados por células de la línea monocito- macrofágica (Johnson, 1996) o por citoquinas circulantes tales como; la interleuquina 1 $\alpha$  y  $\beta$ , la interleuquina 6, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$  y el interferón  $\alpha$  y  $\beta$ .

Los efectos producidos por la citoquina circulante son; aumento de la quimiotaxis, aumenta de la capacidad oxidativa, estimulación la producción de linfocitos B y anticuerpos, aumento de capacidad citotóxica de linfocitos T (Matthew, 1991) las observaciones *in vitro* sugieren que la fiebre desempeña una importante función en la potenciación de la respuesta inmune (Alpizar y Medina, 1999).

Estas citoquinas circulantes interactúan con elementos sensoriales en el órgano vascular de la lámina terminal donde se promueve la síntesis de prostaglandinas E<sub>2</sub> que se difundirán a través de la barrera hematoencefálica hasta el área pre-óptica del hipotálamo produciendo la liberación de citoquinas (Blatteis, 1992; Moltz, 1993).

Cuando aumenta el umbral de temperatura, el animal inicia la respuesta para conservar y producir calor hasta que la temperatura del cuerpo alcanza el nuevo umbral. La vasoconstricción periférica, la piloerección y la conducta para amontonarse son características del comienzo de la fiebre. Cuando se alcanza el nuevo umbral, el animal mantiene su cuerpo a la nueva temperatura hasta que los pirógenos se metabolizan y cesa su producción. Cuando esto ocurre, el umbral vuelve a descender a su nivel normal y el animal inicia los mecanismos para perder calor como la vasodilatación y la sudoración para disminuir la temperatura corporal (Bradley, 2014).

La aparición de signos clínicos es paralela al aumento de parasitemia. La temperatura rectal alcanza un máximo de 41 a 41.5°C, dos o tres días después que la parasitemia es destacable (Mahoney, 1977; Purnel, 1981); por su parte Callow y Pepper en 1974, encontraron una fuerte correlación estadística entre la parasitemia y la fiebre, por cada pico de parasitemia se produce un aumento en la temperatura

rectal. Acompañando este incremento en la temperatura, el hospedero bovino empieza a mostrar signos de desasociado, anorexia, debilidad, cese de la motilidad ruminal y disminución de la producción láctea (Mahoney, 1977; Blood, 1979). La fiebre acompaña a la sintomatología clínica hasta que la temperatura decrece a niveles subnormales, lo cual ocurre 24 horas antes de la muerte (Callow y M'cGavin, 1963; Aragón, 1976).

### **2.11.2 Fisiopatología de la anemia**

En la babesiosis de los bovinos se hace presente una anemia que en la mayoría de los casos no es proporcional al número de eritrocitos parasitados, por lo que se sigue que la anemia tenga un origen inmunológico (Morilla-González, 1981). Los eritrocitos parasitados por *B. bovis* tienden a pegarse entre sí, provocando trombos en capilares pequeños pertenecientes al SNC provocando una neurología nerviosa (Wright, 1972).

Este fenómeno está ausente en las infecciones ocasionadas por *B. bigemina* en la que los signos clínicos generados son atribuidos a una anemia hemolítica.

Diversos autores han sugerido que la anemia puede ser ocasionado por diversas causas como: la adhesión del antígeno de *Babesia* a la superficie del eritrocito, lo cual provoca que estos sean reconocidos como cuerpos extraños y sean fagocitados por el sistema fagocítico mononuclear (Curnow, 1968; Morilla, 1972; Jennings, 1976).

La fagocitosis de los eritrocitos no infectados, se debe a que se adhieren antígenos de la *Babesia*, y también al incremento de la actividad en el sistema fagocítico mononuclear, que ocurre durante la babesiosis, así como los cambios en la membrana, que dan como resultado alteraciones en la forma e incremento de la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos no infectados, lo cual, los predispondría a una lisis espontánea, particularmente en los capilares sanguíneos (Wright, 1973).

## 2.12 Signos clínicos

Los signos clínicos varían según la edad del animal y la especie y cepa del parásito (CFSPH, 2008). Generalmente *B. bovis* presenta una patogenicidad más alta que *B. bigemina*. Las infecciones se caracterizan por fiebre alta, ataxia, anorexia, shock circulatorio general y signología nerviosa debido al secuestro de eritrocitos parasitados en los capilares cerebrales. En casos agudos el porcentaje de eritrocitos parasitados en la sangre circulante es menor al 1%. Esto contrasta con las infecciones por *B. bigemina*, donde la parasitemia excede del 10% y puede llegar a un 30% (OIE, 2014).

Los animales infectados por *B. bigemina* desarrollan anorexia. Los signos clínicos característicos son debido a la hemólisis y a la anemia; además, los animales presentan cambios en su comportamiento, pierden el apetito, se rezagan del hato, se muestran deprimidos y se rehúsan a moverse.

Las membranas mucosas se presentan pálidas además de evidencia de taquicardia y taquipnea. Generalmente se desarrolla anemia con rapidez, que suele estar acompañada por hemoglobinuria y hemoglobinemia (CFSPH, 2008), este tipo de sintomatología se presenta en co-infecciones con *Anaplasma marginale*. Y esta ocasionada debido a la lisis de los eritrocitos y a la presencia de hemoglobina libre, la cuenta de hematíes puede descender a 1 o 2 millones de eritrocitos por mm<sup>3</sup> de sangre. Se ha considerado que los signos clínicos de la anemia no son los responsables de la muerte, sino que está asociado a la liberación de metabolitos del parásito provocando la activación de mecanismos fisiológicos que generan una inflamación generalizada, shock y muerte del animal (Quiroz, 2000). En los casos subagudos puede presentarse ictericia. También se puede observar diarrea o estreñimiento a la par se puede manifestar un síndrome de insuficiencia respiratoria con disnea en animales afectados gravemente. La fiebre puede ocasionar abortos en vacas preñadas y los toros presentan una baja en la fertilidad (CFSPH, 2008).

Las infecciones con *B. bovis* son similares, pero presentan una gravedad mayor, sin embargo, la hemoglobinuria y hemoglobinemia son muy poco frecuentes. Además los eritrocitos infectados pueden quedar secuestrados en los capilares cerebrales, lo que deriva en una signología nerviosa, ataxia, rechinar de dientes y delirio. Parte del ganado bovino se puede presentar postrado con movimientos involuntarios en miembros posteriores; se ha observado que la mayoría de los animales con signos nerviosos mueren (CFSPH, 2008).

### **2.13 Inmunología**

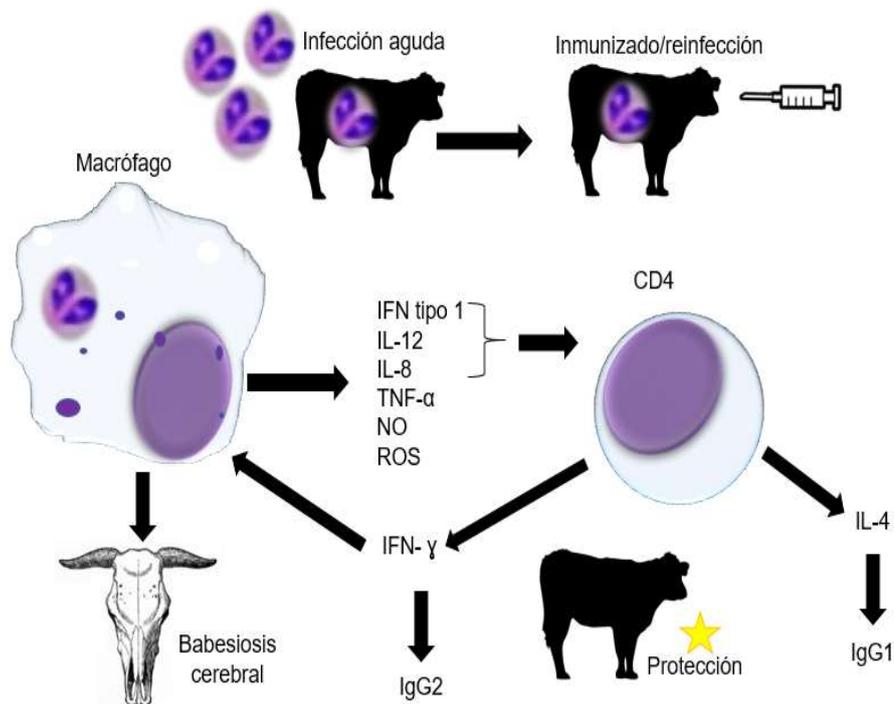
A pesar de los avances existentes, todavía se desconocen algunos aspectos de la respuesta inmune en los bovinos. Se sabe que estos rumiantes difieren del humano y de otros animales en la forma de transferencia de inmunidad materna, en el contenido y composición de inmunoglobulinas en calostro y leche, ya que debido a su estructura placentaria no hay paso de las inmunoglobulinas (García-Tapia *et al.*, 2003).

Se ha observado que en infecciones por hemoprotozoarios se ven involucradas tanto la inmunidad innata como la inmunidad adquirida. La inmunidad adquirida es resultante de la inmunización o de la infección constante al parásito (Fell y Smith, 1998).

Durante la infección aguda se genera una respuesta inmunológica innata (Figura 8), donde sucederá la activación de macrófagos debido al parásito, produciendo citoquinas pro-inflamatorias y productos de factores solubles tales como óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS). El tiempo y los niveles de producción de estas moléculas serán las encargadas de la solución de la infección y a la vez de la función fagocítica de los macrófagos contra el parásito, llevando a la recuperación de la enfermedad aguda y a una infección persistente. Sin embargo, la sobreproducción de citoquinas inflamatorias como el Factor de necrosis tumoral (TNF) podría provocar una severa patología, resultando en una babesiosis cerebral y, por último, la muerte.

En el caso de bovinos que se hayan recuperado de la fase aguda, estos presentaran una inmunidad adquirida, que se encuentra relacionada con estimulación del interferón (IFN-  $\gamma$ ) producida por las células CD4, a su vez el IFN-  $\gamma$  generara a los macrófagos los cuales producirán citoquinas tales como; IFN-I, IL-12, IL-18 y TNF-  $\alpha$ . La primera de ellas activa a las células NK para producir altos niveles de IFN- $\gamma$ , así mismo promueve la diferenciación de Th2 para producir IL-4. Se reactivan los macrófagos y la IL-4 induce a los linfocitos B para la producción de IgG1 e IgG2 (Brown y Palmer, 1999).

Se sabe que los bovinos infectados que se hayan recuperado de una infección aguda, desarrollarán una inmunidad de por vida frente a la reinfección con las mismas especies volviéndose resistente a la enfermedad clínica (Bock *et al.*, 2008). La respuesta inmune adaptativa es la respuesta subsecuente a la presentación de antígenos del parásito (Brown y Palmer, 1999; Homer *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001b).



**Figura 8.** Mecanismos postulados de la inmunidad innata y adquirida contra *B. bovis* y *B. bigemina*.

Fuente: Adaptado de Brown y Palmer (1999).

## **2.14 Lesiones *post mortem***

En los hallazgos *post mortem* se pueden observar las membranas mucosas generalmente pálidas y pueden presentar ictericia; la sangre puede parecer diluida y acuosa; también puede aparecer ictericia en el omento, grasa abdominal y tejidos subcutáneos. El bazo se agranda notoriamente con una consistencia pulposa y friable y una coloración oscura. El hígado puede estar agrandado con una coloración oscura o ictérica y la vesícula biliar distendida con bilis espesa y granular. Los riñones generalmente tienen un color rojo oscuro o negro y la vejiga generalmente contiene orina rojiza amarronada; sin embargo, en algunos casos, la orina puede ser normal. Ocasionalmente, los pulmones presentan signos de edema pulmonar. Otros órganos, incluido el corazón y el cerebro, pueden presentar petequias o equimosis, o estar congestionados y la superficie del cerebro puede tener un aspecto rosado (CFSPH, 2008).

## **2.15 Métodos de control para la babesiosis bovina**

Para el control de esta enfermedad se han tomado en cuenta actividades de integración dirigidas hacia; el vector, el parásito y el hospedero (Álvarez, 1991).

### **2.15.1 Control del vector**

Este método consiste en romper el ciclo de transmisión de la enfermedad, este se puede lograr mediante la aplicación de acaricidas al hospedador. Este procedimiento llega a ser rutinario para el control profiláctico de un sistema de producción. A pesar de que el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se basa en el uso de acaricidas, estos químicos ya no son confiables y viables, debido a que ha existido un uso indiscriminado, propiciando a que este género de garrapata haya desarrollado una resistencia contra todos los productos químicos utilizados para su control. Aunado a las desventajas al utilizar este tipo de controles se encuentran preocupaciones; debido al manejo de los residuos de los pesticidas en la carne para consumo humano y repercusiones en el ambiente (Kemp *et al.*, 1991).

### **2.15.2 Control en la movilización del ganado**

La movilización en el ganado es recomendada cuando se desea evitar que animales procedentes de hatos infectados con garrapatas o portadores de la enfermedad sean introducidos a áreas libres (Osorno, 1978). En México la campaña nacional contra la garrapata *Boophilus* spp. indica que los animales originarios de zonas en control o en erradicación podrán moverse siempre y cuando se cumplieran con algunos requisitos, tales como la presentación de una constancia de tratamiento garrapaticida.

