



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MEXICO

CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA

LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

**INFECCIÓN EXPERIMENTAL EN BOVINOS Y MONITOREO
INMUNO MOLECULAR DE UNA CEPA VIRULENTE Y
UNA CEPA ATENUADA DE *Babesia bigemina***

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

P R E S E N T A:

TOMÁS VALDEMAR SANTAMARIA ESPINOSA

BAJO LA DIRECCIÓN DE: DR. JUAN JOSE OJEDA CARRASCO

DR. JULIO V. FIGUEROA MILLÁN

AMECAMECA, ESTADO DE MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2022.

ÍNDICE

I	Introducción	1
II	Antecedentes	3
	2.1 Etiología de la enfermedad	3
	2.1.1 Descripción del parásito	3
	2.1.2 Garrapata vector <i>Rhipicephalus microplus</i>	5
	2.1.3 Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i>	7
	2.1.4 Distribución y situación epidemiológica de la babesiosis bovina en México.....	9
	2.1.5 Ciclo Biológico de <i>Babesia</i> spp.....	10
	2.1.6 Signología de la babesiosis en bovinos	12
	2.1.7 Fisiopatología de la fiebre en babesiosis	13
	2.1.8 Fisiopatología de la anemia y la hemoglobinuria	14
	2.1.9 Respuesta inmune en la enfermedad	14
	2.2 Técnicas de diagnóstico	17
	2.2.1 Técnicas indirectas	17
	2.2.1.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	17
	2.2.1.2 Inmunoensayo enzimático indirecto (iELISA)	18
	2.2.1.3 Inmuncromatográfica indirecta (ilCT)	20
	2.2.2 Técnicas directas.....	21
	2.2.2.1 Frotis sanguínea	21
	2.2.2.2 Prueba de hemolinfa	23
	2.2.2.3 Impronta de cerebro	23
	2.2.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
	2.3 Estrategias para el control de la enfermedad	25
	2.3.1 Control de la garrapata vector	25
	2.3.2 Movilización controlada del ganado	29
	2.3.3 Ganado resistente	30
	2.3.4 Vacunación	30
	2.5 Tratamiento contra la babesiosis bovina	31
	2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Babesia</i> spp.....	32

III	Planteamiento del problema	33
IV	Justificación	35
V	Hipótesis	36
VI	Objetivos	37
	6.1 General	37
	6.2 Específicos	37
VII	Materiales y Métodos	38
	7.1 Localización	38
	7.2 Bovinos experimentales y diseño experimental	38
	7.3 Cepa virulenta	39
	7.4 Cepa atenuada	39
	7.5 Monitoreo clínico	40
	7.6 Frotis sanguíneo	40
	7.7 Volumen celular aglomerado.....	41
	7.8 Monitoreo inmunológico	42
	7.8.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	42
	7.8.2 Ensayo Inmunoenzimatico indirecto (iELISA)	43
	7.9 Extracción de ADN	44
	7.9.1 Reacción en cadena de la polimerasa-anidado (PCR-A)	45
	7.9.2 Visualización del producto de PCR-A	46
VIII	Resultados	47
	8.1 Monitoreo clínico en el bovino esplenectomizado	47
	8.2 Monitoreo clínico en los bovinos inoculados experimentalmente	49
	8.3 Monitoreo inmunológico	51
	8.3.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	51
	8.3.2 Ensayo Inmunoenzimatico indirecto (ELISAi)	52
	8.4 Monitoreo molecular	53
IX	Discusión	55
	9.1 Monitoreo clínico en el becerro esplenectomizado	55

	9.2 Monitoreo clínico en los bovinos inoculados experimentalmente	55
	9.3 Monitoreo inmunológico	57
	9.4 Monitoreo Molecular	58
X	Conclusión	59
XI	Referencias bibliográficas	60
XII	Anexos	72
	12.1 Técnica quirúrgica (Esplenectomía)	72
	12.2 Preparación de soluciones	76
	12.3 Extracción de ADN (Kit MOBIO)	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación y organelos de un protozooario Apicomplexa.....	3
Figura 2. Frotis sanguíneo teñido con Giemsa, eritrocito de un bovino con <i>Babesia bigemina</i>	4
Figura 3. <i>Rhipicephalus microplus</i> : A) Adulta ingurgitada, B) Larvas	6
Figura 4. Situación actual para el control de la garrapata <i>Rhipicephalus</i> spp. en México.....	7
Figura 5. Representación del ciclo biológico de la garrapata <i>R. microplus</i>	8
Figura 6. Representación del ciclo biológico de <i>Babesia</i> spp.....	12
Figura 7. Representación de la respuesta inmunológica en un bovino afectado por <i>Babesia</i> spp.	16
Figura 8. Representación esquemática de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta	18
Figura 9. Representación de la técnica de ELISA indirecta	19
Figura 10. Representación de la prueba Inmunocromatográfica indirecta, para la detección de anticuerpos específicos contra <i>Babesia bovis</i>	21
Figura 11. Representación de frotis sanguíneo con tinción de Giemsa para la determinación de eritrocitos parasitados	22
Figura 12. Visualización microscópica de Eritrocitos parasitados con <i>B. bigemina</i> y <i>B. bovis</i>	22
Figura 13. Representación de las etapas que componen los ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	24
Figura 14. Efecto de la vacuna Bovimune Ixovac® sobre garrapatas <i>R. microplus</i>	29
Figura 15. Representación de un Porcentaje de Eritrocitos Parasitados (PEP) del $\geq 10\%$	48
Figura 16. Hemoglobinuria en bovino inoculado con la cepa virulenta	48
Figura 17. Temperatura rectal de los bovinos inoculados con una cepa virulenta y atenuada de <i>Babesia bigemina</i>	49
Figura 18. Monitoreo del Volumen Celular Aglomerado (VCA) mediante la técnica de microhematocrito	50

Figura 19. Representación gráfica del PEP	51
Figura 20. Representación de la cinética y título de anticuerpos específicos contra <i>Babesia bigemina</i>	52
Figura 21. Representación de la cinética de anticuerpos específicos de <i>Babesia bigemina</i> , empleando ELISAi	53
Figura 22. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio	54
Figura 23. Visualización de los productos de amplificación por PCR-A	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación epidemiológica de babesiosis, que corresponde a la seropositividad del hato.....	10
Cuadro 2. Citocinas implicadas en la respuesta inmune contra la babesiosis bovina	17
Cuadro 3. Efectos de los compuestos químicos que se utilizan en el control de las garrapatas.....	26
Cuadro 4. Tipos de vacunas existentes contra babesiosis bovina	31
Cuadro 5. Grupos experimentales de bovinos, describiendo la dosis y cepa empleada en cada grupo.....	39
Cuadro 6. Protocolo de amplificación para PCR sencillo y anidado para <i>Babesia bigemina</i>	46

I. Introducción

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por protozoarios del género *Babesia*, cuyo vector es la garrapata *Rhipicephalus* spp. La distribución de esta enfermedad se da principalmente en zonas tropicales y subtropicales del mundo, y los protozoarios se caracterizan por parasitar exclusivamente a eritrocitos (Smith, 1978; Bock *et al.*, 2004). Las especies *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, son las involucradas en infectar al ganado bovino en México, por ello, son las de importancia en la ganadería de nuestro país (Rojas *et al.*, 2004). Por otro lado, la producción de ganado en México, se lleva a cabo principalmente en las zonas antes mencionadas bajo sistemas extensivos que corresponden aproximadamente al 56% del territorio nacional, sobre todo en el trópico bajo en el cual se encuentra el 70% del inventario bovino nacional (IICA, 2021). Así mismo, es importante mencionar que las condiciones ambientales de estas regiones favorecen la reproducción del vector y a la presencia de esta enfermedad (Cipolini *et al.*, 2003; Ríos *et al.*, 2010).

Actualmente, se sabe que las enfermedades parasitarias e infecciosas transmitidas por garrapatas e insectos hematófagos, son calificadas como problemas de alto impacto económico en la producción ganadera tropical en el mundo, la babesiosis está incluida en esa consideración (Cipolini *et al.*, 2003; Ríos *et al.*, 2010), debido a que, limita y afecta la producción, ocasionando grandes pérdidas económicas en la ganadería de nuestro país, principalmente por la baja productividad y las manifestaciones clínica generales: fiebre superior a los 40° C., anemia hemolítica, hemoglobinuria, emaciación, anorexia, tenesmo, deshidratación, abortos y hasta la muerte del hospedador (Mosqueda *et al.*, 2012 a; Florin-Christensen *et al.*, 2014).

En el 2016 se realizó una estimación de las pérdidas económicas debido a infestaciones de la garrapata vector en México, teniendo como resultado pérdidas alrededor de US\$ 68'878,694 que impactan directamente en la producción láctea, mientras que en animales destinados al abasto público de carne ubicados en el trópico (*Bos indicus* x *Bos taurus*) las pérdidas rondarían US\$ 504'729,382, debido a infestaciones por el vector (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

Durante muchos años se han empleado diversas estrategias para el control de las garrapatas, como el control químico del vector y la movilización controlada de ganado susceptible a zonas endémicas (Solorio y Rodríguez, 1997b). En el caso de la babesiosis bovina, se ha demostrado que la inmunización es la mejor estrategia de control. Durante más de 30 años se han realizado estudios en el CENID-PAVET, ahora CENID-SAI, INIFAP, que incluyen el desarrollo de una metodología para la elaboración de una vacuna mixta viva atenuada contra *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, derivadas de cepas atenuadas mantenidas bajo condiciones de laboratorio en cultivo *in vitro*. Finalmente, en la actualidad el uso de vacunas atenuadas es una de las mejores estrategias de intervención que conlleva a la necesidad del mejoramiento continuo de ese tipo de vacunas vivas (Shkap *et al.*, 2007). Sin embargo, es de suma importancia mencionar que en nuestro país actualmente no existe una vacuna comercialmente disponible.

El objetivo de este estudio fue evaluar la infección experimental de bovinos y realizar el monitoreo clínico e inmuno-molecular después de la inoculación de una cepa virulenta y una cepa atenuada de *Babesia bigemina*

II. Antecedentes

2.1 Etiología de la enfermedad

2.1.1 Descripción del parásito

En México la babesiosis bovina es causada por los protozoarios *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, ambos son transmitidos por la garrapata *Rhipicephalus microplus*. El protozoario anatómicamente cuenta con un complejo apical y un citoesqueleto (Mosqueda *et al.*, 2012b). Su reproducción es sexual-asexual, posee estructuras anatómicas como: roptrias, anillo polar y micronemas (Figura 1). Se movilizan mediante contracciones del citoesqueleto ya que carecen de flagelos, cilios y pseudópodos (Cordero del Campillo, 1999; Muñoz, 2016).

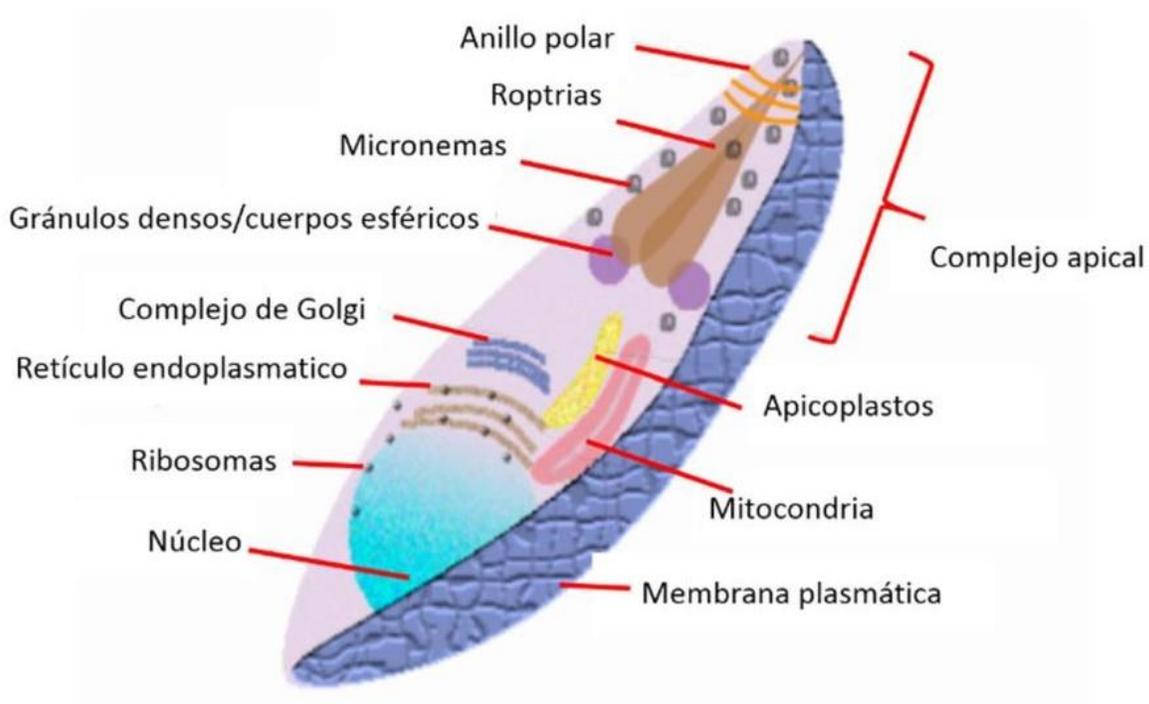


Figura 1. Representación y organelos de un protozoario Apicomplexa. Fuente: Adaptado de Gallego *et al.* 2019

De acuerdo con Levine (1980); la clasificación taxonómica de *Babesia* spp. es de la siguiente manera:

REINO	Protista
SUBREINO	Protozoa
PHYLUM	Apicomplexa
SUBCLASE II	Sporozoa
ORDEN	Piroplasmida
FAMILIA	<i>Babesidae</i>
GÉNERO	<i>Babesia</i>
ESPECIE	<i>bovis, bigemina</i>

En cuanto a la morfología de estos protozoarios, aparecen con forma oval, ameboide redondeada y más frecuente piriforme o irregular, de aquí el nombre de piroplasma (Figura 2). *B. bigemina*, es un piroplasma grande de 4-5 μm de longitud y 2-3 μm de ancho para el caso de los merozoitos (forma de peras) y se encuentran en parejas formando un ángulo agudo en el interior de los eritrocitos parasitados, las formas redondeadas o trofozoítos son de 2-3 μm de diámetro. *B. bigemina* no siempre puede encontrarse en forma de pera (Soulsby *et al.*, 1987).