### **2.15.3 Uso de ganado resistente**

Las razas *B. indicus* han demostrado una mejor resistencia contra las garrapatas en comparación con las razas *B. taurus*. Se estima que el ganado *B. indicus* presenta del 10 al 20% menos garrapatas que el ganado *B. taurus* (Jonsson, 2006). Estos animales desarrollan una inmunidad a la infestación con garrapatas, generando una estabilidad endémica favoreciendo a que las pérdidas del ganado local sean insignificantes. Un inconveniente es la baja productividad de este ganado esto ha conducido al uso de ganado de tipo europeo encastado con cebuino (Ramírez-Cruz *et al.*, 1997).

### **2.15.4 Inmunización**

La inmunización contra *Babesia* spp. es el procedimiento que ofrece las mejores perspectivas para el control y protección para la solución contra el complejo problema de la babesiosis bovina (Ramírez-Cruz *et al.*, 1997).

Se ha realizado en el organismo del bovino una premunición, este método consiste en la transferencia de sangre de un bovino recuperado o portador del parásito a bovinos susceptibles. La sangre de estos animales inducirá, reacciones menos severas en los receptores que la de animales con casos sintomáticos (Callow y Tammemagi, 1967).

También se han elaborado vacunas empleando parásitos muertos con resultados variables en diferentes intentos para inducir inmunidad; estas vacunas se han usado solo experimentalmente y los desafíos han sido con cepas análogas (Ramírez-Cruz *et al.*, 1997).

Asimismo, se han utilizado como control de la enfermedad la exposición de parásitos atenuados, para promover una respuesta inmune (García *et al.*, 2003). La presentación de reacciones postvacunales intensas y la necesidad de tratamiento terapéutico encausaron la investigación hacia la atenuación de cepas de *Babesia*, para lo cual se han utilizado los pases rápidos en becerros esplenectomizados y la radiación a fin de no hacer patogénicos a los parásitos pero manteniendo su inmunogenicidad (Ramírez-Cruz *et al.*, 1997). En México el INIFAP ha desarrollado una vacuna mixta atenuada contra *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, utilizando una clona irradiada de *B. bovis* y una cepa de *B. bigemina* que ha sido atenuada por un número indefinido de pases en cultivo *in vitro* (Rodríguez, 1985; Vega *et al.*, 1985).

## **2.16 Tratamiento**

La quimioterapia de la babesiosis es importante para el control de la enfermedad ya sea para tratar casos de campo o para el control de infecciones experimentales (Rodríguez y Trees, 1996). En el pasado se enfocaba más en la erradicación de la enfermedad que en el tratamiento mismo del ganado infectado por babesiosis, principalmente en países donde el objetivo principal es la erradicación de la garrapata; sin embargo, la quimioterapia ha sido importante para el control y prevención de la babesiosis (Kuttler, 1981). En áreas endémicas, los animales enfermos deberían ser tratados lo más rápido posible con fármacos antiparasitarios. El éxito del tratamiento dependerá del diagnóstico temprano y la pronta administración del fármaco efectivo (Vial y Gorenflot, 2006). Dentro de los componentes efectivos contra *Babesia* spp. destacan los derivados de la diamidina y el dipropionato de imidocarb. El uso de este tipo de drogas está dirigido a la eliminación del hemoparásito en el huésped (Solorio y Rodríguez 1997a); sin embargo, en casos severos de la enfermedad puede ser necesaria una terapia de

apoyo como transfusiones de sangre, medicamentos antiinflamatorios, eliminación de garrapatas, preparaciones de hierro, dextrosa, vitaminas (complejo B) y fluido terapia (Kuttler, 1981; Zintl *et al.*, 2003).

### **2.17 Hematocrito**

Siendo la babesiosis una enfermedad en donde el protozoo lleva su ciclo biológico dentro del eritrocito, es común y concordante que los signos clínicos de esta enfermedad estén asociados alteraciones con células de la serie roja. Las células suelen constituir de un 30 a 60% del volumen de la sangre (según la especie). La fracción de células que componen a la sangre se denomina hematocrito y se determina centrifugando una determinada cantidad de sangre a la que se ha añadido anticoagulante. Las células son más pesadas que el plasma; por tanto, se depositan en el fondo del tubo durante la centrifugación, por lo que el hematocrito también se llama volumen de células empaquetadas; esta técnica proporciona datos importantes para el diagnóstico de enfermedades (Bradley, 2014). Durante el transcurso de la enfermedad el hematocrito del bovino descenderá gradualmente a partir la infección, este descenso está relacionado con el incremento exponencial de eritrocitos parasitados y con la disminución de temperatura rectal, en los bovinos el rango normal de hematocrito es de 30 a 40% (Calzada *et al.*, 2002).

### **2.18 Diagnóstico**

El diagnóstico de la babesiosis bovina es una herramienta importante para el control y prevención de la propagación de la enfermedad (Mosqueda *et al.*, 2012). De otra forma el realizar diagnósticos diferenciales permitirá lograr una mejor identificación del agente causal. La rabia parálitica bovina pueden considerarse entre los diagnósticos diferenciales, particularmente si se sospecha de *B. bovis* (Ramírez-Romero *et al.*, 2011). El diagnóstico se puede llevar a cabo mediante la observación de los signos clínicos (Carrique y Ribera, 1999), además de uso de pruebas de laboratorio, tales como; pruebas serológicas, moleculares de laboratorio y examen microscópico (Tabla 3).

**Tabla 3.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la babesiosis bovina y su propósito.

Propósito						
Métodos	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección-vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente						
Examen microscópico	-	+	-	+++	-	-
PCR	-	+++	-	+++	-	-
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	+++	+	+++	-	+++	+++
IFI	+	-	-	-	++	+++

Clave: +++: método recomendado; ++: método idóneo; +: puede utilizarse en algunas situaciones, pero el costo, la fiabilidad entre otros factores limitan mucho su aplicación; -: no adecuado para este propósito.

Fuente: Adaptado de OIE (2014).

Los parásitos de *Babesia* pueden identificarse debido a los diferentes estadios que presentan en el hospedero vertebrado y en el hospedero invertebrado. Siendo de gran ayuda para la realización de métodos de diagnósticos directos (Mosqueda *et al.*, 2012).

## **2.18.1 Métodos directos**

### **2.18.1.1 Frotis sanguíneo**

Es una de las formas directas de diagnóstico en observación de parásitos mediante la elaboración y examen microscópico del extendido sanguíneo teñido. Se recomienda siempre para el diagnóstico de hemoparásitos que la toma sanguínea se haga de los capilares auriculares o caudales. Se utilizan dos tipos de extendidos sanguíneos: los extendidos gruesos y los delgados, proporcionando cada uno de ellos distinta información, los de tipo grueso permiten examinar una mayor cantidad de sangre, lo cual aumenta la probabilidad de detectar infecciones leves, en los extendidos delgados las características morfológicas de los parásitos sanguíneos se observan mejor (Domínguez, 1992). Se puede recurrir a las tinciones de tipo Romanowsky y las modificadas de esta (Giemsa, Leishman, Wright) (Solorio y Rodríguez, 1997b).

### **2.18.1.2 Impronta cerebral**

La técnica consistirá en tomar una muestra pequeña de materia gris de la corteza cerebral post mortem, se colocará en el portaobjetos, se fija con metanol, se tiñe con Giemsa y se visualiza en el microscopio (Ristic, 1981). Casi el 100% de eritrocitos presentes en los capilares del cerebro se encontrarán infectados (Uilenberg, 1972).

### **2.18.1.3 Prueba de hemolinfa**

Se trata de identificar hembras de garrapatas infectadas con *Babesia*, esta prueba se basa en la detección de los kinetos siendo un estadio de las células sexuales durante el ciclo biológico de *Babesia*, estos kinetos se observarán en la hemolinfa de la garrapata. Para esta técnica, un artejo de la garrapata es cortado con tijeras pequeñas para obtener una gota de hemolinfa. Esta es colocada en un portaobjetos esta es secada, fijada y teñida con Giemsa. Se visualizará al microscopio tratando de hallar los kinetos (Mosqueda *et al.*, 2012).

#### **2.18.1.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Las pruebas diagnósticas basadas en ácido nucleico son muy sensibles y confiables, en específico para la detección de *B. bovis* y *B. bigemina* en bovinos infectados (Buling *et al.*, 2007; Criado-Fornelio, 2007).

Se ha demostrado que el diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ofrecen una sensibilidad 1000 veces mayor a comparación de los métodos por microscopia para la detección de *Babesia* spp. permitiendo una detección del parásito en parasitemias de entre el 10<sup>-3</sup> % y el 10<sup>-7</sup> % (1 parásito por cada 10<sup>9</sup> hematíes) (Criado-Fornelio, 2007).

#### **2.18.2 Métodos indirectos**

##### **2.18.2.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), originalmente se utilizó para estudios de *B. equi* y *B. caballi*, posteriormente se ha utilizado para la detección de anticuerpos contra *Babesia* spp. en sueros; desde entonces, se ha considerado como una excelente prueba de diagnóstico en bovinos portadores asintomático, por su alta sensibilidad y alta especificidad (>90,0%). Esta técnica está basada en la capacidad de la globulina del anticuerpo en combinarse químicamente con un colorante fluorescente o fluorocromo, sin perder su reactividad inmunológica.

La reacción se visualiza al ser iluminada con luz ultravioleta de alta intensidad. Los sueros diagnosticados como positivos son aquellos en los que se observa el parásito con una coloración fluorescente (Domínguez, 1992).

##### **2.18.2.2 Prueba de ELISA**

Es la unión covalente de enzimas a las moléculas de los anticuerpos produciendo una herramienta inmunológica que posee alta especificidad y alta sensibilidad, la técnica llamada Ensayo por inmovilización ligada a enzimas (ELISA), utiliza los anticuerpos a los que se han enlazado covalentemente las enzimas de modo que

quedan sin alteración las propiedades catalíticas de la enzima y la especificidad del anticuerpo. Las enzimas enlazadas, típicamente incluyen peroxidasa, fosfatasa alcalina y galactosidasa, todas las cuales catalizan reacciones cuyos productos son de color y se pueden determinar en cantidades muy pequeñas (Otte, 1992).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ya ha pasado un siglo desde el primer reporte de la enfermedad; sin embargo, las opciones quimioterapéuticas para el control son limitadas, debido a que en México no se encuentran métodos profilácticos disponibles comercialmente y pocos métodos de detección son accesibles, confiables y rápidos. Es importante mencionar que en México existe una vacuna viva atenuada con cepa de *B. bovis* irradiada y una cepa de *B. bigemina*, las cuales han demostrado que confieren una protección del 80% para animales inoculados experimentalmente con el protozooario y un 70% para animales bajo condiciones extremas de campo. Cabe mencionar que esta vacuna no se encuentra comercialmente disponible, es por ello que aún no se cuenta con procedimientos profilácticos que confieran inmunidad total contra la babesiosis bovina (Cantó *et al.*, 1996; Figueroa *et al.*, 1998; Cantó *et al.*, 1999; Cantó *et al.*, 2002).

Por otra parte, la detección por microscopia en frotis sanguíneo sigue siendo de los métodos diagnósticos más recurridos para la identificación de *Babesia* spp. pero los resultados se ven limitados a la fase aguda de la enfermedad, a la par existen métodos serológicos y moleculares, que brindan una mejor especificidad y sensibilidad, tal es el caso; de la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR); sin embargo, estas pruebas no son del todo accesible en nuestro país debido a la baja disponibilidad de los antígenos, alto costo del material para llevar a cabo las técnicas y desconocimiento de la existencia de los propios métodos diagnósticos.

Por lo que con la realización de este trabajo se busca con la inoculación de *B. bovis* y *B. bigemina* en bovinos esplenectomizados observar signología clínica asociada los protozoarios, esperando obtener porcentajes de eritrocitos parasitados más elevados a lo que se observa en procesos de la infección natural lo que permitirá la obtención y conservación de la cepa del agente para futuras investigaciones, además de preservarla dentro del germoplasma de la unidad de babesiosis. Así mismo, se podrá aprovechar para la obtención material biológico indispensable para realizar técnicas serológicas y moleculares que ayuden a la instrumentación

de nuevas técnicas diagnósticas para la identificación de *B. bovis* y *B. bigemina*, además, se brindará una mejor interpretación y conocimiento del curso de la enfermedad.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La producción animal representa para México una actividad económica importante, a nivel mundial; México ocupa el 7° lugar en producción de ganado bovino. Sin embargo, el problema de la babesiosis bovina sigue siendo un factor importante que afecta la productividad e impulso económico de la ganadería en México. Tan solo las pérdidas económicas provocadas por el vector *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alcanzan los \$ 573'608,076 dólares (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017). Por otra parte, reportes del SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) han registrado el inventario total de la población nacional de bovinos de carne y leche, durante el 2017 siendo de 33,779,290 cabezas de ganado. A la par, la campaña nacional de control de la garrapata de la fiebre del ganado bovino en México informo que el 65% de territorio nacional esta infestado con *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Basado en esta información, 23,316,000 cabezas de ganado vacuno equivalentes al 75% de la población total del país están en riesgo de adquirir babesiosis. Esto supone para México, realizar constantes investigaciones, para el manejo profiláctico, control y diagnóstico de la enfermedad. Tal es el propósito de este trabajo, con la experimentación realizada con bovinos esplenectomizados e inoculados con *B. bovis* y *B. bigemina* se podrá obtener material biológico necesario para el diagnóstico de *Babesia* spp. además de que se podrá conservar y obtener la cepa del agente para futuras investigaciones. Al igual que se visualizara la signología y parámetros clínicos, lo cual nos ayudara a la mejor comprensión y estudio de esta enfermedad.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

- Realizar un monitoreo clínico en los bovinos esplenectomizados e inoculados experimentalmente con las cepas de *B. bovis* y *B. bigemina*

### 5.2 Objetivos específicos

- Observar la sinología clínica asociada a la babesiosis bovina, producida por *B. bovis* y *B. bigemina*, considerando para ello el registro de los parámetros; temperatura rectal, hematocrito y detección del parásito en frotis sanguíneo.
- Obtener un alto índice de eritrocitos parasitados con *B. bovis* y *B. bigemina* en los bovinos esplenectomizados, para uso como material biológico, necesario para realizar métodos serológicos y moleculares para investigaciones posteriores.
- Conservar las cepas virulentas de campo, de *B. bovis* y *B. bigemina*.

## **VI. HIPÓTESIS**

Los becerros esplenectomizados e inoculados experimentalmente con *B. bovis* y *B. bigemina* desarrollarán un cuadro clínico correspondiente a la enfermedad y un porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) mayor al 0.5% para cada una de las cepas del protozoario.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Materiales

#### 7.1.1 Material de campo

- Botas
- Overol
- Manga de manejo
- Termómetro

#### 7.1.2 Material de laboratorio

- Micropipeta de 0.5-10  $\mu$ l
- Micropipeta de 20-200  $\mu$ l
- Micropipeta de 200-1000  $\mu$ l
- Puntas de 10  $\mu$ l
- Puntas de 200  $\mu$ l
- Puntas de 1000  $\mu$ l
- Tubos de Eppendorf de 2ml
- Giemsa
- Portaobjetos
- Microscopio óptico
- Tubos con EDTA
- Centrifuga
- Capilares

#### 7.1.3 Materiales para la técnica de IFI

- Antígeno: Laminillas con 4% de eritrocitos parasitados de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*

- Muestras de suero bovino obtenidas durante la pre y post inoculación de los dos bovinos inoculados
- Conjugado Anti-IgG de bovino en cabra ALEXA fluor 488
- Solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS) con pH: 7.2.
- Agua destilada.
- Perlas de sílice.
- Acetona.
- Caja de Coplin de vidrio.
- Vaso de Coplin.
- Lápiz graso.
- Micropipetas y puntas estériles y desechables.
- Cámara húmeda.
- Incubadora.
- Agitador.
- Microscopio de epifluorescencia.

#### **7.1.4 Material biológico**

- Dos bovinos, *Bos taurus* de 6 meses de edad
- Cepa virulenta (Chiapas) de *B. bigemina*
- Cepa virulenta (Tamaulipas) de *B. bovis*

#### **7.2 Método**

Para la inoculación experimental, se emplearon dos becerros *Bos taurus* (064 y 067) de aproximadamente dos meses de edad, pertenecientes al Centro Nacional de

Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-SAI del INIFAP). Estos animales se encontraron libres de garrapata y de anticuerpos contra *Babesia* spp. Previamente fueron esplenectomizados y posteriormente inoculados vía intramuscular utilizando cepas virulentas procedentes de un aislado de campo de *Babesia bovis* (Chiapas) la cual fue inoculada en el bovino 064 y *Babesia bigemina* (Tamaulipas) que fue para el bovino 067.

Posteriormente los bovinos fueron monitoreados durante 14 días post inoculación (PI) y durante el transcurso de la enfermedad para la determinación de los valores de temperatura rectal (TR), volumen celular aglomerado (VCA) mediante la técnica de hematocrito (Hto) y porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP). Además, se recolectaron durante los días PI sangre para la obtención de suero de ambos bovinos para la cuantificación de anticuerpos anti-*B. bovis* y anti-*B. bigemina* mediante la técnica de IFI.

### **7.2.1 Método de campo**

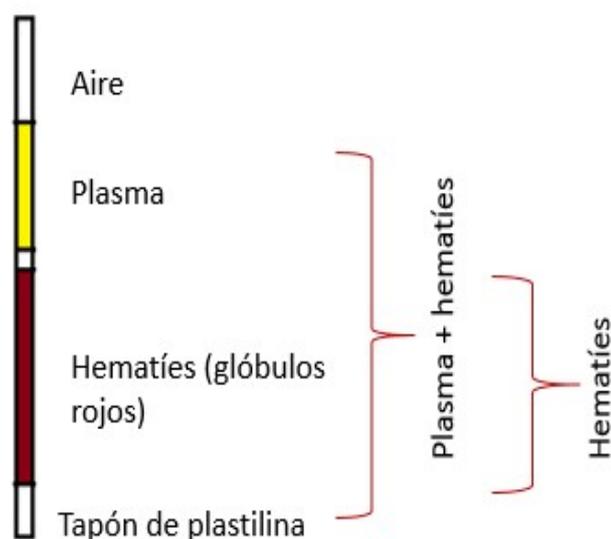
Se realizó el muestreo individual de ambos bovinos mediante el procedimiento de venopunción en la región coccígea en donde se utilizaron tubos vacutainer con anticoagulante (EDTA), y tubos sin anticoagulante. Cada muestra fue identificada y llevada al laboratorio en refrigeración.

### **7.2.2 Método de laboratorio**

Las muestras se utilizaron para realizar frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, para la identificación mediante microscópico óptico de *B. bovis* y *B. bigemina*, y para la determinación de VCA mediante la técnica de Hto; por otra parte, se utilizó el suero recolectado de los tubos sin anticoagulante para la realización de la prueba de IFI, en donde se utilizó antígeno derivado de cultivo *in vitro*.

### 7.2.3 Volumen Celular Aglomerado (VCA)

La técnica consistió en llenar el capilar con sangre venosa, posteriormente se centrifugo por 5min, el porcentaje del hematocrito se calculó mediante una regla de tres, tomando en cuenta los centímetros de plasma más los hematíes y los centímetros solo de los hematíes (Figura 9).



**Figura 9.** Dibujo de un hematocrito.

Fuente: elaboración propia

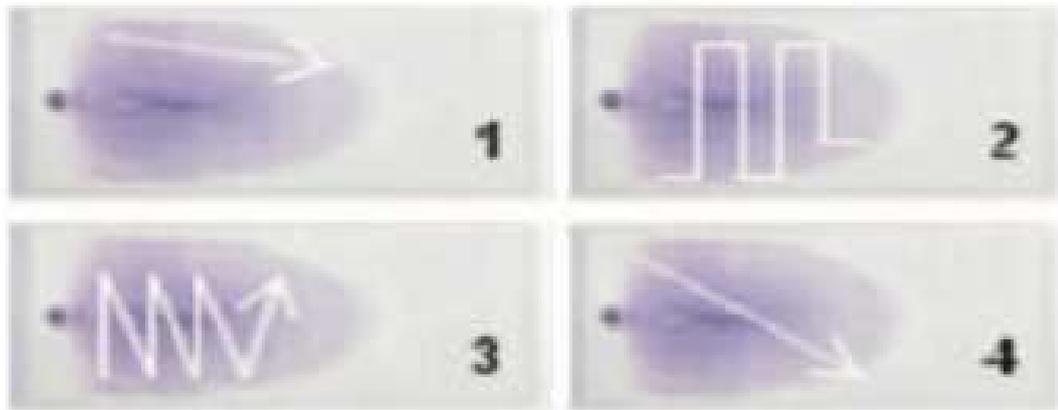
### 7.2.4 Frotis sanguíneo

Este método es necesario para la visualización de la morfología de los parásitos y para conocer el grado de infección que presenta el hospedador. Para la elaboración de frotis y para facilitar el conteo de eritrocitos parasitados, se recomienda tomar una muestra de eritrocitos sedimentados tratando de que no se mezclen con el sobrenadante. Se requiere de 1-3  $\mu$ l de paquete que se extienden sobre un portaobjetos. Posteriormente estas laminillas se dejaron secar y se añadirá una tinción.

La tinción más utilizada es Giemsa, esta tinción está formada por una mezcla de azul de metileno que forman los colorantes de azul II-eosina y azul II, en una proporción de 15:4. El azul tiñe la cromatina y la eosina tiñe el citoplasma de color rosa (Rojas-Martínez *et al.*, 2009).

### 7.2.5 Porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP)

El grado de infección se determinó mediante el conteo de glóbulos rojos infectados y sanos. Una lectura representativa sugiere contar al menos 500 eritrocitos por cada frotis. Para obtener el PEP solo se consideran en la cuenta a los eritrocitos sin infectar y a los infectados, no se incluye a las formas extraeritrocíticas. Se suman y se determina el porcentaje de eritrocitos parasitados o infectados. Para la realización del conteo se han descrito cuatro métodos (Figura 10) (Rojas-Martínez *et al.*, 2009).



**Figura 10.** Métodos de observación del frotis para la determinación de eritrocitos parasitados. 1) Método de la orilla, en este se traza una línea recta sobre un borde del frotis. 2) Seccional en forma de greca. 3) Seccional cruzando, se trazan líneas inclinadas en forma de zig-zag. 4) Diagonal, se lee con una línea que cruza todo el frotis

Fuente: Rojas-Martínez *et al.*, (2009).

### **7.2.6 Monitoreo serológico**

Se obtuvo suero de los dos bovinos inoculados, a partir de cada uno de los días PI, que se usó para la cuantificación de anticuerpos anti-*B. bovis* y anti-*B. bigemina* mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

### **7.2.7 Inmunofluorescencia indirecta**

Para la titulación de anticuerpos anti-*B. bovis* y anti-*B. bigemina* se utilizaron los sueros obtenidos de los dos bovinos inoculados. En donde se realizaron diluciones dobles seriadas a partir de 1:80 hasta 1:10240. Brevemente, se utilizó antígeno derivado de cultivo *in vitro* el cual fue fijado en laminillas, donde se dibujaron en ellas, círculos con lápiz graso en los cuales se depositaron los sueros problemas, además en cada lamilla se colocaron cuatro controles; un control positivo, control negativo, control para la solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y control del conjugado comercial (Anti-IgG de bovino en cabra ALEXA fluor 488). Posteriormente se adicionaron a los sueros problemas el anti-IgG de bovino en cabra. Las laminillas se incubaron a 37°C durante 30 minutos y fueron lavadas con PBS. Finalmente fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia.

### **7.3 Universo de trabajo**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-SAI del INIFAP) Ubicado en el Km. 11.5 de la carretera federal Cuernavaca-Cuautla, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos, C.P. 62550. El estudio se realizó en la Unidad de Babesiosis bovina, donde se llevan a cabo pruebas serológicas, análisis clínico y actividades inmunoquímicas dirigidas hacia la constante investigación para la prevención de la babesiosis bovina.

## **VIII. IMPLICACIONES ÉTICAS**

El estudio fue previamente revisado y aprobado por miembros del comité de uso ético y humanitario de animales del CENID-SAI del INIFAP, con base a la Norma Oficial Mexicana NOM062-ZOO-1999 acerca de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Los bovinos usados en este estudio fueron alojados, manejados y alimentados por personal capacitado de acuerdo con las normas indicadas.

## IX. RESULTADOS

En este trabajo se lograron obtener porcentajes de eritrocitos parasitados (PEP) mayores al 0.5% para cada una de las cepas del protozoario. Para *B. bigemina* se obtuvo un PEP de 5% y para el caso de *B. bovis* de 1.5%. Para la realización del monitoreo clínico se tomaron en cuenta los valores de, TR, Hto y PEP; además, se consideraron signos clínicos adicionales característicos de la enfermedad.