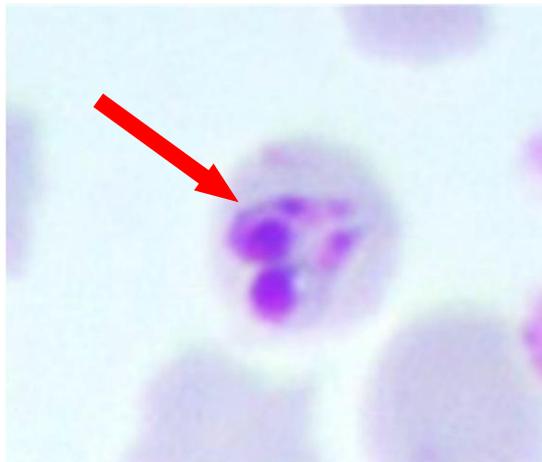


Figura 2. Frotis sanguíneo teñido con Giemsa, eritrocito de un bovino parasitado con merozoitos de *B. bigemina* (flecha roja), 100X. Foto de la unidad de Babesia del CENID-SAI, INIFAP

2.1.2 Garrapata vector *Rhipicephalus microplus*.

Rhipicephalus microplus (anteriormente clasificada como *Boophilus microplus*) es considerada la garrapata más importante del ganado bovino a nivel mundial en términos económicos (Figura 3). Se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

REINO	Animal
PHYLUM	Artropoda
SUB-PHYLUM	Chelicera
CLASE	Aracnida
GRUPO	Parasitiforme
ORDEN	Acarina
SUB-ORDEN	Ixodoidea (garrapatas duras)
FAMILIA	<i>Ixodidae</i>
GÉNERO	<i>Rhipicephalus</i>
ESPECIE	<i>microplus</i>

Clasificación taxonómica de *R. microplus* (Cordero de Campillo *et al.*, 1999).

Es una garrapata dura que se puede encontrar en diferentes especies, siendo los bovinos los hospedadores definitivos, pero se han tenido reportes que, en búfalos, así como en algunos animales silvestres también se han encontrado garrapatas. Una alta carga de garrapatas en los animales puede disminuir la producción y ocasionar daños en la piel (Hernández, 2016). Además, produce pérdidas relacionadas con la mortalidad de los animales, reducción en los niveles de producción, alteraciones reproductivas, altos costos de control, transmisión de diversos agentes patógenos como rickettsias y protozoarios (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012).



Figura 3. *Rhipicephalus microplus*: A) Adulta ingurgitada, B) Larvas.

Fotografía de la Unidad de Babesia, CENID-SAI. INIFAP.

A continuación, se muestra la situación actual de la presencia de la garrapata *R. microplus*, vector de la babesiosis bovina en México, donde los estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California Norte y Chihuahua (con excepción de los municipios de Morelos y Guadalupe y Calvo) y el Norte de Baja California Sur están reconocidos oficialmente como libres del ectoparásito, la superficie libre comprende 599,367.84 km cuadrados, es decir el 30.60% del territorio nacional. En fase de erradicación se encuentran los municipios de Los Cabos y la parte sur de La Paz en Baja California Sur; los municipios de Ahome, El Fuerte y Choix en el norte de Sinaloa, en su margen derecha del río El Fuerte; así como los municipios de la zona desierto del estado de Coahuila: Cuatrociénegas, Ocampo y Sierra Mojada. La superficie en erradicación abarca 67,472.76 km cuadrados, que corresponde al 3.44% del territorio nacional.

El resto del país comparte regiones en fase de control y zonas libres naturales de garrapata *Boophilus* spp. La superficie en control comprende 1, 292, 407.02 km cuadrados, lo que representa el 65.96% del territorio nacional (Figura 4) (SENASICA-SADER, 2021.)



Figura 4. Situación actual para el control de la garrapata *Rhipicephalus* spp. en México. Fuente: (SENASICA-SADER, 2021)

2.1.3 Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*.

El ciclo de *R. microplus* inicia con la eclosión de los huevos ovipositados por las garrapatas hembras, tomando en cuenta que el ambiente sea idóneo para el desarrollo del ciclo, es decir, que exista humedad, temperatura y protección contra la luz. Posteriormente, emergen las larvas y una vez que están en el suelo, alcanzan

los pastizales para poder adherirse al hospedador bovino, se alimentan y mudan al estadio de ninfa aproximadamente en 8 días, continúan alimentándose y en esta etapa se hace la diferencia de sexo, pasando al estadio de adultos juveniles macho (gonandros) y hembras (parteneoginas). El ciclo continúa cuando los machos buscan a las hembras y se aparean, una vez que las hembras llegan a fase adulta se alimentan aproximadamente por 12 días hasta repletarse y se desprenden para caer al suelo, ovipositando aproximadamente de 3000 a 4000 huevos, el pico máximo de oviposición se alcanza a los 5 días y posteriormente disminuye progresivamente, al día 13 se alcanza el 90% de la oviposición total, la incubación y eclosión de estos puede durar de 30 a 33 días (Figura, 5) (Quiroz *et al.*, 2011; León y Hernández, 2012). 

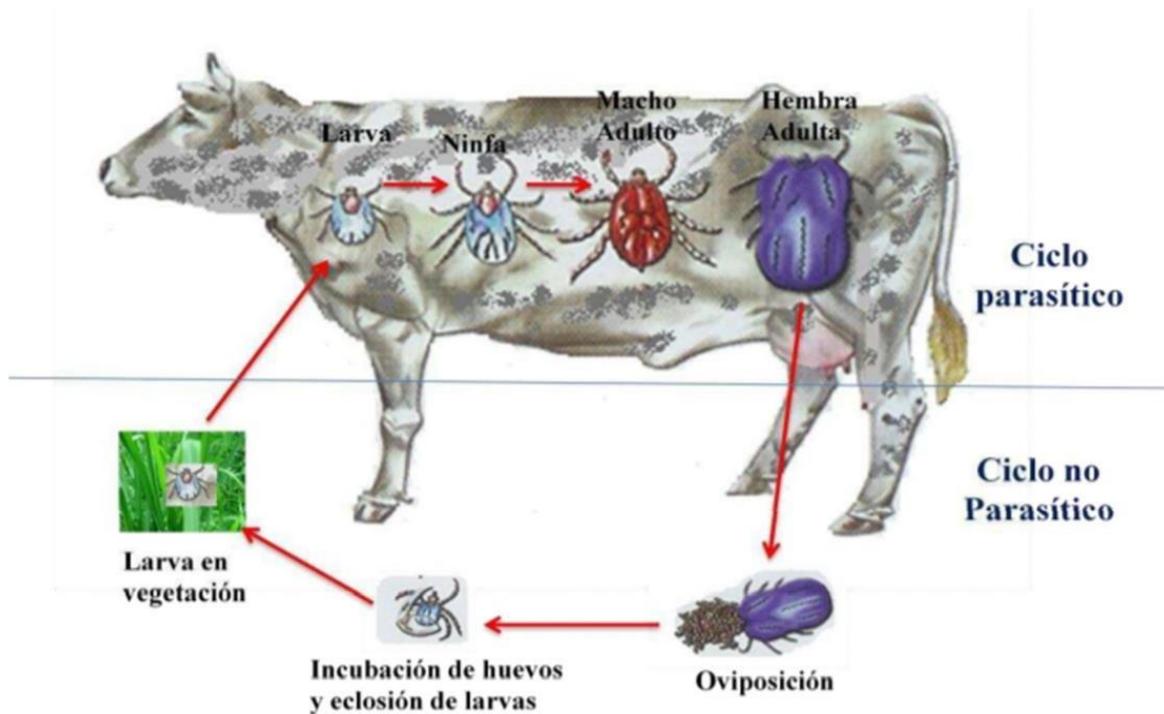


Figura 5. Representación del ciclo biológico de la garrapata *R. microplus*. Fuente: Ciclo biológico de garrapata *R. microplus* (Almazán *et al.*, 2010).

2.1.4 Distribución y situación epidemiológica de la babesiosis bovina en México.

La distribución geográfica de *B. bigemina* y *B. bovis* está mediada por el vector, con mayor prevalencia en regiones tropicales y subtropicales (Simoes *et al.*, 1995). En México, se ha estimado tasas de seroprevalencia de babesiosis en distintas regiones ganaderas, que varían del 20% al 96%, determinadas mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Fernández *et al.*, 1995; Santamaria, 2015). Es importante recalcar que el cambio climático puede llegar a modificar la distribución y frecuencia de las garrapatas como resultado de los cambios en las condiciones de temperatura y humedad, haciendo que regiones que previamente no eran favorables para la supervivencia de las fases no parasíticas en el suelo, ahora se reúnan dentro del sitio requerido para cada especie de garrapata (Sánchez *et al.*, 2020).

En cuanto a su epidemiología, depende básicamente del efecto que exista entre las interacciones del vector *R. microplus*, de los parásitos (*B. bovis* y *B. bigemina* y del hospedador bovino (Rojas *et al.*, 2004). En esta enfermedad es fundamental reconocer la situación de la estabilidad epidemiológica de hato en una región, que está determinada por distintos factores intrínsecos de cada uno de los elementos de la triada epidemiológica descrita antes, tales como raza, edad y estado nutricional de los hospedadores bovinos el cambio climático, y la virulencia de las cepas de *Babesia*, entre los más importantes (Guimarães *et al.*, 2010).

Es importante mencionar que la transmisión puede llegar a un estado de equilibrio entre la tasa de inoculación de los parásitos por parte de la garrapata vector y la apropiada respuesta inmune del bovino, lo cual, puede conducir a un proceso denominado como estabilidad enzoótica, que se refleja en la ausencia de casos clínicos (Ribera *et al.*, 2000; Zapata *et al.*, 2008).

En caso contrario cuando la tasa de inoculación no es lo suficientemente elevada para asegurar una transmisión continua del parásito entre el vector y la población bovina de un hato, entonces pueden resultar brotes de babesiosis (Ramírez *et al.*, 1997; Quijada *et al.*, 1998). Ese conocimiento ha permitido clasificar en cinco zonas

o situaciones epidemiológicas con base en la frecuencia de seropositividad (Cuadro 1) (Solorio y Rodríguez, 1997a; Regassa, 2001; Vaca *et al.*, 2010; Guimarães *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Clasificación epidemiológica de babesiosis con base a la seropositividad del hato.

Clasificación epidemiológica	Seropositividad
Estabilidad enzoótica	81-100%
Cercano a una estabilidad enzoótica	61-80%
Hay inestabilidad enzoótica	21-60%
Hay mínima inestabilidad enzoótica	1- 20%
Ausencia del problema	0%

(Adaptado de Guimarães *et al.*, 2010).

2.1.5 Ciclo biológico de *Babesia* spp.

El ciclo de vida de *Babesia* spp. tiene lugar tanto en el vector *R. microplus* (Figura 5), como en los hospedadores vertebrados (Figura 6), en estos últimos es donde se lleva a cabo la reproducción asexual (Marcelino *et al.*, 2012). El ciclo de los organismos apicomplexos se caracteriza por el desarrollo de estadios como: merogonia, gametogonia y esporogonia, siendo los eritrocitos la única célula blanco en el hospedador vertebrado. El ciclo en el hospedador bovino inicia cuando la garrapata vector inocula esporozoitos de *Babesia* spp. (fase infectante), el cual viaja por el torrente sanguíneo e invade eritrocitos con ayuda de un complejo apical especializado, todas las fases parasíticas se desarrollan en estas células (eritrocitos), y una vez dentro de ellos toman forma de trofozoitos, enseguida ocurre

la fase de merogonia y la cual mediante fisión binaria dará parte a dos o más merozoitos (Smith, 1978; Bock *et al.*, 2004).

Es importante mencionar que los merozoitos lisan los eritrocitos para parasitar nuevos eritrocitos. El ciclo continua, cuando un vector no se encuentra infectado, pero ingiere sangre con eritrocitos parasitados los pre-gametocitos se convierten en gametocitos, posteriormente, se fusiona un gametocito hembra con un macho para formar un ooquineto o cigoto móvil, el cual con ayuda de su punta de flecha invadirá las células intestinales del vector, donde se llevará a cabo la fase de mitosis que dará lugar a los quinetos cuya función es viajar a través de la hemolinfa para invadir y multiplicarse en otros tejidos del vector incluyendo ovarios (embriones de garrapatas adultas) y glándulas salivales (Bock *et al.*, 2004).