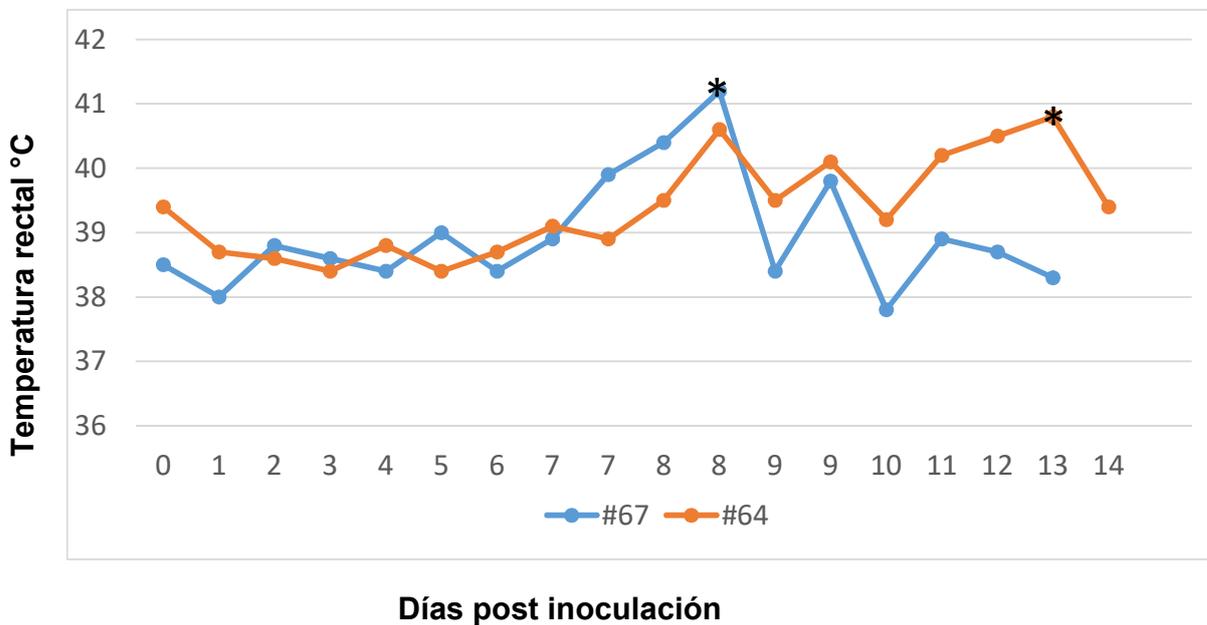
El periodo de incubación tuvo una duración promedio de 14 días para ambos bovinos. Es importante mencionar que el bovino inoculado con *B. bovis* presentó una signología más grave en comparación con el bovino infectado con *B. bigemina*. Una vez que en los animales se obtuvo la parasitemia deseada o cuando presentaron de manera estrictamente simultánea: 1) Fiebre superior a los 40°C, durante tres días consecutivos, 2) Descenso del hematocrito y 3) Detección de parásitos en frotis sanguíneo visualizado en el microscopio, se consideró una muerte experimental; es decir, se dio un tratamiento hemoparasiticida con Diaceturato de diazoaminodibenzamidina por vía intramuscular (IM) durante tres días a una dosis de 3.5mg/kg. Además de tratamientos paliativos con 30mg/Kg de Dipirona sódica por vía IM, solución de hierro administrando 5 ml durante 2 días y sal sódica del ácido arsónico administrando 5 ml vía IM durante tres días. Al mismo tiempo, cuando se llegó al máximo PEP (1.5% para *B. bovis* y 5% para *B. bigemina*), se elaboraron extendidos de sangre para el uso de antígeno en la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) Finalmente se recolectaron muestras de sangre de cada uno de los días PI donde se obtuvo el suero para la titulación de anticuerpos para *B. bovis* y *B. bigemina*.

### 9.1. Temperatura rectal (TR)

El bovino #064 inoculado con *B. bovis* (Figura 11) empezó a presentar una temperatura superior a los 39°C a partir del día 8 (40.6°C) al igual que en los días 9 (40.1°C), 10 (39.2°C), 11 (40.2°C), 12 (40.5°C) y 13, siendo este día el pico más alto de temperatura durante el monitoreo diario con un valor de (40.8°C), a partir de

este día, se determinó muerte experimental debido a que presentó fiebre simultanea durante 3 días.

Con respecto al bovino #067 inoculado con *B. bigemina* (Figura 11); mostró un ascenso de temperatura mayor a 39.5°C el día 7 (39.9°C), el día 8 (40.4°C) ese mismo día se realizó una segunda toma de temperatura a las 3:00pm obteniendo un valor de (41.2°C) siendo este el día con el pico más alto de temperatura. En este día se determinó la muerte experimental, sin embargo, fue debido a que ya se había obtenido la parasitemia deseada.



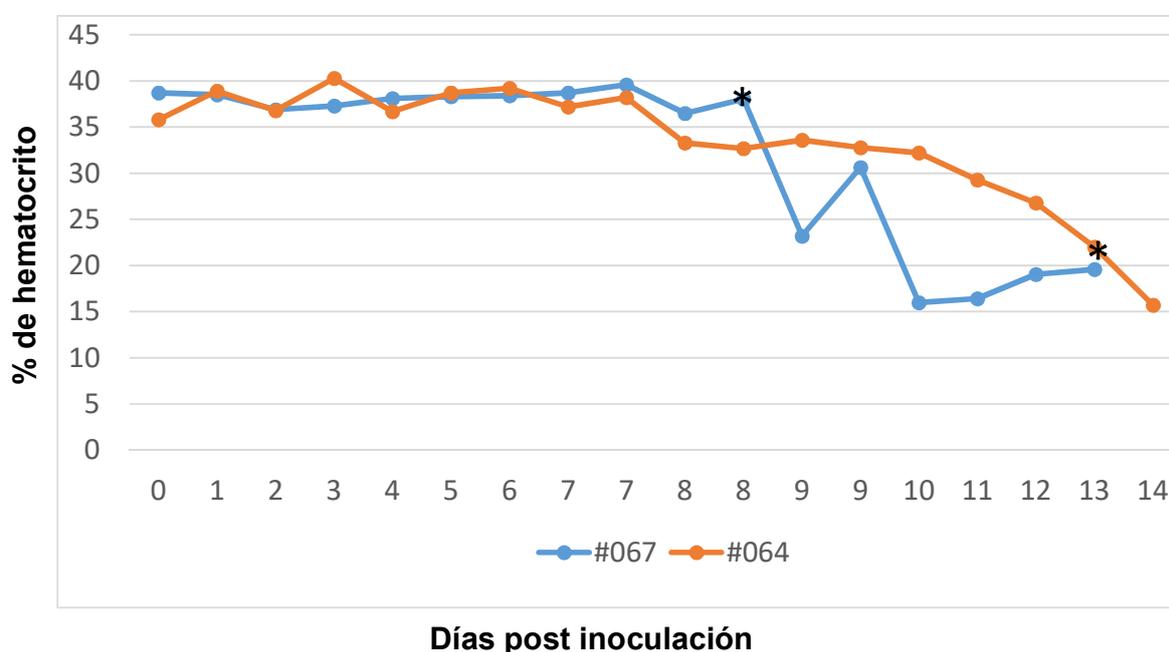
**Figura 11.** Valor promedio de la temperatura rectal (TR) post inoculación.

\* Muerte experimental

## 9.2. Hematocrito (Hto)

Las pruebas de hematocrito se realizaron a la par de la toma de TR, la disminución del Hto del bovino #064 (Figura 12) se empezó a observar a partir del día 11 (29.3%), pudiéndose notar un descenso gradual en los días posteriores, el día 12 (26.8%), día 13 (22%), a partir de este día se determinó la muerte experimental debido a que el descenso de Hto fue de un 50%, el día 14 presentó el valor más bajo siendo de (15.7%).

El valor de hematocrito para el bovino #067 (Figura 12) se mostró en niveles basales hasta el día 8 en el cual se determinó la muerte experimental debido a que obtuvo la parasitemia deseada. El descenso de Hto se presentó a partir del día 9 (23.2%), el día 10 (16%), el día 11 (16.41%) a partir de este día se notó un aumento del Hto pero siguiendo en valores anormales el día 12 (19.04%) y el día 13 (19.6%), el valor más bajo se encontró el día 10.



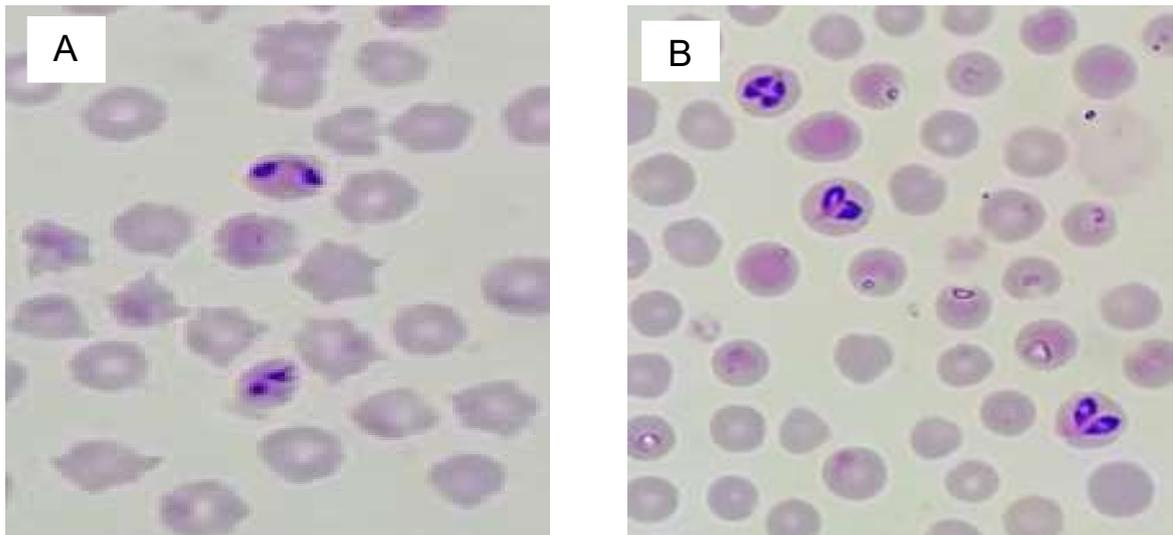
**Figura 12.** Valor promedio del volumen celular aglomerado (Hto%) post inoculación.

\* Muerte experimental

### 9.3. Porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP)

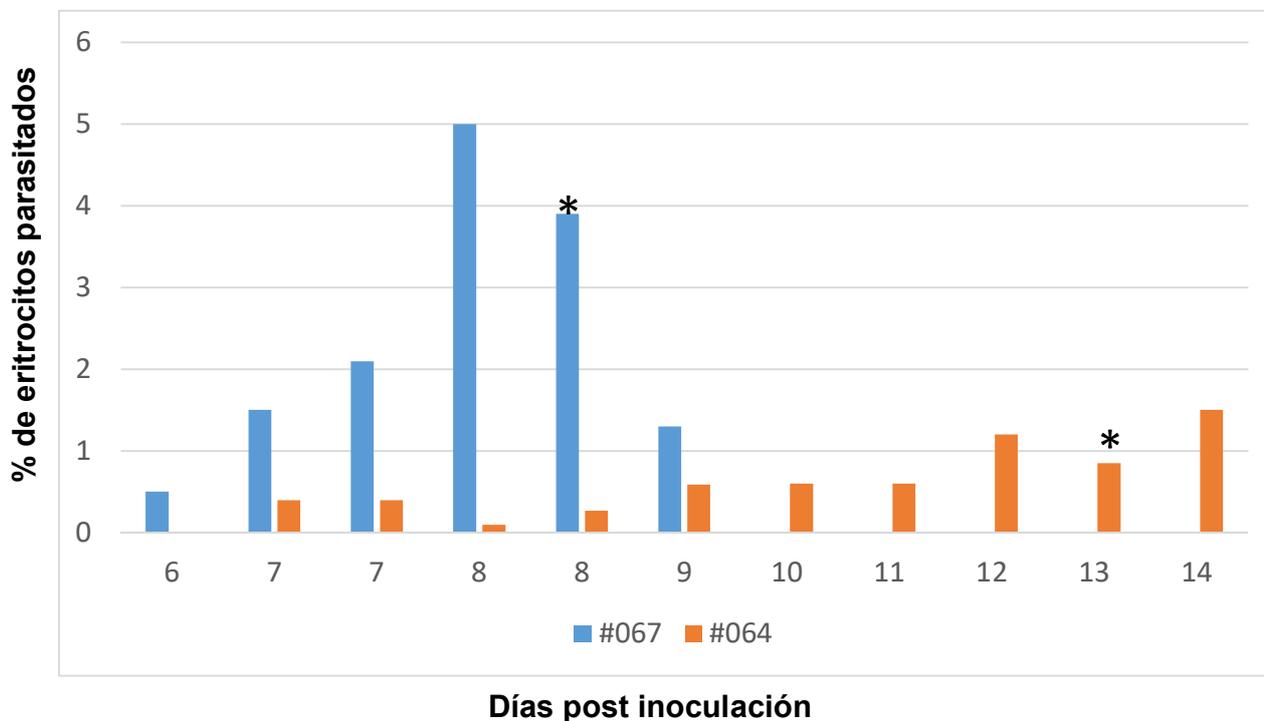
En los frotis sanguíneos se logró observar la presencia de ambos protozoarios (Figura 13), en el caso *B. bovis* (Figura 14) el porcentaje de parasitemia fue menor al 1% en la mayoría de los días, para el día 7 PI se observaron formas parecidas a trofozoitos, mientras que en el día 8 PI se logró visualizar en el frotis sanguíneo un PEP de 0.1%, en el día 13 PI se obtuvo un PEP de 1.5% siendo este el porcentaje más alto de parasitemia; sin embargo, para este día se aplicó muerte experimental, debido a que el animal presentó fiebre durante 3 días consecutivos y un descenso del 50% de Hto, además de que se empezó a observar una signología nerviosa.

Para *B. bigemina* (Figura 14) el porcentaje de parasitemia siempre fue mayor al 1%, excepto para el día 6 PI en donde se observó por primera vez al protozoario con un PEP de 0.5%, en los días posteriores el ascenso de PEP sucedió de manera gradual a excepción del día 8 PI donde se obtuvo un PEP de 5% en este día se determinó muerte experimental debido a que se obtuvo la parasitemia deseada para la elaboración de antígeno. Cabe mencionar que el registro de PEP fue por un tiempo más prologando en el bovino #064 inoculado con *B. bovis* debido a que no se alcanzaban los porcentajes deseados y sería insuficiente para la creación de antígeno utilizado para la prueba de IFI.



**Figura 13.** Observación microscópica de frotis sanguíneo teñido con Giemsa. A) eritrocitos parasitados con *B. bovis*, día 8 PI. B) eritrocitos parasitados con *B. bigemina*, día 13 PI.

Fuente: (Fotografía Laboratorio Unidad de Babesiosis, CENID-SAI INIFAP).



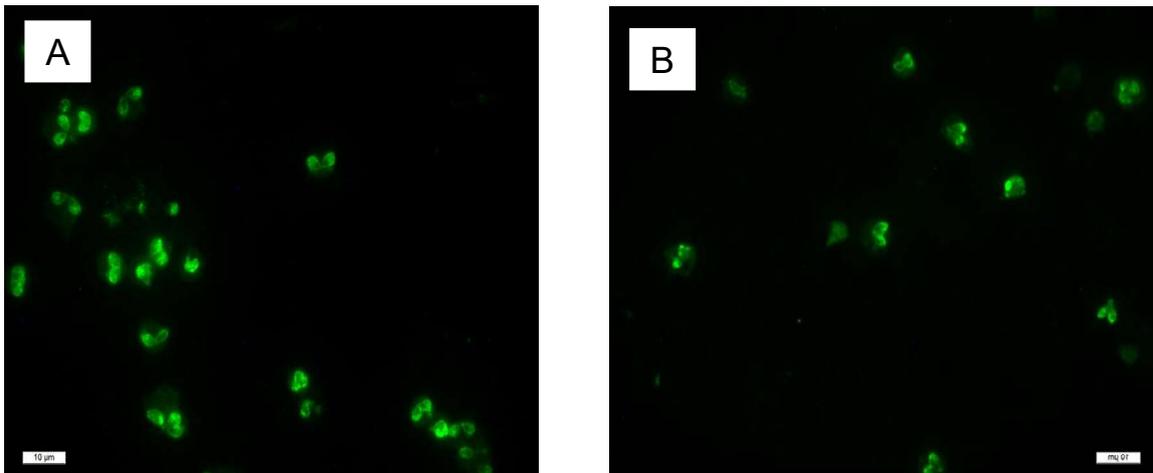
**Figura 14.** Valor promedio del porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) post inoculación. \* Muerte experimental

#### 9.4 Monitoreo serológico

Para el monitoreo serológico, se realizó la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Donde se utilizó un conjugado comercial anti-igG de bovino en cabra (Alexa-fluor 488) con una dilución 1:1200 para *B. bovis* y 1:1800 para *B. bigemina* (Figura 15). La evaluación de cinética de anticuerpos se realizó mediante la titulación de anticuerpos utilizando diluciones dobles seriadas a partir de 1:80 hasta 1:10240 de cada uno de los sueros obtenidos durante todo el monitoreo clínico de ambos animales. Respectivamente en cada lamilla se agregó un control positivo, un control negativo, un control solo con PBS y un control solo con dilución de conjugado.

A la lectura en el microscopio de epifluorescencia se encontró que el bovino #064 (Figura 16) seroconvirtió a partir del 7 PI, mostrando una titulación de anticuerpos a partir de 1:80 hasta 1:320; en el día 9 PI se observó un título promedio de anticuerpos hasta 1:640, el día 11 PI obtuvo un título de anticuerpos hasta en 1:1280, posteriormente se identificó la titulación de anticuerpos para el día 23 se obtuvieron títulos de anticuerpos hasta 1:10240, siendo este día la titulación de anticuerpos más alta.

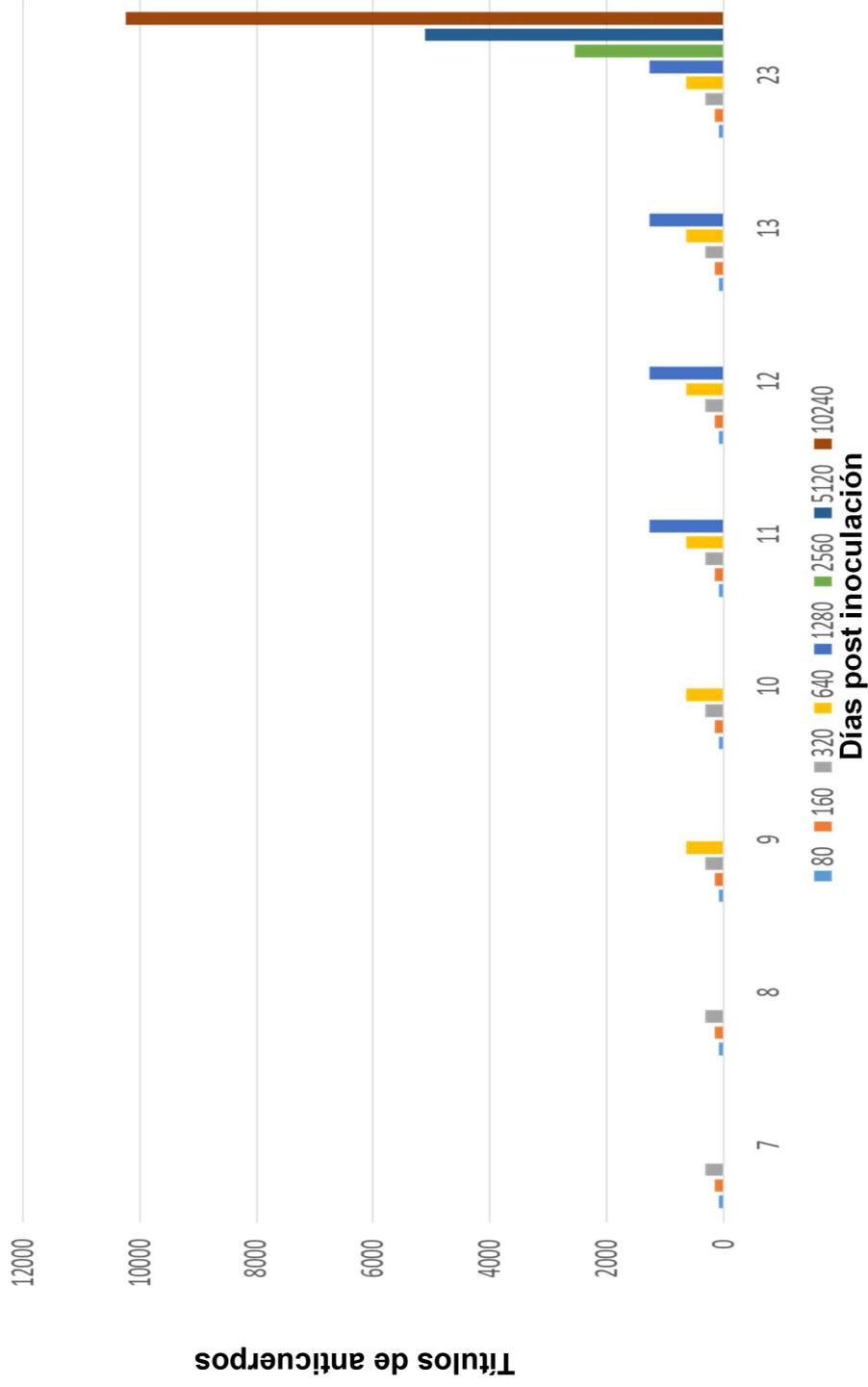
En cuanto al bovino infectado con *B. bigemina* (Figura 17) se encontraron títulos de anticuerpos 1:80 a partir del día 6 PI, mientras que en los días 7 y 8 PI se encontraron títulos hasta 1:160, posteriormente se encontraron títulos de anticuerpos hasta 1:320 en el día 9 PI hasta el día 12 PI, para los días 12 y 13 PI se obtuvieron títulos de anticuerpos hasta 1:640. Finalmente en el día 21 PI se encontró la mayor titulación de anticuerpos llegando hasta 1:1280.



**Figura 15.** Prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) A) Detección de anticuerpos específicos para *B. bovis*, día 23 PI. B) Detección de anticuerpos específicos para *B. bigemina*, día 21 PI.

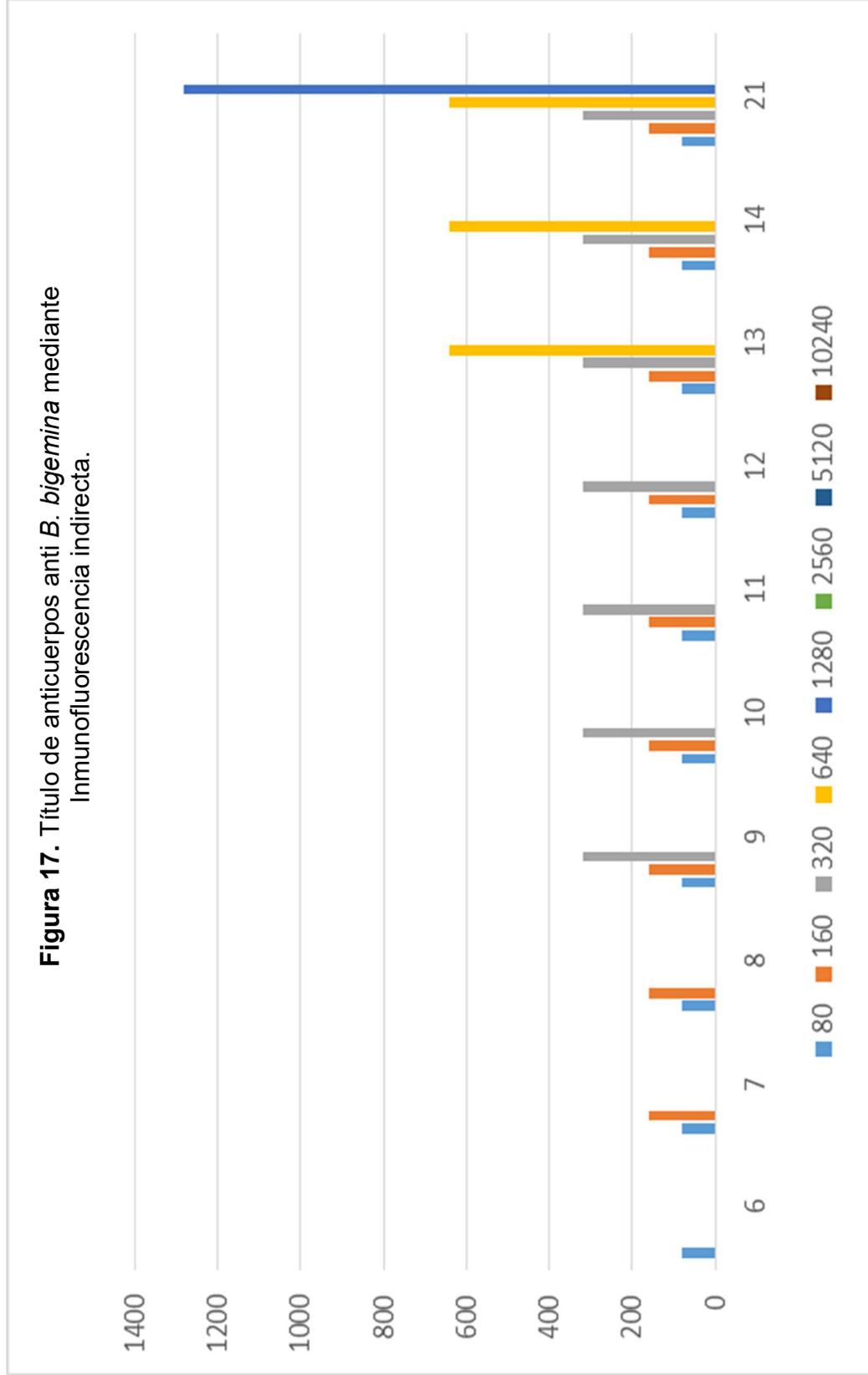
Fuente: Fotografía Laboratorio Unidad de Babesiosis (CENID-SAI, INIFAP).

**Figura 16.** Título de anticuerpos anti *B. bovis* mediante Inmunofluorescencia indirecta.



Anticuerpos anti *B. bovis* del bovino #064 a lo largo de los días post inoculación, se utilizó la técnica de Inmunofluorescencia indirecta con antígeno proveniente de cultivo *in vitro* y conjugado Anti-IgG de bovino en cabra ALEXA fluor 488, con una dilución de 1:1200.

**Figura 17.** Título de anticuerpos anti *B. bigemina* mediante Inmunofluorescencia indirecta.



**Días post inoculación**

Anticuerpos anti *B. bigemina* del bovino #067 a lo largo de los días post inoculación, se utilizó la técnica de Inmunofluorescencia indirecta con antígeno proveniente de cultivo *in vitro* y conjugado Anti-IgG de bovino en cabra ALEXA fluor 488, con una dilución de 1:1800.

**Tabla 4.** Parámetros evaluados durante el monitoreo clínico y serológico

Parámetro	Bovino inoculado con <i>B. bovis</i> (064)	Bovino inoculado con <i>B. bigemina</i> (067)
Inicio de fiebre >39°.5C	Día 8 PI	Día 7 PI
Temperatura máxima	40.8°C	41.2°C
Inicio de descenso de Hto (%)	Día 11 PI	Día 9 PI
Porcentaje mínimo de Hto (%)	15.7%	16%
Inicio de parasitemia	Día 8 PI	Día 6 PI
Máximo PEP	1.5%	5%
Seroconversión	Día 7 PI	Día 7 PI
Máxima titulación de Anticuerpos	1:10240	1:1280
Día en que se determinó la muerte experimental	Día 13 PI	Día 8 PI

## X. DISCUSIÓN

Estudios previos han analizado el monitoreo clínico y serológico en bovinos infectados con *B. bovis* y/o *B. bigemina* ya sea que los animales fueron expuestos a un confrontación de campo o por una inoculación experimental con un ambiente controlado. Con el fin de evaluar la protección de un inmunógeno contra el protozoario (Cantó *et al.*, 2003), para la evaluación de la inocuidad de un inmunógeno (Cantó *et al.*, 2002), también, se han realizado estudios de prevalencia e incidencia en regiones de alta endemicidad (Rojas *et al.*, 2004) y para la conservación y recuperación de las cepas virulentas y de material biológico como antígeno, que fue uno de los objetivos de este trabajo.