Finalmente, en las glándulas salivales los esporoblastos permanecen inactivos hasta que se convierten en esporozoitos, repitiéndose el ciclo cuando una garrapata inoculara a través de la saliva esporozoitos al bovino.

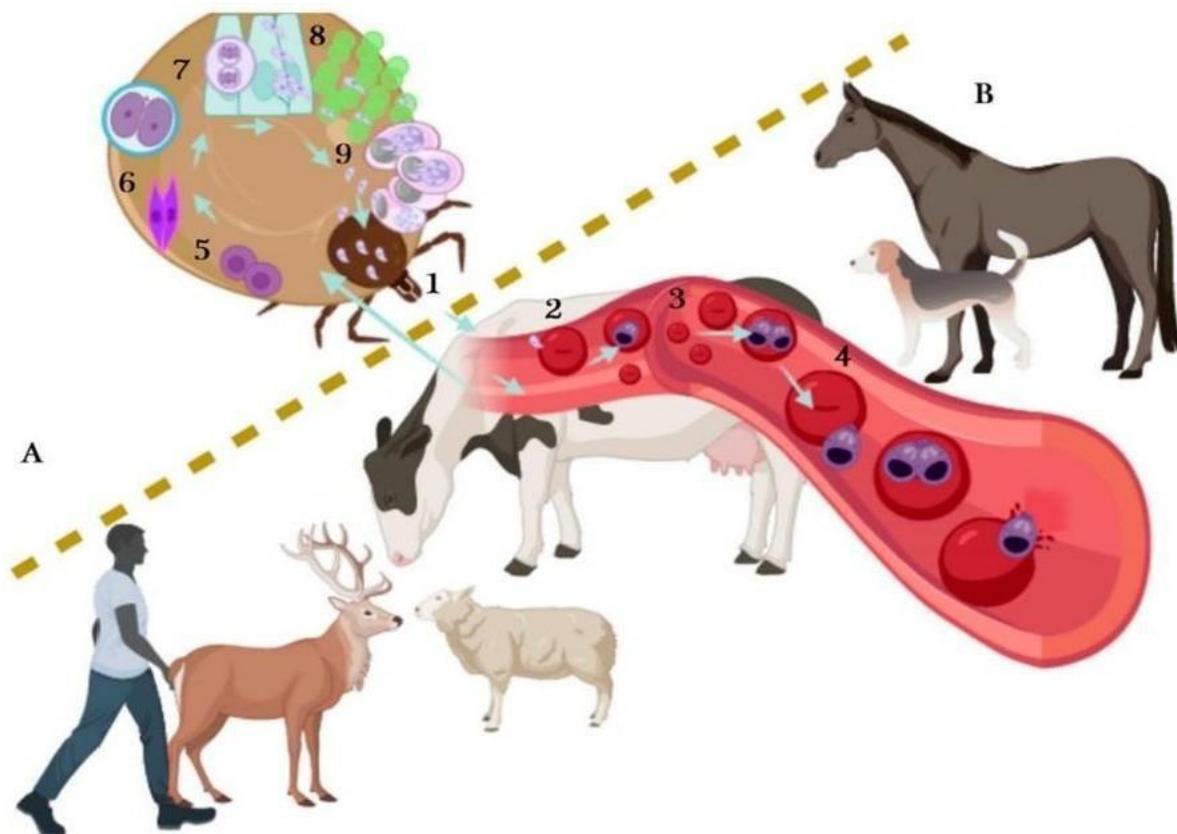


Figura 6. Representación del ciclo biológico de *Babesia* spp. en la garrapata vector y en distintos hospedadores mamíferos (Adaptado de Martínez-García G *et al.*, 2021).

2.1.6 Signología de la babesiosis en bovinos

Los primeros signos clínicos aparecen después del periodo de incubación de 8 a 14 días (Vial y Gorenflot, 2006). La infección produce un síndrome que puede tener un curso benigno con recuperación espontánea o bien progresar y producir una condición debilitante que finaliza con la muerte del animal (Solorio y Rodríguez, 1997a). Los principales signos clínicos son hemoglobinuria, ictericia, anemia, fiebre, debilidad, apatía, anorexia, aborto y deshidratación (Bock *et al.*, 2004). Se presentan variaciones en las manifestaciones clínicas de acuerdo con la especie, en las

infecciones por *B. bigemina* se puede presentar fiebre, hemoglobinuria y anemia, pero no tiene lugar el secuestro intravascular de eritrocitos en capilares cerebrales, como en la infección por *B. bovis* (Figueroa y Álvarez, 2003).

Las infecciones causadas por *Babesia* provocan un síndrome de shock ocasionado por la hipotensión, combinado con inflamación generalizada que se debe a la activación de sustancias vasoactivas a través de los mecanismos fisiológicos, y trastornos de la coagulación y secuestro de los eritrocitos en los capilares, aunque esto último se observa con más frecuencia en infecciones con *B. bovis* (CFSPH, 2008).

2.1.7 Fisiopatología de la fiebre en babesiosis

La fiebre es un mecanismo de reacción tipo defensa ante complejos inmunitarios, causada por la inflamación, fármacos o exposición a microorganismos tales como *B. bovis* o *B. bigemina*. Hablando específicamente de la infección generada por *B. bigemina* como agente pirógeno, estimulará el aumento de pirógenos endógenos siendo liberados por las primeras células de defensa, principalmente por monocitos y macrófagos (Johnson, 1996). Liberando citocinas circulantes tales como; la interleucina 1- α y 1- β (IL-1 α e IL- β), la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral α y β (FNT- α y FNT- β) y el interferón α (IFN- α), estas citocinas son las responsables de iniciar la elevación de la quimiotaxis, la capacidad oxidativa de linfocitos T tiene mayor presencia y se ha sugerido que la fiebre es un signo favorable para que el sistema inmune tenga una mejor respuesta ante *B. bigemina* (Alpizar y Medina, 1999).

Las citocinas interactúan en el torrente sanguíneo gracias a la ayuda de elementos sensoriales en el órgano vascular de la lámina terminal, donde existe una síntesis de prostaglandina E2 (PGE-2), cuya función es extenderse desde la barrera hematoencefálica hasta el área pre-óptica del hipotálamo dando una respuesta de liberación de citocinas (Blatteis, 1992; Moltz, 1993).

2.1.8 Fisiopatología de la anemia y la hemoglobinuria

En infecciones por *Babesia* se ha atribuido a que la anemia tenga un origen hemolítico causado por diversos factores tales como la adhesión de antígenos a la superficie del eritrocito, siendo este último reconocido como agente extraño al organismo del bovino y fagocitado por el sistema fagocítico mononuclear (FM). El fenómeno de la fagocitosis a eritrocitos que no han sido parasitados se atribuye a el incremento de la actividad en el sistema FM, esto ocurre durante la infección, las alteraciones en la forma de los eritrocitos no parasitados, la capacidad de volverse más frágiles hablando osmóticamente y los cambios en la membrana predispondrá a una lisis principalmente en los capilares; respecto a la hemoglobinuria generada por la infección asociada a la babesiosis bovina inicia con la lisis de eritrocitos y la liberación de hemoglobina (CFSPH, 2008).

2.1.9 Respuesta inmune en la enfermedad

La respuesta inmune se activa cuando un bovino es infectado con *B. bigemina*, el primer mecanismo es la respuesta innata y aunque no es específica suele ser mas eficiente en becerros menores a 9 meses que en bovinos adultos (Bautista, 2016), esto se debe gracias al consumo de anticuerpos vía calostro madre-becerro y es la única manera la cual la madre podrá transferir inmunidad materna ya que vía placentaria es imposible transmitir inmunoglobulinas (García *et al.*, 2003); el hecho de que la inmunidad sea más específica se debe a la producción temprana de interleucina- 12 (IL-12), interleucina-18 (IL-18), interferón gamma (IFN- γ) y de la enzima óxido nítrico inducible (iNOS), mientras que en bovinos adultos IL-12 e IFN- γ aparece después de producirse la infección y la enzima iNOS está completamente ausente pero a diferencia de becerros IL-10 es la encargada de inmunomodular la respuesta innata en animales adultos para no desarrollar una respuesta inflamatoria a largo plazo y que esto tenga efectos negativos dentro del proceso infeccioso del hospedador ya que al haber una sobreproducción de citocinas inflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral (FNT) podrá provocar una severa patología, dando como resultado una muerte del hospedador (Goff *et al.*, 2008).

Durante la post infección, cuando los protozoarios se encuentran en el torrente sanguíneo, los anticuerpos IgG1 e IgG2 se activan para neutralizar y opsonizar los antígenos teniendo la función de marcadores para que se pueda llevar a cabo la fagocitosis y bloqueando así la entrada al eritrocito para que la fase intraeritrocitaria no se lleve a cabo. Si no se logra bloquear esta fase se desencadena la primera línea de defensa innata activándose células NK (Natural killer), neutrófilos, monocitos y macrófagos ya que los mecanismos de control contra *Babesia* requieren tanto respuesta inmune innata como adaptativa, incluyendo células Th1, CD4, y producción de anticuerpos neutralizantes (Brown *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, los anticuerpos tienen la función de actuar como opsoninas para aumentar la fagocitosis parasitaria, en el caso de una segunda infección estos anticuerpos son los que crean una respuesta por la existencia de una memoria inmunológica hacia *Babesia* formando complejos inmunes con antígenos, proteínas C3 del sistema de complemento e inmunoglobulinas de tipo IgM, IgG1 e IgG2 que tienen la función de fijar el complemento mientras que el isotopo IgG2 tiene mayor capacidad para opsonizar (Brown *et al.*, 2006).

En este sentido la respuesta inmunológica se activa al momento de iniciar el ciclo de *Babesia* spp. (Figura 6); debido a que dentro del hospedador es estrictamente intraeritrocítico esto dificulta la respuesta inmune ya que los eritrocitos carecen de antígenos de histocompatibilidad, por esta causa dependerá totalmente de la presentación de antígenos del parásito a linfocitos T CD4 por parte de macrófagos para que los puedan fagocitar y el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II sea presentado (Brown y Palmer, 1999).

Por otro lado, existen estudios en donde se menciona que los animales que han cursado con la infección y pudieron controlarla o que fueron inmunizados, las células Th1 CD4 son las que efectúan la respuesta inmune con un aumento en la producción de IFN γ , sumando que los macrófagos se activan y producen citocinas tales como; IFN-I, IL-12, IL-18 (Cuadro 2), y los TNF α y, el IFN γ potencian la producción de anticuerpos IgG2 con una actividad opsonizante y la capacidad de neutralizar junto con IgG1, se sabe que protegen pasivamente a los hospedadores

contra el desafío con cepas homólogas, mientras que los macrófagos se reactivan para que IL-4 induzca a los linfocitos B y este aumente la producción de IgG1 e IgG2 (Brown *et al.*, 2006).

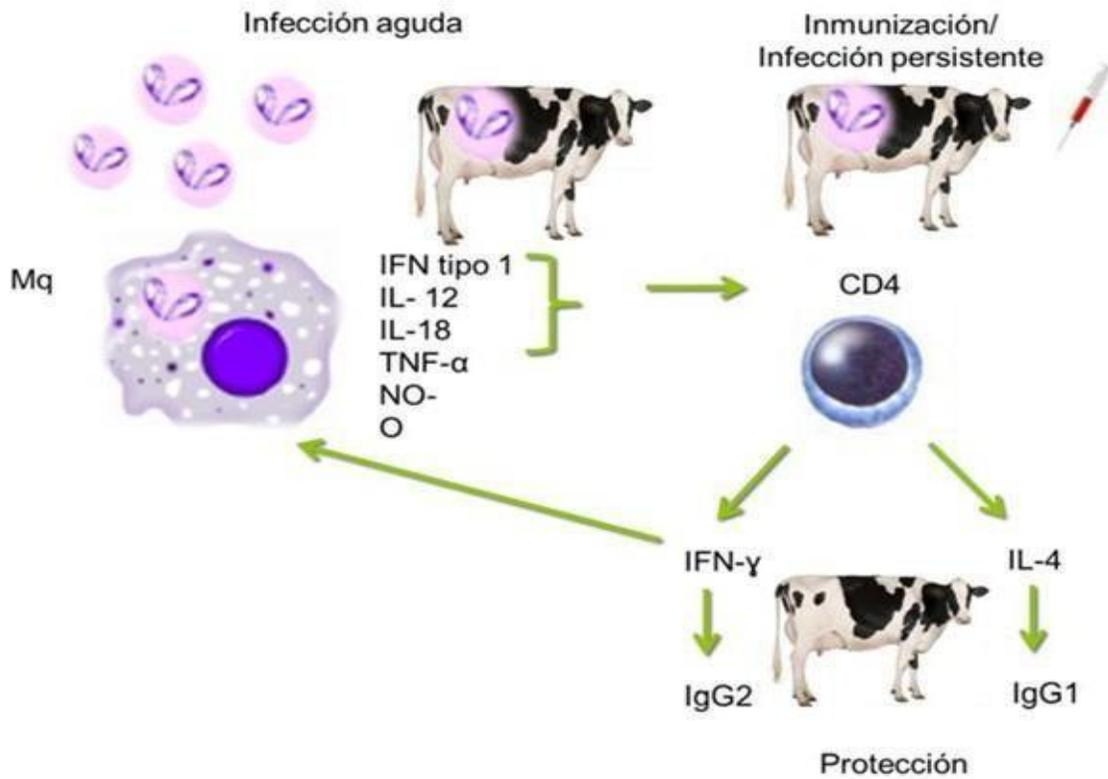


Figura 7. Representación de la respuesta inmunológica en un bovino después de la infección natural o inmunización con *Babesia* spp. (Adaptado de Brown y Palmer, 1999).