Al igual que en trabajos posteriores el monitoreo clínico consistió en el registro de tres valores, los cuales fueron; temperatura rectal (TR), porcentaje de hematocrito (Hto) y porcentaje de eritrocitos parásitos (PEP). En el presente trabajo se utilizaron dos animales *Bos taurus* pertenecientes al INIFAP-SAI. Sin embargo, la cantidad de animales utilizados, varía según los objetivos y criterios que realiza cada investigación, por ejemplo en un estudio realizado por Cantó *et al.* (2003) para la evaluar la protección de un inmunógeno contra la babesiosis, se utilizó la cantidad de 20 toretes, mientras que un estudio realizado en Venezuela utilizó 35 becerras para la evaluación de dinámica de anticuerpos e incidencia de *B. bigemina* (Rodríguez-Peraza *et al.*, 2016). El tiempo del monitoreo diario fue en un promedio de 14 días para ambos bovinos infectados debido a que uno de los objetivos fue obtener antígeno proveniente de la parasitemia obtenida de ambos animales durante la inoculación, una vez que presentara un porcentaje de eritrocitos parasitados, se procedía a dar muerte experimental al animal, a la vez este criterio se aplicaba una vez que los animales, presentara, fiebre por tres días consecutivos, reducción del hematocrito en un 50% y visualización de parásito en el frotis sanguíneo. En comparación a trabajos anteriores, el registro del monitoreo clínico fue en un tiempo más corto, sin embargo el tiempo de estudio puede variar dependiendo de los objetivos deseados durante la investigación, tal fue el caso de un estudio realizado por Bautista-Garfias *et al.*, 2012. donde se evaluó el efecto de *Lactobacillus casei* en la vacuna mixta contra la babesiosis bovina de INIFAP, en el

estudio se monitorearon a los animales durante un promedio más prolongado de 27 días donde se registraron los valores de; Tr, Hto y PEP. Debido a que el objetivo era evaluar en los animales inmunizados y del grupo testigo la protección conferida la vacuna bivalente con la administración simultanea de *L. casei*

En el presente trabajo la temperatura rectal fue tomada diariamente pre inoculación y post inoculación (PI) para ambos bovinos siendo un total de 18 días, la temperatura rectal empezó a presentar un ascenso superiores a los 40°C durante tres días consecutivos para *B. bovis* y en el caso para *B. bigemina* solo en una ocasión. Los aumentos de temperatura sucedieron a partir del día 8 PI para *B. bovis* y del día 7 PI para *B. bigemina* en donde se presentó el aumento más alto de temperatura el día 13 PI con un valor de 41.3°C para *B. bovis* y para *B. bigemina* de 41.2°C para el día 8 PI. Este último dato coincide con el obtenido por Cantó *et al.*, (2003) donde se observó de un grupo de 5 bovinos que recibieron un inóculo combinado de una clona de *B. bovis* y una cepa de *B. bigemina*, que estos presentaron fiebre de hasta 40.4°C para el día 8 PI durante una ocasión mientras que el grupo testigo presento temperaturas superiores a los 40°C durante seis días consecutivos donde se observó el incremento inicial a partir del día diez después de la confrontación en un potrero infestado con garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Por otro lado en una investigación realizada por Cantó *et al.* (2002) con el objetivo de evaluar la inmunidad e inocuidad de un inmunógeno y multiplicar las cepas vacúnales, para esta última se utilizaron tres bovinos esplenectomizados e inmunosuprimidos con dexametasona a los cuales les fueron inoculados eritrocitos infectados con *B. bovis* y *B. bigemina* derivados de cultivo *in vitro*. Una vez inoculado los parásitos se realizó el monitoreo de TR. Donde se observó que el animal inoculado con *B. bigemina* no presentó ninguna alteración en los valores basales de temperatura mientras que para *B. bovis* se tuvieron que utilizar dos animales esplenectomizados e inmunodeprimidos en el primero se observó una temperatura elevada en el día tres PI con un valor de 40.5°C durante los tres días siguiente se elevó a 41.5°C el segundo bovino presento fiebre de 41.5°C para el día 5 PI. En una investigación de tesis de licenciatura en donde se evaluó la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de la babesiosis, donde

inocularon cepas de *B. bovis* y *B. bigemina* respectivamente, previamente fueron esplenectomizados y se monitorearon durante 15 días PI, en donde el aumento de temperatura para el bovino inoculado con *B. bigemina* empezó el día diez PI (39.5°C) siendo el día once el pico más alto de temperatura (41.1°C), mientras que los días restantes se mantuvo en niveles basales. El bovino inoculado con *B. bovis* presento fiebre a partir del día nueve PI (40.5°C) obteniendo el día diez el valor más alto de temperatura (41°C), posteriormente los días restantes se mantuvieron en valores de temperatura basales.

La toma de volumen celular aglomerado (VCA) fue medido mediante la técnica de hematocrito que se realizó mediante microcentrifugación capilar, en el cual se estableció el volumen porcentual de glóbulos rojos, colocando el tubo en una tabla de hematocrito graduada. La lectura el hematocritos correspondió a la altura de la separación de la sangre y el plasma. García *et al.*, (2003) señalan que se debe considerar la reducción del Hto como el indicador más confiable para evaluar los signos clínicos de la enfermedad.

Los valores de Hto registrados en el presente estudio fueron; en el bovino (064) inoculado con *B. bovis* se encontró un disminución en el Hto a partir del día once PI (29.3%) observándose un descenso gradual en los días posteriores (26.8%) para el día doce, (22%) para el día trece, siendo el día catorce PI el valor más bajo con un valor del (15.7%). En comparación con el bovino (067) inoculado con *B. bigemina* el Hto empezó a disminuir a partir del día nueve PI con un valor de (23.2%) obteniendo una disminución para los días diez (16%) y once (16.41%), posteriormente para los días restantes se observó un aumento en el Hto pero continuaron siendo valores anormales (19.04%) y (19.06%) respectivamente para los días doce y trece. Los valores de Hto obtenidos en este presente trabajo fueron superiores a los reportados por Rojas *et al.*, (2004). Donde se determinó la prevalencia e incidencia de *B. bovis* y *B. bigemina* en un hato ubicado en Axochiapan, Morelos. En donde ningún valor fue encontrado fuera del rango considerado dentro de los valores basales de Hto.

El porcentaje de eritrocitos parasitados se determinó mediante la visualización microscópica de frotis sanguíneo, la sangre fue obtenida por venopunción de la vena coccígea, a partir del primer día PI se obtuvo muestra sanguínea diariamente durante 9 días para *B. bigemina* y 14 días para *B. bovis* para la visualización del protozooario. En el caso de *B. bigemina* se observó que el bovino #067 empezó a presentar hacia el día seis PI una parasitemia de 0.5%, encontrando para el día 8 PI un PEP de 5% siendo este el día con el valor más alto, sin embargo, el caso para *B. bovis* la obtención de muestra sanguínea se alargó hasta 14 días PI debido a que no se obtenía el porcentaje deseado de PEP para el día 7 PI se obtuvo un porcentaje de 0.4%, mientras que para el día 13 PI se encontró el porcentaje más alto con un 1.5%. En el trabajo realizado por Cantó *et al.*, en el 2002, se utilizaron becerros esplenectomizados e inoculados con parásitos de cultivo *in vitro* con el objetivo de multiplicar las cepas vacunales, se encontró que el bovino inoculado con *B. bigemina* presentó para el día 6 PI una parasitemia de 1.14%. Mientras que en el caso para *B. bovis* se produjo una parasitemia menor al 0.001%, por lo que se utilizó otro becerro esplenectomizado en el que se presentó una parasitemia al día 5 PI con un porcentaje de 0.5%. Sin embargo, no siempre se visualiza el protozooario mediante la observación en frotis sanguíneo, en un estudio realizado por Rojas *et al.*, (2004), no se pudo observar al microscopio animales positivos a *B. bovis* o *B. bigemina*, esto debido a la zona en que se llevó a cabo el estudio fue una zona enzoótica (Axochiapan, Morelos) y la población utilizada fue en bovinos menores a un año de edad. En áreas enzoóticas, los bovinos se infectan generalmente en los primeros meses de edad y reciben anticuerpos maternos vía calostro, de manera que la protección desaparece entre los seis y nueve meses de edad, lo cual indica que difícilmente será posible observar casos clínicos en dichas condiciones (García-Vázquez, 1991), debido a ello, es que no fue posible diagnosticar por medio de frotis sanguíneo a algún animal positivo al protozooario, ya que no hubo presencia de infecciones agudas (Mahoney y Saal, 1961).

Por otro lado, los resultados obtenidos en relación con la respuesta inmune contra el antígeno de *B. bovis*, demostraron un adecuado reconocimiento del protozooario, iniciando la seroconversión a partir del 7 PI y presentando una máxima titulación de

anticuerpos hasta 1:10240 para el día 23 PI. En cuanto los títulos de anticuerpos para *B. bigemina* solo se lograron observar para el día 21 PI en una dilución 1:1280. Esto puede deberse a que se ha comprobado que *B. bovis* es más patógena, sin embargo, *B. bigemina* disminuye su capacidad de virulencia debido a que el parásito tiene una larga permanencia en animales infectados de forma latente (OIE, 2014).

Se obtuvieron resultados similares en el estudio realizado por Bautista-Garfías *et al.*, (2012), en donde los niveles de anticuerpos siempre fueron más altos *contra B. bovis* que *contra B. bigemina*.

El registro de parámetros ocasionados por la enfermedad, siempre variara debido al tipo de trabajo a realizar, ya sea porque los animales pertenecen a zona endémicas, están frente a una infección de campo o es una inoculación experimental controlada, además se tiene que considerar, el estado fisiológico de cada animal, sexo, raza y edad, por otro lado el manejo diario en los animales para muestreo pueden ocasionar diversos factores de estrés que alteren los resultados esperados. Se ha comprobado que las infecciones por cultivo *in vitro* presentan un alto índice de PEP a comparación de las infecciones de campo (Álvarez y Figueroa, 2007).

Los resultados observados en el presente estudio siguieron, que utilizar bovinos esplenectomizados e inoculados experimentalmente con cepas provenientes de aislados de campo, sigue siendo de las formas más eficaces para la producción de antígeno, para la obtención y conservación de la cepa ya que mediante el cultivo *in vitro*, se pierde la morfológica y virulencia de los protozoarios, sin embargo, se sigue obteniendo mejores PEP mediante la técnica *in vitro*, se debe considerar para el caso de *B. bovis* que el monitoreo de PEP se puede alargar durante más días hasta que se consiga la parasitemia deseada.

## X. CONCLUSIÓN

Mediante el uso de animales esplenectomizados e inoculados con *B. bovis* y *B. bigemina* fue posible inducir una parasitemia que provocará signología clínica asociada a la babesiosis bovina, además, de que fue posible determinar el día en el que se obtuvo el mayor grado de parasitemia, mediante el registro de los parámetros; temperatura rectal, porcentaje de hematocrito y detección del parásito en frotis sanguíneo. Aunque la infección fue experimental y en un entorno controlado, las cargas parasitarias para ambos bovinos fueron las esperadas, obteniendo un PEP del 5% para *B. bigemina* y de 1.5% el caso para *B. bovis* los animales presentaron los signos característicos de la enfermedad, en el caso del bovino inoculado con *B. bovis* se presentó ataxia signología nerviosa característica que produce el protozoario. Mientras que para *B. bigemina* ocasiono un descenso de hematocrito en más de un 50% en el bovino inoculado, atribuyéndose una anemia hemolítica.

Como resultado del porcentaje de parasitemia obtenido, se demostró que ninguna de las cepas inoculadas perdió su virulencia, pudiendo ser conservadas en criopreservación, además que se obtuvo material biológico necesario para la realización de métodos diagnósticos serológicos y moleculares que beneficien a la estandarización de nuevas técnica diagnosticas e investigación de los protozoarios.

## **XI. SUGERENCIAS**

Por el momento, la babesiosis bovina sigue siendo una de las enfermedades parasitarias una de las más estudiadas e investigadas a nivel mundial. En México se han realizado trabajos constantes que beneficien a la prevención y control de la enfermedad, sin embargo, es necesario realizar más estudios, con respecto a la biología del parásito, su transmisión, la respuesta inmune por parte del hospedador y la constante propuesta de nuevos tratamientos, así como la aplicación de mejores medidas profilácticas y control de esta parasitosis. Así mismo la incursión de estudiantes de veterinaria hacia centros de investigación es necesaria para la continua realización de trabajos que ayuden a futuras generaciones y a la realización de nuevas alternativas que beneficien a la salud animal y por lo tanto a la salud de la humanidad.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

Alpizar Caballero, L., Medina Herrera, E. (1999). Fisiopatología de la fiebre. Rev cubana Med Milit, 28(1), 49-54.