Cuadro 2. Citocinas implicadas en la respuesta inmune contra la babesiosis bovina, considerando la edad del hospedador.

	IL-12	IL-18	Interferón Gamma	Enzima de iNOS	IL-10
Becerras 6-9 meses	Buena respuesta durante la infección	Buena respuesta durante la infección	Buena respuesta durante la infección	Buena respuesta durante la infección	No se produce
Bovinos adultos	Se induce post- infección	Se induce post- infección	Se induce post- infección	No se produce	Se produce como proceso inmunomodulador para reducir la inflamación

(Adaptado de Brown y Palmer, 1999; Brown, 2006).

2.2 Técnicas de diagnóstico

Actualmente, existen diferentes técnicas para el diagnóstico de la babesiosis bovina, tales como son las técnicas directas e indirectas. Las técnicas indirectas, son metodologías serológicas de diagnóstico inmunológico, los cuales están basadas principalmente en la detección de anticuerpos circulantes producidos por el hospedador hacia los antígenos babesiales (Figuroa y Álvarez, 2003). Es decir, determinan si los bovinos en algún momento de su vida han estado expuestos a los protozoarios y, cabe mencionar que estos métodos inmunológicos como también se les denomina son utilizados básicamente en estudios seroepidemiológicos de babesiosis bovina, dentro de ellos se encuentran los siguientes:

2.2.1 Técnicas indirectas

2.2.1.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

El fundamento de esta técnica es reconocer la reacción antígeno-anticuerpo, brevemente la técnica incluye dos etapas, la primera consiste en el reconocimiento del primer anticuerpo; es decir, IgG totales presentes en el suero problema, los cuales se unirán a epítopes específicos del antígeno *B. bovis* y/o *B. bigemina*,

posteriormente en la segunda etapa se agrega un anticuerpo secundario (anti-IgG de bovino) conjugado (puede ser con isotiocianato de fluoresceína); el cual reconoce al primer anticuerpo (en caso de presentarse reactividad positiva) y la reacción se visualiza con luz ultravioleta de alta intensidad (Figura 8). Es una excelente prueba que se puede utilizar en bovinos después de la exposición a los parásitos y en algunos casos en portadores asintomáticos, con sensibilidad y especificidad diagnóstica superior al 90% (Solorio y Rodríguez, 1997b; Mosqueda *et al.*, 2012b; Tizard, 2013).

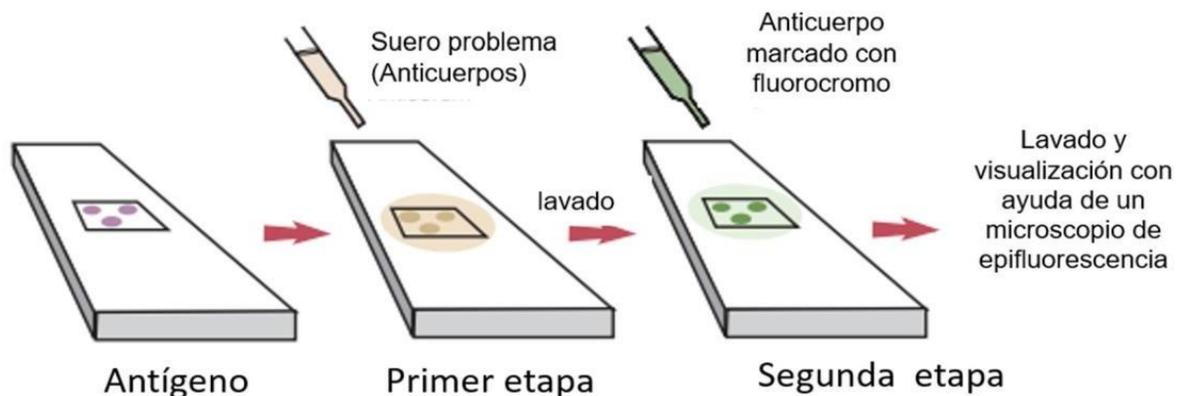


Figura 8. Representación esquemática de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (Modificado de Tizard, 2013).

2.1.1.2 Inmunoensayo enzimático indirecto (iELISA)

El fundamento es el mismo que el antes descrito y se da mediante un enlace covalente de enzimas a las moléculas de los anticuerpos produciendo una herramienta inmunológica que posee alta especificidad y sensibilidad (Figura 9); cabe mencionar, que entre los inmunoensayos más importantes empleados en medicina veterinaria se encuentra el ELISA (Tizard, 2013). Estas pruebas pueden detectar y cuantificar anticuerpos o antígenos. Actualmente, en una técnica descrita se empleó la proteína recombinante RAP-1 α (Proteína Asociada a Roptrias α), como antígeno específico para sensibilizar placas de poliestireno para la prueba de

ELISA, donde se demostraron tasas de especificidad y sensibilidad aceptable, que permite la detección particular de anticuerpos frente a *B. bigemina* en bovinos expuestos de forma natural a la garrapata vector *R. microplus*. Las tasas de sensibilidad y especificidad diagnósticas estimadas para el iELISA con la proteína recombinante RAP-1 α como antígeno fueron del 89,9% y 86,5%, respectivamente (Santamaria *et al.*, 2020).

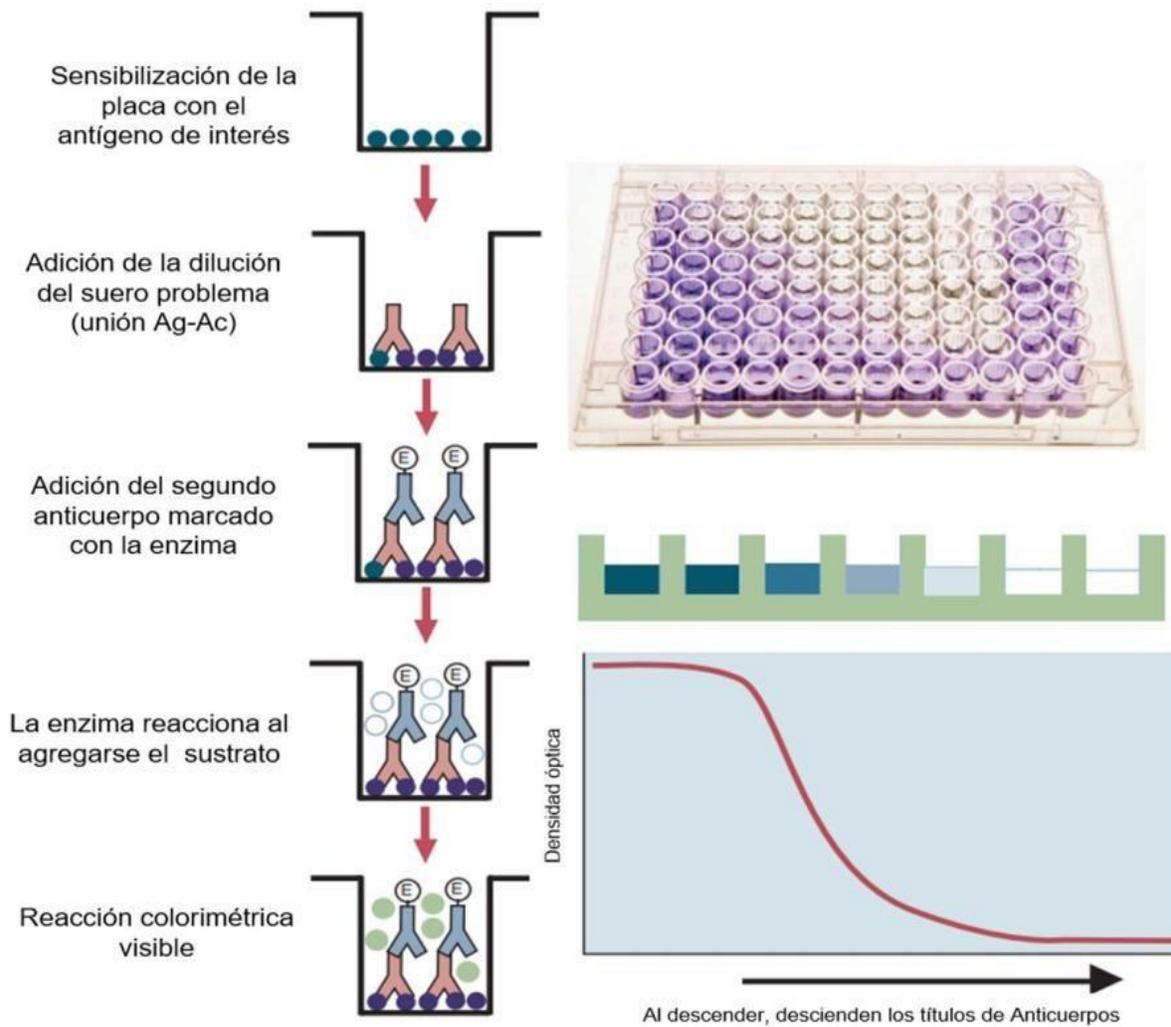


Figura 9. Representación de la técnica de ELISA indirecta (Tizard, 2013).

El antígeno se adsorbe a los pocillos en una microplaca de poliestireno y la presencia de anticuerpo unido es detectada por medio de un segundo anticuerpo marcado con una enzima. La adición del sustrato enzimático conduce a un cambio de color proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos. El cambio de color en cada uno de los pocillos se estima en un lector de microplacas de ELISA o espectrofotómetro.

2.2.1.3 Prueba rápida inmunocromatográfica indirecta (iICT)

La inmunocromatografía es una técnica inmunológica que permite visualizar la reacción antígeno-anticuerpo por la acumulación del oro coloidal del conjugado en zonas específicas del papel de nitrocelulosa donde se fijan previamente anticuerpos de captura.

En la actualidad, este tipo de pruebas se vienen utilizando para el diagnóstico rápido de varias enfermedades, algunas de ellas, basadas en la detección de antígenos (Zhang, 2009). Recientemente, en el CENID-SAI, INIFAP, se ha desarrollado una prueba con un sistema de ensayo basado en tiras que es rápida, práctica y sensible para la detección de anticuerpos contra *B. bovis*, lo que sugiere que podría aplicarse en el campo sin requerir equipo de laboratorio para su uso e interpretación de los resultados de la prueba (Figura 10) (Lira *et al.*, 2021).

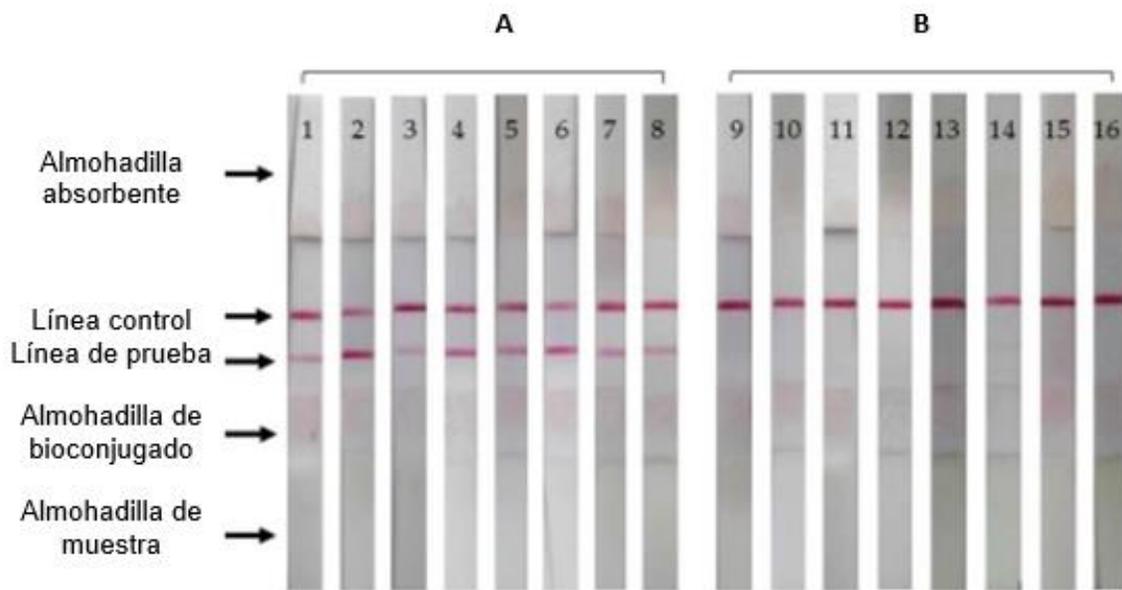


Figura 10. Representación de la prueba rápida inmunocromatográfica indirecta para la detección de anticuerpos específicos contra *B. bovis*, desarrollada en el CENID-SAI, INIFAP. A) Línea 1-8, resultados con sueros controles positivos, se logra observar reacción en las dos líneas: prueba y control, B) Línea 9-16, resultados con sueros controles negativos, se observa reacción únicamente en la línea control de la prueba (Modificado de Lira *et al.*, 2021).

2.2.2 Técnicas directas

Una parasitemia menor al 1% se considera significativa si hay evidencia de cambios anémicos o existe historia sugestiva de fiebre en los bovinos infectados (Bock *et al.*, 2004), de forma breve se describen las técnicas directas.

2.2.2.1 Frotis sanguíneo. Es el método de diagnóstico más simple y el más utilizado, se inicia con la obtención de sangre a partir de vasos periféricos, se extiende la sangre en un portaobjetos y enseguida los frotis son teñidos con Giemsa (Figura 11) para poder ser visualizado en un microscopio (Figura 12). Esta técnica es adecuada y se recomienda para la detección de parasitemias (eritrocitos parasitados) durante la fase aguda de la enfermedad, pero no para la detección de portadores asintomáticos debido a que las parasitemias son extremadamente bajas

(Solorio y Rodríguez, 1997b), mientras que es buena para la lectura de los frotis delgados pero muy pobre en frotis gruesos (OIE, 2004).

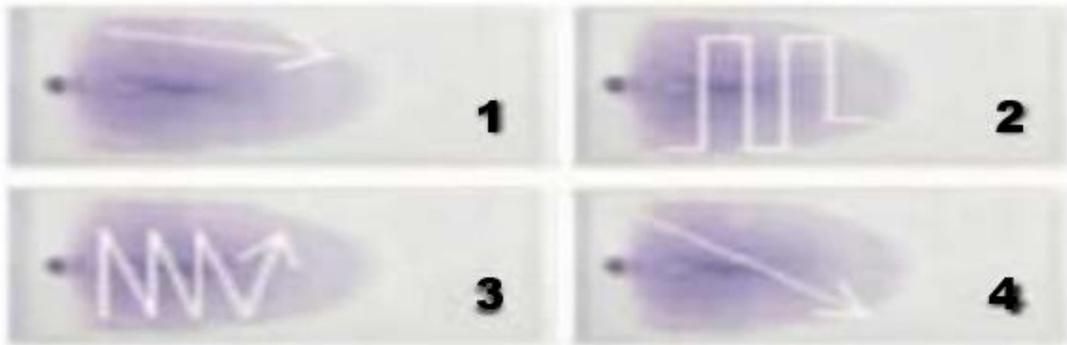


Figura 11. Representación de frotis sanguíneo con tinción de Giemsa para la determinación del porcentaje eritrocitos parasitados (PEP). 1) Método de la orilla, en este se traza una línea recta sobre un borde del frotis. 2) Seccional en forma de greca. 3) Seccional cruzando, se trazan líneas inclinadas en forma de zig-zag. 4) Diagonal, se lee con una línea que cruza todo el frotis (Rojas *et al.*, 2009).

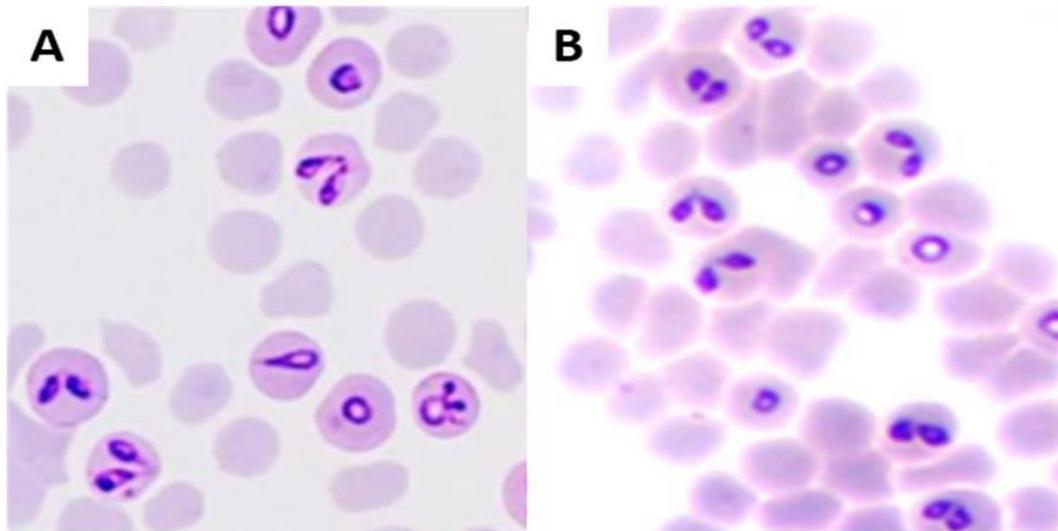


Figura 12. Visualización microscópica de eritrocitos de bovinos parasitados con *B. bigemina* y *B. bovis* (B), en donde se muestran las diferencias morfológicas entre cada una de las especies, tinción Giemsa, 100X.

Fuente: Fotografía de la Unidad de Babesia, CENID-SAI INIFAP.

2.2.2.2 Prueba de hemolinfa

Esta técnica es para determinar la infección por *Babesia* spp. en la garrapata vector *Rhipicephalus* spp. Básicamente consiste en separar uno de los ocho artemos del vector, se obtiene una gota de hemolinfa y se coloca en un portaobjetos, posteriormente se tiñe con Giemsa y se observa en un microscopio. La infección se determina visualizando vermículos de *Babesia* en forma de bastoncillos (Figuroa y Buening, 1995; Sparagano *et al.*, 1999).

2.2.2.3 Impronta de cerebro

Técnica *post mortem* cuyo fundamento se basa en visualizar eritrocitos parasitados en capilares cerebrales, útil para confirmar casos agudos y severos de *B. bovis*, al igual que en las técnicas directas antes mencionadas, las laminillas se tiñen con Giemsa (Figuroa y Álvarez, 2003).

2.2.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR surgió en 1971 cuando Gobind Khorana describe la técnica al explicar la replicación de un fragmento de ADN usando dos iniciadores (Kleppe *et al.*, 1971). Pero fue en 1983 cuando Kary Mullis y sus compañeros de la compañía Californiana Cetus Corporation la llevaron a cabo por primera vez mientras trabajaban en la fabricación de oligonucleótidos y en el uso de iniciadores para la secuenciación de ADN. El fundamento de la técnica de PCR se basa en copiar ADN en ciclos aprovechando la actividad de la enzima Taq ADN polimerasa que es la que se encarga de sintetizar el ADN de las células. Los elementos químicos necesarios para llevar a cabo esta secuencia son el templado o molde (ADN o ADNc), enzima Taq polimerasa, los oligonucleótidos o primers (iniciadores o cebadores), los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O grado biología molecular (Figuroa y Álvarez, 2003).

La PCR es una técnica molecular que amplifica de forma *in vitro* fragmentos de ADN de diferentes agentes etiológicos, en este caso de *B. bigemina* o también de *B. bovis*. Esta técnica confiere secuencias de alta especificidad siendo hasta 1000 veces más sensible que la microscopía óptica.

Un ciclo de amplificación consta de tres etapas: separación de las hebras de ADN (desnaturalización), unión de los iniciadores a una secuencia complementaria del ADN molde (alineamiento) y la síntesis semiconservativa de una nueva cadena por adición de nucleótidos debido a la acción de la ADN polimerasa (extensión). Cada una de las etapas está determinada por una temperatura.

Teóricamente el proceso permite generar en 30 ciclos de amplificación más de dos billones de copias de ADN a partir de una sola molécula (Mas *et al.*, 2001).

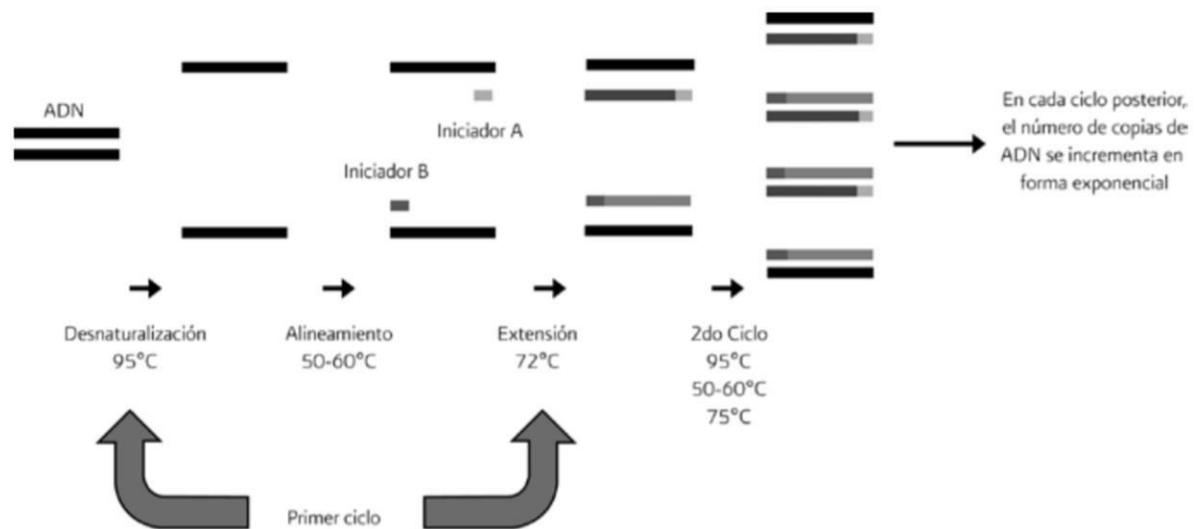


Figura 13. Representación de las etapas que componen los ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Modificado de:

www.Ucursos.cl/ingenieria/2009/2/BT51A/1/material_docente/objeto/244484.

2.3 Estrategias para el control de la enfermedad

En la actualidad se cuenta con diversas estrategias las cuales permitirán hacer uso de ellas para poder controlar la babesiosis, algunas resultando más efectivas que otras ya que también dependerán de condiciones específicas (Mosqueda, 2012a). Para poder establecer un plan profiláctico se tiene que integrar actividades dirigidas al vector, al hospedador y al ambiente (Ramírez *et al.*, 1997).

2.3.1 Control de la garrapata vector

A) Control químico

Consiste en evitar tanto la reproducción del vector, así como su eliminación aplicando químicos al hospedador, teniendo múltiples fármacos como son desparasitantes con efecto ectoparasiticida, insecticidas por derrame (*pour on*); que consiste en aplicar el producto en el dorso sobre la línea media del hospedador, baños de inmersión y baños de aspersion con soluciones químicas, aretes impregnados con químicos y fijados en el cuerpo del hospedador.

Entre los compuestos químicos de los productos comerciales se encuentran los organofosforados, carbamatos, piretroides sintéticos, arsenicales, y las amidinas (compuesto orgánico), todos estos antes mencionados se absorben por la piel del hospedador y su acumulación es en el tejido adiposo (Davey *et al.*, 2001).

Brevemente en el Cuadro 3, se describe su mecanismo de acción. Sin embargo, el inconveniente del uso de este grupo de químicos es que han resultado poco eficientes en algunas regiones debido a la resistencia que han generado las garrapatas, esto representa una gran problemática ya que se han encontrado poblaciones resistentes en distintas regiones del mundo.

Los primeros datos de la resistencia de una población de garrapatas a un acaricida, fueron el resultado de la utilización indiscriminada de arsénico, durante más de 30 años, como una solución frente a las infestaciones masivas de las garrapatas *R. microplus* del ganado entre 1890-1910 (Wharton, 1974).

Cuadro 3. Efectos de los compuestos químicos que se utilizan para el control de las garrapatas.

Compuesto químico	Efecto
Fipronil	Bloquea los canales clorhídricos de la barrera GABA (ácido gamma aminobutírico) de las neuronas en SNC.
Organofosforados, Carbamatos y Amidinas	Inhibición en la actividad de la enzima colinesterasa produciendo un estímulo colinérgico.
Piretroides	Bloqueo de la actividad motriz provocando incoordinación motora, parálisis y letargo.

(Davey *et al.*, 2001)

Estudios recientes mencionan que las esterasas como sitio blanco de acción en las garrapatas, son una de las principales causas de la resistencia que se ha tenido sobre compuestos ixodicidas (Rosario y Rodríguez, 2005).

La resistencia de *R. microplus* en México se debe al uso sin medida de ixodicidas, reportándose dos mecanismos principales:

- a) Insensibilidad del sitio de acción en cepas resistentes a los sitios blanco como los canales de sodio (piretroides) y acetilcolinesterasa (carbamatos y organofosforados) presentan modificación en el sitio de unión lo cual quiere decir que se ve afectada la sensibilidad de la enzima a la inhibición por el insecticida.
- b) Resistencia metabólica: las enzimas de los artrópodos son modificadas por ende afectan el efecto del compuesto tóxico (Rosario y Rodríguez., 2005).

En otros estudios se evaluó la respuesta del fenotipo de *R. microplus* a la cipermetrina y se determinó la mutación del gen del canal de sodio lo cual confería resistencia a este compuesto de tipo recesivo con efecto materno (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

B) Control biológico

Esta técnica consiste en introducir un microorganismo vivo o sus productos, para impedir o reducir las pérdidas o daños ocasionados por los organismos nocivos y producir un control poblacional (IOBC, 2018). Por ejemplo, el uso de avispas del género *Ixodiphagus* se ha descrito como una medida de control, esta avispa deposita sus huevos en la cavidad corporal de estadios inmaduros de garrapatas; tras la eclosión, las larvas se alimentan de los tejidos de la garrapata; la avispa emerge como adulto rasgando la cutícula de la garrapata que muere en el proceso (Mwangi *et al.*, 1997).