Álvarez Martínez, JA., Figueroa Millán, JV. (2007). Cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* y su aplicación para la producción de la vacuna. Ciencia Veterinaria, 10, 137-152.

Álvarez, JA. (1991). Métodos más comunes para la prevención de la babesiosis bovina. En garrapatas y enfermedades que transmiten. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal. Oaxtepec, Morelos. 9-11 de octubre, 200-208.

Álvarez, JA., Ramos, AJ., Rojas, E., Mosqueda, JJ., Vega, MC., Olvera., Figueroa, MJ., Cantó, AG. (2004). Field challenge of cattle vaccinated with a combined *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* frozen immunogen. Anns. of NY Acad. of Scie.1026: 277-283.

Álvarez, MJ., Cantó, AG. (1985). Epidemiología de la babesiosis. Memorias del 25 Aniversario de la sociedad mexicana de parasitología A.C. volumen conmemorativo, 55-72.

Anderson, JF., Magnarelli, LA. (2008). Biology of ticks. Infect Dis Clin North Am, 22(2), 195-215.

Aragón, RS. (1976). Bovine Babesiosis: A review. Vet. Bull, 46, 903-917.

Bautista-Garfias, CR., Castañeda- Arriola, R., Álvarez-Martínez, JA., Rojas-Martínez, C., Figueroa-Millán, JV., Rodríguez-Lozano, A. (2012). La vacunación simultánea de bovinos con *Lactobacillus casei* y la vacuna bivalente contra babesiosis bovina genera una mejor protección contra *Babesia bovis* y *B. bigemina* transmitidas por garrapatas en condiciones extremas de campo. Vet. Méx, 43(3), 189-200.

Benavides, E. (1992). Control de garrapatas, moscas y hemoparásitos en bovinos del trópico. Rev. ICA informa (Colombia), 26(1), 9-15.

Betancourt, A. (1996). Epidemiología y control de hemoparásitos en bovinos. En: CORPOICA. Epidemiología, diagnóstico y control de enfermedades parasitarias en bovinos, compendio N°2. CORPOICA, Medellín, 7-11.

Blatteis, CM. (1992). Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. *Prog Brain Res*, 91, 409-412.

Blood, DC. (2002). Enfermedades causadas por protozoos. Manual de medicina veterinaria. 9na Ed. Mcgraw Hill interamericana, España, 1- 864.

Blood, DC., Henderson, JA., Radostits, OM. (1979). Diseases caused by protozoa. In *veterinary medicine*. 5th. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia, 728-734.

Blood, DC., Henderson, JA., Radostits, OM. (1987). *Medicina Veterinaria*. (5° ed.). Editorial Interamericana, México D.F.

Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129, 247-269.

Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., Jorgensen, W. (2008). Babesiosis in cattle. In: *Ticks: Biology, Disease and Control*, Bowman A.S. & Nuttall P.A., eds. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 281–307.

Bradley, G.K. (2014). *Cunningham Fisiología Veterinaria*. (5° ed.). Elsevier, España.

Brown, CGD., Hunter, AG., Luckins, AG. (1990). Diseases caused by protozoa. In: Sewell MMH, Brocklesby DW, ed. *Handbook on animal diseases in the tropics*. Great Britain: Baillière Tindall, 161-170.

Brown, WC., Palmer, GH. (1999). Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol. Today*, 15, 275-281.

Brown, WC., Ruef, BJ., Norimine, J., Kegerreis, CE., Suarez, KA., Conley, PG., Stich, RW., Carson, KH., Rice Ficht, AC. (2001b). A novel 20-kilodaltons protein conserved in *Babesia bovis* and *B. bigemina* stimulates memory CD4+ T lymphocyte response in *B. bovis*-immune cattle. *Mol. Biochem. Parasitol*, 118, 97-109.

Buling, A., Criado Fornelio, A., Asenzo, G., Benitez, D., Barba Carreto, JC., Florin Christensen, M. (2007). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol*, 147, 16-25.

Callow, DE., Pepper, DM. (1974). Measurements of and correlations between fever, changes in the packed cell volumen and parasitemia in the evaluation of the suscetibility of cattle to infection with *Babesia Argentina*. *Aust. Vet. J*, 50, 1-5.

Callow, L., Dalgliesh, R., De Vos, A. (1997). Development of effective living vaccines against bovine babesiosis The longest field trial *International journal for parasitology*, 27(7), 747-767.

Callow, LL., M'cGavin, MD. (1963). Cerebral Babesiosis due to *Babesia Argentina*. *Aust. Vet. J*, 39, 15-21.

Callow,LL 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*, 43, 249-256.

Calzada, CP., Morales, SE., Quiroz, RGF., Salmerón, SF., García, OC., Hernández, BJ. (2002). Valores hematológicos en vacas de raza Holstein-Friesian seropositivas a *Neospora caninum* de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, México. *Vet. Méx*, 33(2), 119-124.

Cantó Alarcón, GJ., Álvarez Martínez, JA., Rojas Ramírez, EE., Ramos Aragón, JA., Mosqueda Gualito, JJ., Vega y Murguía, CA., Figueroa Millán, JV. (2003). Protección contra babesiosis bovina con una vacuna mixta de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro* bajo una confrontación de campo. *Veterinaria México*, 34(4), 323-332.

Cantó Alarcón, GJ., Ramos Aragón, JA., Rojas Ramírez, EE., Vega y Murguía, CA., Oviedo García, V., Figueroa Millán, JV., Álvarez Martínez, JA. (2002). Evaluación de la inocuidad y protección de un inmunógeno derivado de cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* multiplicado en bovinos. *Técnica Pecuaria en México*, 40(2), 127-138.

Cantó, GJ., Figueroa, JV., Álvarez, JA., Ramos, JA., Vega, CA. (1996). Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de cultivo *in vitro*. *Téc. Pec. en Méx.* 34(3), 127-135.

Cantó, GJ., Figueroa, JV., Ramos, JA., Álvarez, JA., Mosqueda, JJ., Vega, CA. (1999). Evaluación de la patogenicidad y capacidad protectora de un inmonógeno fresco combinado de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. *Vet Mex*, 30, 215-220.

Carrique, J., Morales, G., Edelsten, M. (2000). Endemic instability for babesiosis and anaplasmosis in cattle in the Bolivian Chaco. *Vet. J*, 160, 162-164.

Carrique, J., Ribera, H. (1999). Nuevas pruebas de laboratorio para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina. LIDIVET, Santa Cruz, Bolivia, 1-13.

CFSPH. (2007). *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. the Center for Food Security & Public Healt, 1-3.

CFSPH. (2008). Babesiosis bovina. the Center for Food Security & Public Healt, 1-6.

Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Platard, O., Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40(2), 37.

Cordero del Campillo, M. (1999). *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill, S.A.U. Barcelona, España, 283-293.

Criado Fornelio, A. (2007). A review of nucleic acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasms. *Parassitologia (Rome)*, 49, 39–44.

Curnow, JA. (1968). *In vitro* agglutination of bovine erythrocytes infected with *Babesia argentina*. *Nature*, 217, 267-268.

Dalgliesh, J., Stewart, P., Callow, L. (1978). Transmission of *Babesia bigemina* by transfer of adult male *Boophilus microplus*. *Aust Vet*, 54, 205-206.

Domínguez, A. (1992). Inmunofluorescencia. En: 1er. Taller internacional sobre diagnóstico y control de anaplasmosis y babesiosis en rumiantes. FMVZ-UADY, Yucatán, México, 70-71.

Fell, AH., Smith, NC. (1998). Immunity to asexual blood stages of plasmodium: is resistance to acute malaria adaptive or innate? *Parasitol. Today*, 14, 364-369.

Fernández, RM., García, VZ. (1994). Control ecológico de la garrapata *Boophilus spp.* del ganado bovino. Folleto informativo No. 4. IINIFAP, 13.

Figueroa, JV., Cantó, GJ., Álvarez, JA., Lona, GR., Ramos, JA., Vega, CA. (1998). Capacidad protectora de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro*. *Téc, Pec. en Méx*, 36, 95-101.

Figueroa, JV., Ramos, JA., Álvarez, JA., Cantó, GJ., Vega, CA. (1994). Desarrollo de una vacuna atenuada contra la babesiosis bovina. Proceedings XIV Panamerican congress on Veterinary sciences. Acapulco, México. Oct. 9-15, 389-391.

Gallardo, JS., Morales, J. (1999). *Boophilus microplus*. (Acari: Ixodidae): Preovoposición, oviposición, incubación de los huevos y geotropismo. *Bioagro*, 11(3), 77-87.

García Tapia, D., Álvarez Martínez, JA., Figueroa Millan, JV., Vega y Murgía, CA. (2003). Babesiosis bovina: características relevantes de la respuesta inmune. *Ciencia veterinaria*, 9(4), 15-122.

García Vázquez, Z. (1991). Avances en el conocimiento de la epidemiología de la babesiosis. En: Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal. Oaxtepec, Morelos, México. SARH-AMPAVE. 172-179.

García, TD., Rojas, RE., Estrada, AA., Ramos, AJA., Figueroa, JV., Cantó, GJ., Vega, CA. (1996). Evaluación de un inmunógeno congelado mixto de *Babesia Bovis* y *Babesia bigemina* en vacas gestantes. Inocuidad y desafío controlado. XX congreso Nal. de Buiatría. 14, 15 y 16 de agosto. Acapulco, Gro, 121-125.

García, VZ. (1989). La babesiosis en México. En: memorias del seminario internacional de parasitología animal. Morelos, México, 71.

Goés, T., Goés, V., Ribeiro, M., Gontijo, C. (2007). Bovine babesiosis: Anti-erythrocyte antibodies purification from the sera of naturally infected cattle. Vet. Immunol. Immunophatol, 116, 215-218.

Gohil, S., Kats, LM., Sturm, A., Cooke, BM. (2010). Recents insights into alteration of red blood cell by *Babesia bovis*: moovin' forward. Trends in Parasitology, 26(12), 591-599.

Gordon, J., Sibley, L. (2005). Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin- like proteins in apicomplexan parasites. BMC Genomics, 6-179.

Guglielmone, A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Vet. Parasitol, 57, 109-119.

Hajdušek, O., Šíma, R., Ayllón, N., Jalovecká, M., Perner, J., De la Fuente, J., Kopáček, P. (2013). Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. Frontiers in celular and infection microbiology, 3, 1-15.

Hodgson, J. (1991). Biology and transmission of *Babesia bigemina* in Boophilus microplus. Ann N Y Acad Sci, 42-50.

Homer, MJ., Aguilar Delfin, I., Telford III, SR., Krause, PJ., Persing, DH. (2000). Babesiosis. Clin. Microbiol. Rev, 13, 451-469.

Hunfeld, K., Hildebrandt, A., Gray, J. (2008). Babesiosis: Recent insights an ancient disease. Int. J. Parasit, 38, 1219-1237.

Jennings, FW. (1976). The anemias of parasitic infections. En: Pathophysiology of parasitic infection, Academic' Press, Inc., Nueva York, Londres, 41-67.

Johnson, M. (1996). Neoplastic fever. Palliat Med, 10(3), 217-224.

Jonsson, N. (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. Veterinary Parasitology, 137, 1-10.

Jonsson, N., Bock, R., Jorgensen, W. (2008). Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. Vet. Parasitol, 155, 1-9.

Jorgensen, WK., Weilgama, DJ., Navaratne, N., Dalgliesh, RJ. (1992). Prevalence of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* at selected localities in Sri Lanka. Trop Anim Health Prod, 24, 9-14.

Kemp, DH., Willadsen, P., Cobon, GS. (1991). Development of a vaccine against the tropical cattle tick *Boophilus microplus*. En Garrapatas y enfermedades que transmiten. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal. Oaxtepec, Morelos. 9-11 Octubre.

Kuttler, K. (1981). Chemotherapy of babesiosis: A review. En: Ristic M, Kreir JP. ed. Babesiosis of domestic animals and man. New York: Academic Press, 65-85.

Levine, ND. (1971). Taxonomy of the Piroplasm. Trans. Amer. Micros. Soco, 90(1), 2-33.

Mahoney, DF. (1977). *Babesia* of domestical animals. In parasitic protozoa. Academic press London, 14, 1-52.

Mahoney, DF., Saal, Jr. (1961). Bovine babesiosis: thick blood films for the detection of parasitemia. Aust. Vet. J, 36(1), 44-47.

Manual de Merck. (2007). Sexta Edición. Tomo 1; Editorial Oceano Centrum, Whitehouse Station, N.J., USA. Babesiosis, 20-22.

Mateus, JG. (1990). Epidemiología de la babesiosis bovina. Memoria sobre seminario internacional sobre diagnóstico, epidemiología y control de las enfermedades hemoparasitarias. Convenio colombo alemán ICA-GTZ, 11/22-24, 5-11.

Matthew, JK. (1991). Role of pyrogens and cryrogens. *Physiol Rev*, 71(1), 93-127.

McCosker. (1981). The global importance of babesiosis. In: Ristic M, Kreier J, ed. Babesiosis. New York: Academic Press, 1-24.

Metcalf, CL., Flint, WP. (1982). Insectos destructivos e insectos útiles. Sus costumbres y su control. Compañía Ed. Continental. México, 1091-1094.