En cuanto a hongos, las especies descritas son *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Quesada y Álvarez, 2008). Los efectos nocivos de estos hongos sobre las garrapatas incluyen temblores, parálisis, así como también alteraciones tanto en el metabolismo de los perfiles lipídicos, la grasa corporal y el agua metabólica (Abdigoudarzi *et al.*, 2009).

Estos hongos tienen la afinidad de penetrar el exoesqueleto causando el daño y la muerte de las garrapatas (Quesada y Álvarez, 2008).

C) Control inmunológico Vacunas contra *R. microplus*

Debido a los efectos negativos de los ixodicidas sobre el medio ambiente y la selección de garrapatas resistentes, el control inmunológico se ha convertido en una de las alternativas más prometedoras para combatir a estos vectores (Almazán *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2004).

Hablando sobre las actualizaciones de estudios, se menciona que se comenzó con la investigación de antígenos descubriendo el antígeno Bm91, que es una proteína caracterizada como carboxyldipeptidasa cuyo método de acción es parecido a la enzima de la angiotensina, la cual está involucrada en la presión sanguínea y regulación de líquidos en los vertebrados (Jarmey *et al.*, 1995), para después descubrir la proteína Bm95 identificada en células intestinales de las garrapatas *R. microplus* al igual que Bm86; sin embargo, ésta proteína se le denominó universal, ya que mostró buenos resultados contra cepas de garrapatas de distintas regiones

geográficas del mundo (García *et al.*, 2000). Además de Bm86 y sus variantes, en las últimas investigaciones se han encontrado diferentes antígenos que se encuentran en etapa experimental como candidatos vacunales; sin embargo, los antígenos han demostrado tener cierta efectividad, sin que hasta ahora ninguno de ellos haya alcanzado la fase comercial, su efectividad estaría sujeta a la variabilidad antigénica de las cepas de garrapatas de donde fueron aisladas (Guerrero *et al.*, 2012).

El origen de las vacunas anti-garrapatas fue aproximadamente a mediados de los años 80's, en donde se realizaron algunos ensayos inmunizando animales con proteínas derivadas de extractos crudos de hembras semi-repletas demostrando un efecto protector contra garrapatas. Sin embargo, las primeras vacunas utilizadas para el control de garrapatas en el ganado bovino fueron registradas entre 1993 y 1997, con los nombres comerciales TickGard® y Gavac® en Australia y América Latina, respectivamente (De la Fuente *et al.*, 2007; Vaca, 2010).

Actualmente, existe una vacuna recombinante que se encuentra disponible en México, Bovimune Ixovac®, esta vacuna se desarrolló aislando la proteína Bm86 de la membrana plasmática de células epiteliales del intestino de garrapatas y fue clonada mediante tecnología de ADN recombinante y expresada en *E. coli* en Australia, posteriormente en Cuba con el vector de expresión *Pichia pastoris* donde purificaron la proteína, y recientemente en México se tomó el germoplasma de una cepa mexicana de *R. microplus* esperando tener resultados prometedores. (Figura 14).

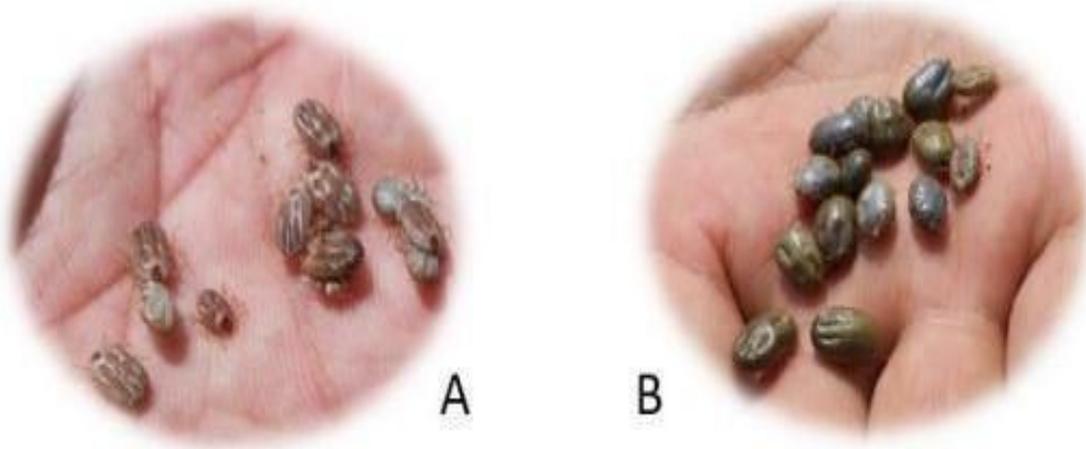


Figura 14. Efecto de la vacuna Bovimune Ixovac® sobre garrapatas *R. microplus*.

A) garrapatas alimentadas de bovinos vacunados B) garrapatas alimentadas de bovinos no vacunados.

Fuente: (Lagunes y Bautista, 2019).

2.3.2 Movilización controlada de ganado bovino

La movilización controlada es recomendada cuando se desea evitar que ganado portador de la enfermedad o infestado con garrapatas sea introducido a regiones libres. Actualmente, no hay actualizaciones sobre alguna norma que señale la movilización de ganado siendo específicamente para el control de la garrapata *Rhipicephalus* spp. ya que la norma en la Norma Oficial Mexicana NOM-019-ZOO-1994 fue cancelada en el año 2013; sin embargo, se sigue tomando esta norma como la más actual y en base a la misma se realiza la movilización.

En su apartado 13, menciona el conjunto de disposiciones emitidas por la SADER, para la movilización del ganado para lo cual se requiere de la obtención de la constancia de tratamiento garrapaticida y el certificado zoosanitario.

Finalmente, en el caso de la presencia de *Rhipicephalus* spp. en bovinos durante la inspección, estos últimos deberán someterse a un periodo de cuarentena (Norma Oficial Mexicana 1995).

2.3.3 Ganado resistente

Ha constituido una práctica bastante efectiva ya que consiste en seleccionar al ganado cebuino o cebú (*Bos indicus*) ya que han demostrado tener una habilidad para desarrollar inmunidad a la infestación superior que el ganado europeo (*Bos taurus*), esto debido a que hay reducción del número de garrapatas repletas y una baja en la oviposición por las garrapatas repletas (teleoginas) (Wiladsen, 2006). Se ha demostrado que la resistencia de la raza cebú pura es dominante ya que en un 85% son resistentes a la infestación por larvas de garrapatas en las primeras 24 horas después de la fase de encuentro esta característica es hereditaria, siendo las hembras más resistentes que los machos por lo cual también se ha estudiado el cruzamiento con esta raza en regiones donde el vector está presente (Jonsson, 2006).

2.3.4 Vacunación

En nuestros días en México no se cuenta con una vacuna comercial que se encuentre disponible contra la babesiosis bovina; sin embargo, en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), se cuenta con la tecnología del cultivo *in vitro* de *B. bovis* y *B. bigemina*, con dicha tecnología se puede emplear para la producción de una vacuna viva atenuada, la cual ya ha sido evaluada en distintos estudios de investigación y cuenta con una protección del 80-100% en bovinos susceptibles después de haber sido confrontados con cepas virulentas (Cantó *et al.*, 1996; Cantó *et al.*, 2003; Dalrymple *et al.*, 1993; Bautista *et al.*, 2012). En un estudio, se inmunizaron animales nativos de áreas endémicas para la babesiosis bovina en México, logrando una protección del 93% para animales menores de 9 meses, de 87% para aquellos entre 9 y 18 meses, de 93% para los que tenían entre 18 y 36 meses y de un 100% en los vacunados contra la enfermedad mayores a 36 meses (Ojeda *et al.*, 2010).

Sin embargo, se siguen haciendo investigaciones en el desarrollo de vacunas efectivas contra babesiosis y el documento más actualizado es el de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) publicado en el 2014 donde se describen las actualizaciones de las vacunas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tipos de vacunas existentes contra babesiosis bovina

Vacuna	Actualizaciones
Viva	Elaboradas de cepas atenuadas, son producidas <i>in vitro</i> , suelen ser virulentas en animales adultos y/o causar hipersensibilidad.
Muerta	Producidas a partir de sangre obtenida de becerros infectados con <i>B. divergens</i> , aún hay poca información sobre la inmunidad conferida.
Recombinante	Sin información actualizada
De sub unidades	Actualmente no existen vacunas
Otras	Existen vacunas con antígenos producidos <i>in vitro</i> , pero el nivel de inmunidad conferido no está comprobado.

(Adaptado de Florin-Christensen *et al.*, 2014).

2.5 Tratamiento contra la babesiosis bovina

En cuanto al tratamiento, el dipropionato de imidocarb es el fármaco de elección para las infecciones causadas por *B. bigemina*, empleando una dosis de 2.5-3.5 mg/kg por vía intramuscular (IM). Además, el diaceturato de diminazeno con una dosis de 3.5mg/kg IM en una sola aplicación (De la Sota, 2005). Por otro lado, en algunos casos se ha indicado la transfusión de sangre en etapas tardías de la

enfermedad, mientras que para recuperar a los bovinos enfermos se pueden administrar estimulantes hematopoyéticos, tales como, hierro y cobre, es importante considerar la administración de protectores hepáticos, vitamina B12, sueros isotónicos, sustancias energéticas y reconstituyentes también son necesarios para la revitalización y el fortalecimiento sistémico durante la fase de convalecencia (Cordero del Campillo, 1999). Además, es importante considerar una terapia de sostén, que incluya cardiotónicos, antihistamínicos, soluciones parenterales, vitamínicos y minerales (De la Sota, 2005).

2.6 Cultivo *in vitro* de *Babesia* spp.

Para la obtención del material biológico tradicionalmente se emplea un medio comercial (M-199) amortiguado con N hidroximetil y ácido aminoetanosulfónico (TES), suplementado con suero de bovino al 40% (v/v), adicionado con antibiótico (penicilina/estreptomicina); como sustrato se utilizan eritrocitos y suero de bovinos donadores. El restablecimiento se realiza a partir de material crioestabilizado adicionado con una suspensión de eritrocitos al 10% con medio complementado como se mencionó anteriormente, utilizando placas de 24 pozos en una atmósfera de 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂ a 37°C. El medio de cultivo se reemplaza cada 24 hrs y el subcultivo se efectúa cada 72 hrs (Figuerola *et al.*, 1984; Vega *et al.*, 1985). La expansión se realiza en botellas de cultivo de 25, 75 y 225 cm cuadrados y diariamente se realizaba la observación microscópica para determinar el porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP).

III Planteamiento del problema

La babesiosis bovina en México es una de las enfermedades transmitidas por vectores que constituye un problema para la ganadería, esta enfermedad afecta drásticamente la salud y tiene un impacto negativo en la producción en el ganado bovino. Por lo antes mencionado, la producción de proteína de origen animal, especialmente la leche y carne, aumenta su costo de producción y hay una baja competitividad en la actividad ganadera.

Los efectos asociados que se han descrito en los animales enfermos incluyen: disminución o suspensión de la producción de leche, pérdida de peso y condición corporal, abortos esporádicos, incremento de los gastos por el uso de fármacos para la terapéutica y por los servicios médicos veterinarios. Lo que ocasiona un aprovechamiento limitado del gran potencial de producción de las regiones tropicales (Ramírez *et al.*, 2011).

De acuerdo a los datos publicados por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, en el 2020 el inventario de ganado bovino en México constaba de 35,653,619 cabezas (SIAP, 2020); de las cuales, más del 70% están localizadas en regiones tropicales y subtropicales del país, regiones en donde se encuentra la mayor distribución de la garrapata vector de la babesiosis bovina *Rhipicephalus* spp. (Rojas *et al.*, 2004).

Además, en la actualidad la babesiosis bovina y la presencia de garrapatas limitan la movilización de ganado especializado en carne y/o leche, procedente de zonas libres de *Rhipicephalus* spp. hacia regiones tropicales y subtropicales (regiones de alta incidencia). Finalmente, dentro de las estrategias para el control de la babesiosis bovina, la vacunación resulta ser el método más eficaz para prevenir la enfermedad, cabe mencionar que en México no existen vacunas contra la babesiosis bovina de forma comercial. Sin embargo, el CENID-SAI, INIFAP en la Unidad de Babesia ha desarrollado una vacuna mixta derivada de cepas atenuadas y establecidas en cultivo *in vitro* que ha sido validada en diferentes estudios de investigación desde hace 30 años, y la cual confiere protección mayor al 80% (Rojas *et al.*, 2016). Por lo antes mencionado, es de suma importancia conocer la dinámica

clínica, inmunológica y molecular de una cepa atenuada y una cepa virulenta inoculadas de forma experimental en bovinos *Bos taurus*.

IV. Justificación

La babesiosis bovina es un gran problema en la producción ganadera en México, debido a que afecta a la producción generando grandes pérdidas económicas provocando el descenso en la productividad de los animales enfermos, además de mermar la producción de carne y leche, también provoca abortos y en ocasiones la muerte en infecciones agudas (Jenkins, 2001), siendo esto principalmente en clima tropical y subtropical de México y el mundo. En diferentes estudios se ha demostrado la elevada morbilidad y mortalidad de la babesiosis, por lo que el control del vector y la movilización controlada de ganado susceptible a zonas endémicas son las principales estrategias que se usan para el control de esta enfermedad. Sin embargo, la inmunización es la mejor estrategia de prevención y/o control; específicamente se ha recurrido a la exposición con parásitos atenuados, para promover una respuesta inmune (García *et al.*, 2003). Cabe destacar que actualmente en México, no existe una vacuna comercialmente disponible, de tal modo en el CENID-PAVET, ahora CENID-SAI del INIFAP se ha desarrollado la metodología para elaborar una vacuna mixta atenuada contra *B. bigemina* y *B. bovis*, ambas atenuadas por un número indefinido de pases en cultivo *in vitro*. Por lo antes mencionado, este trabajo es fundamental al comparar clínicamente e inmunomolecularmente la inoculación en bovinos de la cepa atenuada (vacunal) y la cepa virulenta de *B. bigemina*, así mismo, al obtener el material biológico se continuará con investigaciones, para determinar diferencias a nivel de la expresión génica de cada una de las especies, con la finalidad de conocer y establecer patrones de patogenicidad/virulencia en cada una de las cepas.

V. Hipótesis

La infección de los bovinos inoculados con la cepa virulenta tendrá una signología severa asociada a la babesiosis bovina causada por *Babesia bigemina* a diferencia de los bovinos inoculados con una cepa empleada como vacuna viva atenuada en distintas investigaciones a lo largo de más de 30 años en México.

VI. Objetivos

6.1 General

Evaluar la infección experimental de bovinos y realizar el monitoreo clínico e inmuno-molecular después de la inoculación de una cepa virulenta y una cepa atenuada de *Babesia bigemina*.

6.2 Específicos

- Comparar el periodo de incubación, signología y el monitoreo clínico/subclínico de un bovino infectado con una cepa virulenta y una atenuada de *Babesia bigemina*.
- Evaluar la respuesta inmune entre los bovinos infectados experimentalmente con una cepa virulenta y una atenuada.
- Realizar el monitoreo inmunomolecular de una cepa virulenta y una cepa atenuada de *Babesia bigemina*

VII. Materiales y Métodos

7.1 Localización

El estudio se llevó a cabo en el CENID-SAI del INIFAP, ubicado en carretera Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Colonia Progreso, C.P. 62574 Jiutepec, Morelos. El clima en la región se caracteriza por ser de tipo subtropical cálido con lluvias en verano. Para la fase de campo se utilizaron las instalaciones del Centro como corrales y manga para el manejo de ganado. El clima en la región es subtropical caluroso con lluvias en verano y una temperatura media de 21.2°C, su variante media máxima es 31.4°C, su máxima absoluta es de 39.8°C, la mínima media baja es 10.8°C y la mínima absoluta 0.5°C.

Por otro lado, la fase de laboratorio que incluyó el procesamiento e instrumentación de las técnicas, se realizó en la Unidad de Babesia del centro antes mencionado.

7.2 Bovinos experimentales y diseño experimental

Se emplearon siete bovinos nativos de una zona libre de garrapatas a los que previamente se les realizaron pruebas serológicas y moleculares para determinar que se encontraban libres de la presencia de parásitos y de anticuerpos contra *Babesia* spp. Además, se realizaron las pruebas oficiales para Brucelosis y Tuberculosis. Uno de los bovinos (0804), fue esplenectomizado con la técnica descrita (Anexo 12.1), para posteriormente ser inoculado con una cepa virulenta de *B. bigemina* con el fin de reactivar la cepa criopreservada. Los seis bovinos restantes, fueron distribuidos en dos grupos, considerando su edad, peso y características físicas generales como condición corporal y tamaño (Cuadro 5).

Los bovinos del Grupo I (GI), fueron inoculados en fresco con 1×10^8 eritrocitos infectados, derivados del bovino previamente esplenectomizado e inoculado con una cepa virulenta de *B. bigemina*. Los bovinos del Grupo II (GII), fueron inoculados con 1×10^8 eritrocitos infectados de una cepa atenuada (cepa vacunal) procedente del cultivo *in vitro*, ambos grupos fueron inoculados por vía intramuscular profunda y posteriormente, se realizó el monitoreo clínico diario. Es importante mencionar que, durante el estudio de investigación, el manejo de los bovinos se llevó a cabo conforme las normas bioéticas aprobadas por el comité del CENID- SAI del INIFAP.

Cuadro 5. Grupos experimentales de bovinos, describiendo la dosis y cepa empleada en cada grupo.

Grupo I	Descripción	Grupo II	Descripción
	Dosis de 1×10^8 de eritrocitos parasitados con una cepa virulenta de <i>B. bigemina</i>		Dosis de 1×10^8 de eritrocitos parasitados con una cepa atenuada de <i>B. bigemina</i>

7.3 Cepa virulenta

La cepa virulenta que se utilizó proviene de un aislado de campo de *B. bigemina* que se obtuvo de un caso clínico en México, esta cepa se ha mantenido a través de pases alternos en bovinos y almacenada en criopreservación a -196°C en nitrógeno líquido (Figueroa *et al.*, 1998).

7.4 Cepa atenuada

La cepa atenuada de *B. bigemina*, es una población de parásitos derivada originalmente de un aislamiento virulento de México y procedente de un caso clínico de babesiosis. La cepa fue adaptada al cultivo *in vitro* utilizando un sistema microaerófilico estacionario (Vega *et al.*, 1986) y se ha mantenido alternadamente en cultivo continuo y en criopreservación desde entonces (Rojas *et al.*, 2009).

7.5 Monitoreo clínico

A partir de la inoculación, los bovinos se mantuvieron en monitoreo diariamente, registrando la temperatura rectal (TR), el volumen celular aglomerado (VCA) por la técnica de microhematocrito. También fueron tomadas muestras sanguíneas de la vena coccígea utilizando tubos vacutainer estériles con anticoagulante (EDTA) y sin anticoagulante los cuales se etiquetaron con la identificación de cada bovino y fueron transportados al laboratorio en una hielera con refrigerantes una vez homogenizada la sangre con el anticoagulante . En el laboratorio, se elaboraron frotis su evaluación vía microscópica y así confirmar o descartar la presencia de eritrocitos parasitados, se determinó el porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP). Se registraron en una bitácora los signos clínicos asociados con la presencia de la enfermedad.

7.6 Frotis sanguíneo

Método directo de diagnóstico que consiste en observar parásitos mediante el examen microscópico de extendidos sanguíneos teñidos con Giemsa.

Material:

- ❖ Muestra de sangre
- ❖ Tinción de Giemsa
- ❖ Agua
- ❖ Pipeta
- ❖ Vaso de tinción
- ❖ Tina de tinción
- ❖ Microscopio óptico
- ❖ Aceite de inmersión

Metodología

Brevemente, consistió en colocar una pequeña gota de sangre total en un extremo del portaobjetos tratando de que la gota sea de la muestra sedimentada sin que se mezclara con el sobrenadante, con la ayuda del extremo de otro portaobjetos se

realizó un extendido hacia el lado contrario donde se colocó la gota, y se dejó secar por completo la muestra. Una vez que se secó, esta se fijó con alcohol metílico absoluto, y posteriormente se realizó una tinción con Giemsa durante 10 minutos, se enjuagó el frotis y finalmente se llevó al microscopio para poderlo observar a 100X utilizando aceite de inmersión.

7.7 Volumen celular aglomerado

La babesiosis al ser una enfermedad donde el protozoario lleva su ciclo intraeritrociticamente es común que se encuentre la presencia de estos durante el análisis de una muestra sanguínea. Al representar un 60% del volumen total se puede realizar un hematocrito y se determina por centrifugación de un volumen de sangre. Las células tienen mayor peso con relación al plasma por lo cual estas se sedimentan al fondo del tubo durante el proceso de centrifugación, esta técnica permite diagnosticar enfermedades relacionadas con la evaluación de eritrocitos (Bradley, 2014). Durante el transcurso de la enfermedad el hematocrito descenderá gradualmente conforme se presente la infección, esto se relaciona con el incremento exponencial de eritrocitos parasitados, siendo el valor de referencia de hematocrito en bovinos de 30 a 40% (Bautista, *et al.*, 2012).

Material:

- ❖ Muestra de sangre
- ❖ Microcentrífuga
- ❖ Tubos de microhematocrito
- ❖ Regla

Metodología

La técnica consistió en llenar el capilar con la muestra de sangre, posteriormente se colocó un tapón de plastilina por ambos lados y se centrifugó por 5 minutos, el porcentaje de hematocrito se calculó mediante una regla de tres tomando como

100% la medición en centímetros del plasma más eritrocitos, y donde la incógnita representó la medición en centímetros de los eritrocitos.

Medida de la muestra en cm 100%

Medida de eritrocitos en cm ¿? Dependerá del resultado

7.8 Monitoreo inmunológico

Se recolectaron muestras de sangre diariamente de los bovinos de ambos grupos para la separación del suero. El suero obtenido sirvió para determinar el título máximo de anticuerpos anti-*B. bigemina* desde el día 0 hasta el día 21 post-inoculación (P. I.).

7.8.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Material:

- ❖ Antígeno de *B. bigemina*
- ❖ Control positivo de *B. bigemina* FAO
- ❖ Control negativo de *B. bigemina* FAO
- ❖ Buffer PBS
- ❖ Cámara húmeda
- ❖ Microscopio de epifluorescencia
- ❖ Lápiz graso
- ❖ Micropipetas

- ❖ Acetona
- ❖ Incubadora
- ❖ Agitador

- ❖ Agua destilada
- ❖ Suero de cabra anti-IgG de bovino conjugado con Alexa flúor 488
- ❖ Caja de Coplin

La detección de anticuerpos en los bovinos experimentales contra *B. bigemina* se determinó mediante IFI a partir de los sueros recolectados previamente. El antígeno (laminillas con eritrocitos parasitados) y que derivó del bovino esplenectomizado e inoculado con la cepa virulenta, se fijó con acetona y posteriormente, se agregó la dilución de cada suero. Como conjugado se utilizó suero de cabra anti-IgG de bovino conjugado con Alexa flúor 488.

Las laminillas fueron mantenidas a 37 °C por 30 min, a continuación, se les realizó un lavado con Solución Bufferada de Fosfatos (PBS). Para la titulación de anticuerpos se realizaron diluciones dobles seriadas a partir de 1:80 – 1:10240 (Rodríguez-Vivas y Cob, 2005).

7.8.2 Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA)

Material:

- ❖ Placa de 96 pozos
- ❖ Solución Buffer de carbonatos
- ❖ PBS pH de 7.0-7.2
 - ❖ Albumina de suero bovino
- ❖ Muestras de suero
- ❖ Suero de conejo anti-IgG de bovino conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP)
- ❖ Sustrato tetrametil bencidina (TMB)
- ❖ Espectrofotómetro (lector de microplacas de ELISA)

Se realizó la técnica de iELISA en fase sólida, utilizando como antígeno la proteína recombinante RAP-1 (Proteína Asociada a Roptrias-1) de *B. bigemina*. Brevemente, las placas de poliestireno empleadas para el ELISA fueron sensibilizadas usando un volumen de 100 μ L/pozo de la proteína (1.6 μ g/mL) diluida en un buffer de carbonatos (pH 9.6). Las placas se incubaron a 4 °C durante la noche. Continuando con un bloqueo con albumina de suero de bovino (BSA) al 3% en PBS-Tween al 0,1%, dejando incubar las placas durante 30 min a 37 °C para que después se realizaran tres lavados con PBS-Tween al 0,1%. Consecutivamente, se agregaron 50 μ L de las muestras de suero incluyendo controles positivo y negativo diluidos 1:100 en PBS. Se dejaron incubar a 37 °C durante 1 hora, como paso siguiente se realizaron tres lavados con PBS-Tween al 0,1%. Subsecuentemente, se adicionaron 100 μ L del suero de conejo anti-IgG de bovino conjugado con HRP diluido 1:10,000 en PBS, las placas se dejaron incubar a 37 °C durante 30 min. Continuando con tres lavados con PBS-Tween al 0,1%. Se adicionaron a cada pozo de la placa 50 μ L del sustrato TMB, dejándose incubar las placas a 37 °C durante 30 min.

Finalmente, se realizó la lectura en un espectrofotómetro (BIO-RAD®), determinando los valores de absorbancia a una densidad óptica de 405 nm. (Santamaria *et al.*, 2020).

7.9 Extracción de ADN

Material:

- ❖ Kit de extracción de ADN UltraClean BloodSpin, MO BIO Laboratories, Inc
- ❖ Go Taq Green mezcla maestra (PROMEGA®, Madison, WI, USA), PCR
- ❖ Agua libre de nucleasas
- ❖ Termociclador

En la extracción de ADN, se utilizaron guantes de nitrilo en todo momento. La extracción se realizó a partir del paquete de eritrocitos obtenido de centrifugar los tubos con el anticoagulante, después de la descongelación el paquete de eritrocitos de cada muestra se lavó con saponina, hasta obtener un botón de color rosado. Posteriormente, se siguieron las especificaciones descritas por el fabricante del kit

comercial (UltraClean BloodSpin, MO BIO Laboratories, Inc), esta prueba se realizo diariamente desde el día 0 hasta el día 15.