Mohamed, AA., Yagoub, AI. (1990). Outbreaks of babesiosis in domestic livestock in the eastern region of the Sudan. *Trop Anim Hlth Prod*, 22, 123-125.

Moltz, H. (1993). Fever: causes and consequences. *Neurosci Biobehav Rev*, 17(3), 237-269.

Morilla González, A. (1972). Pathogenesis of experimentally induced tropical canin, Pancytopenia. Tesis de grado de M. S. University of Illinois.

Morilla González, A. (1981). Inmunología de la Babesiosis. *Ciencia Veterinaria*, 3, 251-261.

Mosqueda, J., Olvera Ramírez, A., Aguilar Tipacamú, G., Cantó, GJ. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19, 1504-1518.

Muñoz, T. (2016). Babesiosis bovina (*Babesia bovis* y *Babesia bigemina*), una enfermedad hematozoárica de importancia económica en el mundo. *Centro de biotecnología*, 5(1), 21-30.

NORMA oficial Mexicana. (1995). NOM-019-ZOO-1994, Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus* spp. Disponible en: <https://normateca.sader.gob.mx/sites/default/files/normateca/Documentos/SENASI/CA%20NORM%20104.pdf>. Consultado el 31/10/2018.

Ogden, N., Swai, E., Beauchamp, G., Karimuribo, E., Fitzpatrick, J., Bryant, M., Kambarage, D., French, N. (2005). Risk factor for ticks attachment to smallholder dairy cattle in Tanzania. *Prev. Vet. Med*, 67, 157-170.

OIE. (2014). Babesiosis bovina. Manual terrestre de la OIE, Cap 2.4.2, 399-404.

Osorno, MB. (1978). Babesiosis en México. *Vet Méx*, 9, 203-207.

Otte. (1992). Anaplasmosis y Babesiosis Bovina de Colombia. Informe Técnico # 12. Instituto Colombiano de Agropecuaria. Santa Fe, Bogotá, 7-23.

Payne, RC., Scott, JM. (1992). Anaplasmosis and babesiosis in El Salvador. *Trop Anim Health Prod*, 14, 75-80.

Purnell, RE. (1981). Babesiosis in various hosts. In *Babesiosis Academic press*. New York, 25-63.B

Quiroz, RH. (2000). Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. 10 ed. Limusa. México D.F, 187- 797.

Ramírez Cruz, GT., Domínguez Alpizar, JL., Sierra, E. (1997). La inmunización contra *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* como método de control de la babesiosis bovina. *Rev Biomed*, 8(4), 240-246.

Ramírez Romero, R., González Báez, A., Nevárez Garza, AM., Rodríguez Tovar, LE. (2011). Informe de tres casos de rabia parálitica y babesiosis bovina en el municipio de Aldama, Tamaulipas. *Veterinaria México*, 42(4), 331-338.

Ramos, JA., Figueroa, JV., Rojas, RE., Santiago, Vc., Cantó, GJ., Vega, CA. (1996). Desafío de campo de bovinos inoculados con un inmunógeno congelado

mixto de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Resúmenes de las memorias de la reunión nacional de investigación pecuaria. Cuernavaca, Mor. Dic, 61.

Regassa, A., Penzhorn, B., Bryson, N. (2003). Attainment of endemic stability to *Babesia bigemina* in cattle on a South African ranch where non-intensive tick control was applied. *Vet. Parasitol*, 116, 267-274.

Ristic, M. (1981). Babesiosis. En: Ristic M, McIntyre I, ed. *Diseases of cattle in the tropics*. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 443-468.

Rodrigues, DS., Leite, RC. (2013). Economic impact of *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. estimate of decreased milk production on a dairy farm. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 65(5), 1570-1572.

Rodríguez Vivas, RI., Grisi, L., Pérez de León, AA., Silva Villela, H., Torres Acosta, JF., Fragoso Sánchez, H., Romero Salas, D., Rosario Cruz, R., Saldierna, F., García Carrasco, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 8(1), 61-74.

Rodríguez Vivas, RI., Rosado Aguilar, A., Basto Estrella, G., García Vázquez, ZS., Rosario Cruz, R., Fragoso Sánchez, H. (2006). Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Morelos, México, Publicación técnica No4.

Rodríguez, SD. (1985). Immunochemical characterization of *Babesia bovis* clones Ph. D. Dissertation. University of MissouriColumbia, U.S.A.

Rodríguez, VR., Trees, AJ. (1996). *In vitro* responsiveness of *Babesia bovis* to imidcarb dipropionate and the selection of a drug adapted line. *Vet. Parasitol*, 62, 35-41.

Rodríguez-Peraza, JL., Forlano-Riera, MD., Meléndez, RD. (2016). Dinámica de anticuerpos e incidencia de *Babesia bigemina* en becerras en una unidad de producción en el municipio cresco del estado Lara, Venezuela. *Revista Científica*, 26(3), 136-141.

Rojas Martínez, C., Figueroa Millán, JV., Álvarez Martínez, JA. (2009). Cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Folleto técnico No 5.

Rojas, E., Domínguez, P., García, M., Cruz Vázquez, C., Figueroa, J., Ramos, J. (2004). Prevalencia e incidencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en un hato bovino en Axochiapan, Morelos. Avances en investigación Agropecuaria, 8(2), 0.

SAGARPA-SENASICA. (2018). Situación actual en México de *Rhipicephalus (Boophilus)* spp. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>. Consultado el 11/11/2018.

SIAP. (2017). Bovino carne y leche población ganadera 2008-2017. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/412562/Bovino\\_2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/412562/Bovino_2017.pdf). Consultado el 26/11/2018.

SIAP-SAGARPA. (2013). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Inventario ganadero.

Singh, H., Mishra, A., Rao, J., Tewari, A. (2008). Comparison of indirect fluorescent antibody test (IFAT) and slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for diagnosis of *Babesia bigemina* infection in bovines. Trop Anim Health Prod, 41 (2), 153-159.

Solís, SS. (1991). Epidemiología de garrapatas *Boophilus* y *Amblyomma* en México. En: Memorias del II seminario internacional de parasitología animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Morelos, México, 19-30.

Solorio Rivera, JL., Rodríguez Vivas, RI. (1997b). Epidemiología de la babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. Revista biomédica, 8(2), 95-105.

Solorio Rivera, J.L., Rodríguez Vivas, R.I. (1997a). Epidemiología de la babesiosis bovina. I. Componentes Epidemiológicos. Rev Biomed, 8(1), 37-47.

Sonenshine, D.E., Lane, R.S., Nicholson, W.L. (2002). Chapter 24: Ticks (ixodida). Medical and veterinary entomology. Amsterdam: Elsevier Science, 517-558.

Trigo Tavera, F.J., Valero Elizondo, G. (2004). Patología General Veterinaria. (4° ed.). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia, México.

Uilenberg, G. (1972). Diagnosis of *Babesia argentina* infection in cattle using brain smears. Australian veterinary journal, 48(9), 534.

Vasco, A. (2013). Estandarización de la técnica de análisis de fusión de alta resolución para la detección de *Babesia* en garrapatas utilizando polimorfismos de nucleótidos. Tesis de licenciatura, Universidad central de Ecuador.

Vega, C.A., Buening, G.M., Green, T.J., Carson, C.A. (1985). *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. Am.J. Vet. Res. 46, 416-420.

Vial, H.J., Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. Veterinary parasitology, 138(1-2), 147-160.

Vieira, M., Sastre, A. (2007). Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. Vet. Parasitol, 150, 54-64.

Vizcaíno, O. (1980). Anaplasmosis y babesiosis en el ganado bovino. En: control de garrapatas, compendio N°39. ICA, Medellín, 59-79.

WAHID-OIE. (2018). Mapas de distribución de las Babesiosis bovina en el semestre de julio a diciembre del 2017. Disponible en: [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributonmap/index/newlang/es?disease\\_type\\_hidden=&disease\\_id\\_hidden=&selected\\_disease\\_name\\_hidden=&disease\\_type=0&disease\\_id\\_terrestrial=29&species\\_t=0&disease\\_id\\_aquatic=-](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributonmap/index/newlang/es?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=29&species_t=0&disease_id_aquatic=-)

999&species a=0&sta method=semesterly&selected start year=2017&selected report period=2&selected start month=1&date submit=OK.

Consultado el 20/10/2018.

Waladde, SM., Young, AS., Morzaria, SP. (1996). Artificial feeding of ixodid ticks. *Parasitol Today*, 12(7), 272-278.

Wright, IG. (1972). An electron microscopic study of intravascular agglutination in the cerebral cortex due to *Babesia argentina* infection. *Int. J. Parasitol*, 2, 209-215.

Wright, IG. (1973). Osmotic fragility of erythrocytes in acute *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infection in splnected *Bos taurus* calves. *Res. Vet. Sci*, 15, 299-305.

Yokoyama, N., Suthisak, B., Hirata, H., Matsuo, T., Inoue, N., Sugimoto, C. (2002). Cellular Localization of *Babesia bovis* Merozoite Rhoptry-Associated Protein 1 and Its Erythrocyte-Binding Activity. *Infect Immun*, 70 (10), 5822-5826.

Young, A., Morzaria, S. (1986). Biology of *Babesia*. *Parasitol Today*, 2, 211-219.

Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, HE., Taylor, SM., Gray, JS. (2003). *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clinical microbiology reviews*, 16(4), 622-636.

### **XIII. ANEXOS**

#### **14.1 Anexo 1. Elaboración de Solución amortiguadora de fosfato (PBS)**

1. En un vaso de precipitado se vaciaron 100ml de agua destilada.
2. Se pesaron 2.62g de Fosfato de Sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ) y 11.5g de Fosfato de sodio difásico anhídrido ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).
3. Se vacían en el vaso de precipitado y se homogenizan.
4. Se vacía en un matraz aforado con capacidad de un litro.
5. Se llena el resto de los 900ml del matraz aforado con agua destilada
6. Se mide el pH en el potenciómetro mientras se homogeniza en la platina
7. Se debe llevar el nivel del pH a 7.2, una vez alcanzado el nivel buscado se vacía en un frasco estéril.

#### **14.2 Anexo 2. Procedimiento de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)**

1. Serán utilizadas laminillas con antígenos provenientes del cultivo *in vitro* de *B. bovis* y *B. bigemina* de los bovinos inoculados experimentalmente.
2. Se colocaran las laminillas en perlas de sílice en donde se dejaron incubar por 30 minutos a 37°C.
3. Una vez terminando la incubación serán sumergidas en acetona durante 6 minutos. Posteriormente en las laminillas se dibujaran 28 círculos, donde a los primeros cuatro se agregara 5µl de; un control positivo, un control negativo, uno de PBS y uno de conjugado, mientras que los 24 restantes círculos se agregaran 5µl de muestra de cada uno de los días a partir de que se hayo la seroconversión, la dilución será doble seriada 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120 y 1:10240 así hasta completar las 3 laminillas respectivamente para *B. bovis* y *B. bigemina*.
4. Se introducen las laminillas en la cámara húmeda y se dejaron incubando a 37°C por 30 minutos.
5. Se realizan los primeros lavados.

6. Se colocan las laminillas en una caja de coplin llena de PBS, en donde posteriormente será colocada en el agitador por 10 min con 110rpm. Se desecha el líquido en la tarja.
7. A continuación se realiza un segundo lavado con las mismas especificaciones pero con un tiempo de 5 min.
8. Se realiza el tercer y último lavado esta vez utilizando agua destilada en lugar de PBS, se coloca en el agitador por 5min con 110rpm. Se desecha el agua destilada en la tarja.
9. Se adiciona el segundo anticuerpo marcado, se agregara 5µl de conjugado anti-IgG de bovino en cabra, Alexa fluor en una dilución 1:1200 para *B. bovis* y 1:1800 para *B. bigemina*.
10. Se incuban las laminillas en cámara húmeda a 37°C por 30 min.
11. Se realizan los segundos lavados.
12. Se cubre la caja de coplin con aluminio para conservar la capacidad fluorescente del conjugado
13. Se realizan los mismos pasos 6, 7 y 8.
14. Se realiza la lectura de las laminillas por medio de microscopia de epifluorescencia.

**14.3 Anexo 3. Títulos promedios de anticuerpos anti *B. bovis* a partir del día de seroconversión utilizando diluciones dobles seriadas a partir de 1:80 hasta 1:10240, mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta**

Días/Diluciones	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
-3	-	-	-	-	-	-	-	-
-2	-	-	-	-	-	-	-	-
-1	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-	-	-
8	+	+	+	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	-	-	-	-
10	+	+	+	+	-	-	-	-
11	+	+	+	+	+	-	-	-
12	+	+	+	+	+	-	-	-
13	+	+	+	+	+	-	-	-
23	+	+	+	+	+	+	+	+

**14.4 Anexo 4. Títulos promedios de anticuerpos anti *B. bigemina* partir del día de seroconversión utilizando diluciones dobles seriadas a partir de 1:80 hasta 1:10240, mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.**

Días/Diluciones	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
-3	-	-	-	-	-	-	-	-
-2	-	-	-	-	-	-	-	-
-1	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	-	-	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	-	-	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-	-	-
11	+	+	+	-	-	-	-	-
12	+	+	+	-	-	-	-	-
13	+	+	+	+	-	-	-	-
14	+	+	+	+	-	-	-	-
23	+	+	+	+	+	-	-	-