7.9.1 Reacción en cadena de la polimerasa-anidada (PCR-A)

La detección de ADN de *B. bigemina* se realizó por reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR-A) utilizando secuencias específicas de iniciadores y protocolos de amplificación publicados anteriormente (Figueroa *et al.*, 1993). Las reacciones de amplificación se prepararon con 2 µL del producto de amplificación de la PCR sencilla (templado), 2 µL de los iniciadores de sentido y anti-sentido para el gen *SpeI-Aval* de *B. bigemina*, 12.5 µL de la Go Taq Green mezcla maestra (PROMEGA®, Madison, WI, USA) y 8.5 µL de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 25 µL. Posteriormente, se empleó el siguiente protocolo de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C 1 min, alineamiento a 57°C 1 min, extensión 72°C 1.5 min y una extensión final a 72°C 15 min. Finalmente, la visualización de los fragmentos se realizó después de someter los productos de amplificación a electroforesis en gel de agarosa (Cuadro 6).

Cuadro 6. Protocolo para la amplificación por PCR sencilla y anidada del gen *SpeI-Aval* de *B. bigemina*.

Fase/protocolo	Sencilla	Anidada
Desnaturalización inicial	95°C por 5 min	95°C por 5 min

Desnaturalización	95°C por 1 min, 34 ciclos	95°C por 1 min, 34 ciclos
Alineamiento	65° C por 1 min	60° C por 1 minuto
Extensión	73° C por 1.30 minutos	73° C por 1.30 minutos
Extensión final	72° C por 15 minutos 4° C	72° C 15 minutos 4° C

7.9.2 Visualización de los productos de amplificación por PCR

El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con 2 µL de bromuro de etidio (10mg/mL), para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó un marcador molecular de X pb (Fermentas). Del producto de amplificación obtenido en la PCR, se colocaron 15 µL en cada pozo, las muestras se sometieron a electroforesis en un campo eléctrico de 90 V en presencia de buffer TAE 1X.

VIII. Resultados

Dado que los bovinos inoculados con la cepa virulenta una vez que fue reactivada en el bovino esplenectomizado presentaron la signología característica de la

babesiosis bovina y que dichos signos fueron muy leves en los bovinos inoculados con la cepa atenuada, se acepta la hipótesis planteada para la investigación.

En este estudio se lograron obtener distintos datos que se fueron recopilando durante todo el monitoreo clínico e inmunomolecular. Como periodo de incubación se tuvo un promedio de 5 días en ambos grupos, cabe mencionar que la signología clínica asociada a la babesiosis bovina causada por *B. bigemina* solo se logró observar en los animales del GI, los cuales, una vez que se obtuvo el PEP deseado los bovinos fueron tratados con diaceturato de diminazeno (efecto hemoparasiticida) por vía intramuscular (IM) durante tres días a una dosis de 3.5 mg/kg, mientras que a los animales del GII no requirieron tratamiento. Además, de tratamientos paliativos con 30 mg/kg de dipirona sódica por vía IM. El material biológico recuperado alcanzó un 12.6% de eritrocitos parasitados (PPE), lo cual sirvió para la elaboración de extendidos de sangre (frotis) para su uso como antígeno en la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

8.1 Monitoreo clínico en el bovino esplenectomizado

El bovino esplenectomizado (0804) y posteriormente inoculado con una cepa virulenta de *B. bigemina*, presentó una temperatura rectal de 40°C a partir del día 5 P. I., manteniéndose con fiebre hasta el día que se le dio tratamiento (día 8 P. I.). Respecto a la lectura de frotis sanguíneos, se observaron trofozoitos al día 3 P. I. Llegando a un PEP del 9.8 % (Figura 15). Cabe mencionar que el bovino presentó anemia hemolítica severa asociada a la infección por *B. bigemina*, así como también hemoglobinuria (Figura 16 A) y un descenso del volumen celular aglomerado (Figura 16 B), llegando al 11 % (Hto).

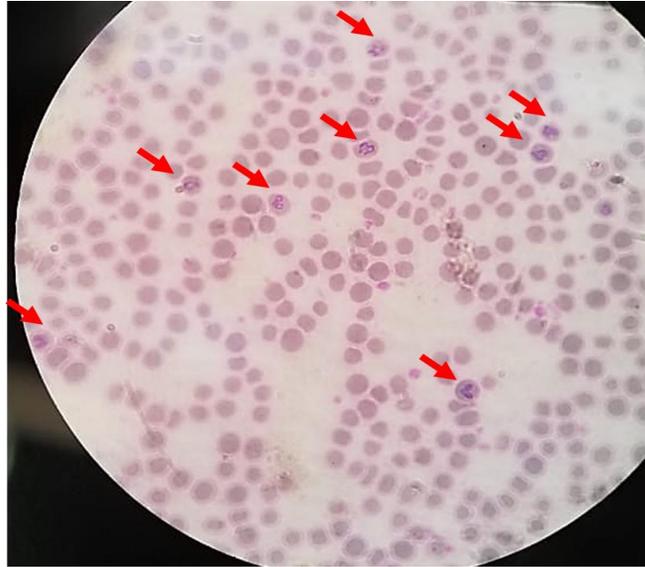


Figura 15. Representación de un PEP del $\geq 10\%$, durante la recuperación y activación de la cepa virulenta de *B. bigemina* en el bovino esplenectomizado.

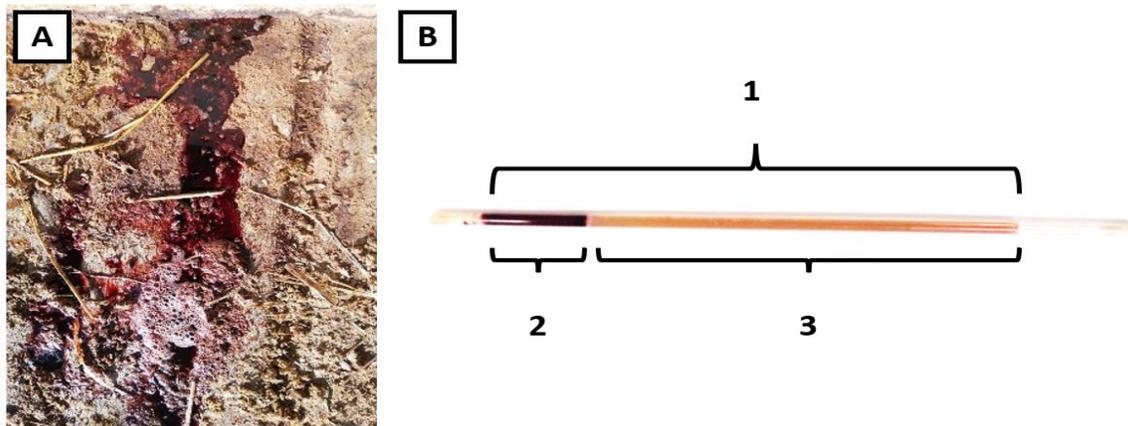


Figura 16. Hemoglobinuria en bovino inoculado con la cepa virulenta (A). Volumen celular aglomerado (VCA) mediante la técnica de microhematocrito, logrando observar que, del total de los eritrocitos, más el plasma (1), el porcentaje que representa los eritrocitos es del 11% (2), el plasma se logra visualizar hemolizado, debido a la severidad de la infección (3).

8.2 Monitoreo clínico en los bovinos inoculados experimentalmente

Los tres bovinos inoculados con la cepa virulenta (GI), presentaron fiebre (≥ 40 °C) al día 4 P. I. (Figura 17), y el VCA mediante la técnica de microhematocrito descendió a partir del día 5 P. I., llegando al 11.3 % en un bovino al final del monitoreo (Figura 18), la presencia de los parásitos se determinó mediante microscopía con la lectura de los frotis sanguíneos al día a partir de los días 5 y 6, logrando obtener el material biológico en uno de los bovinos al día 8 y 9 P. I. Todos los bovinos del GI, posteriormente se trataron con los mismos principios activos que el animal esplenectomizado.

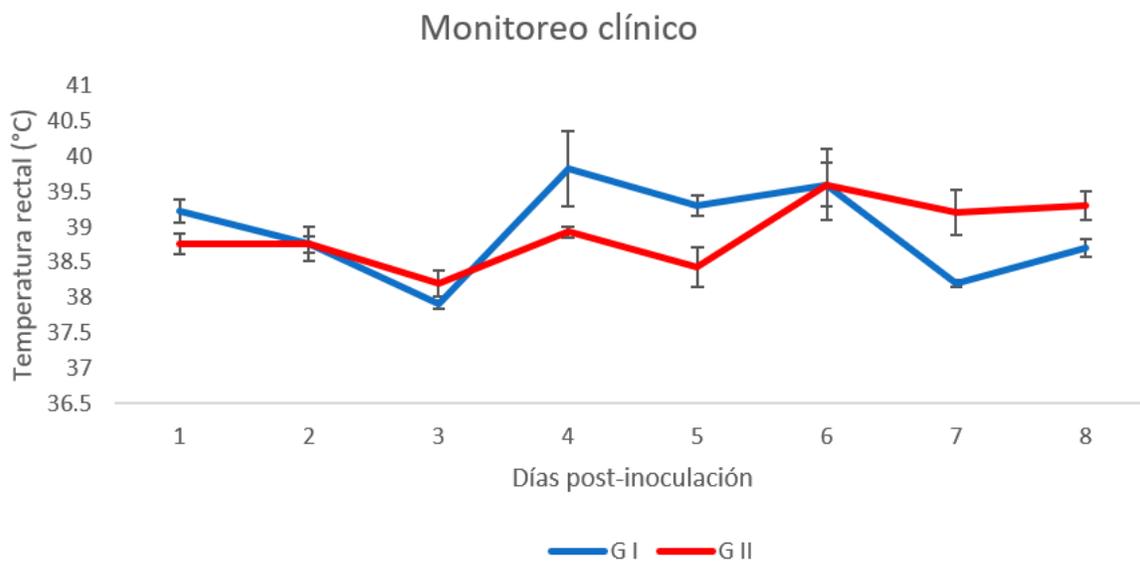


Figura 17. Comportamiento de la temperatura rectal (promedio \pm desviación estándar) en los bovinos inoculados con una cepa virulenta y atenuada de *B. bigemina*.

En el GII que fue el que se inoculó con una cepa atenuada de *B. bigemina* los bovinos presentaron un promedio de temperatura más bajo en el día 4 y 5 P. I., siendo hasta el día 6 P. I. que llegaron a 39.5 °C manteniéndose así, sin llegar a rangos de fiebre. Respecto al VCA mediante la técnica de microhematocrito, los valores se mantuvieron constantes, considerando individualmente los rangos

basales. Sin embargo, se observó un ligero descenso a partir del día 3 P. I., obteniendo niveles basales en el día 8 P. I. en el bovino 0797 (26.3%), día 5 PI del bovino 0803 (19.6%) siendo las muestras de este mismo las que durante todo el monitoreo resultaron con un porcentaje más bajo y el día 4 PI en el bovino 0806 (24.07%). Cabe mencionar que, al no manifestar signología clínica clásica de babesiosis, no se administró tratamiento en ninguno de los bovinos de este grupo.

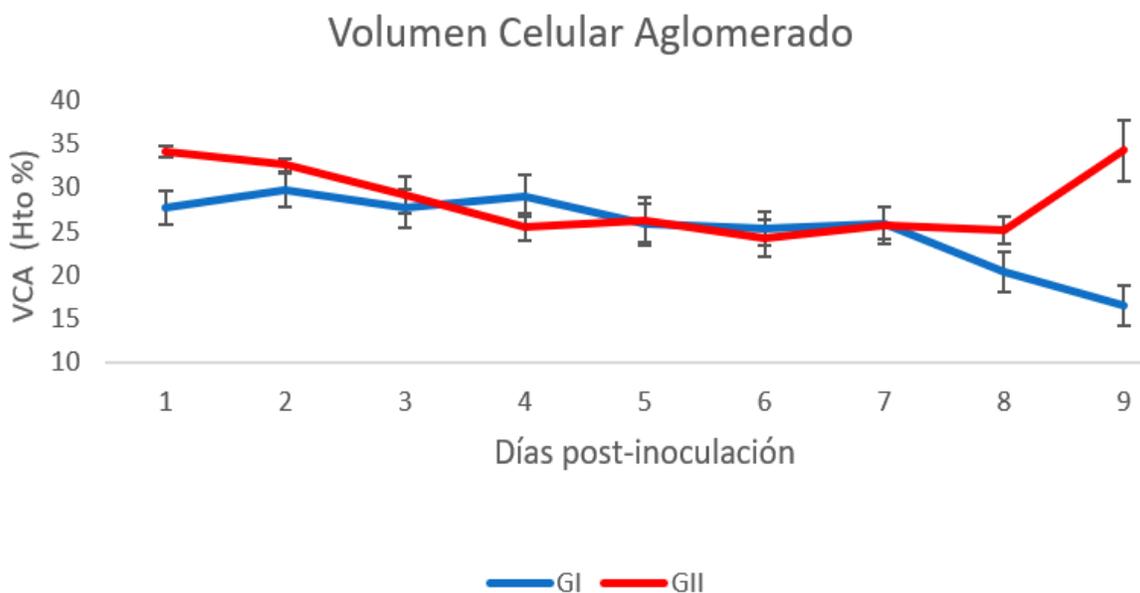


Figura 18. Monitoreo del volumen celular aglomerado (VCA) mediante la técnica de micro hematocrito en los bovinos inoculados con una cepa virulenta y una cepa atenuada de *Babesia bigemina* a lo largo del monitoreo clínico (promedio \pm D. E.).

La presencia de parásitos se determinó mediante microscopía, con la lectura de los frotis sanguíneos, teniendo un porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) del 8% y <1%, para el G I y G II, respectivamente (Figura 19).

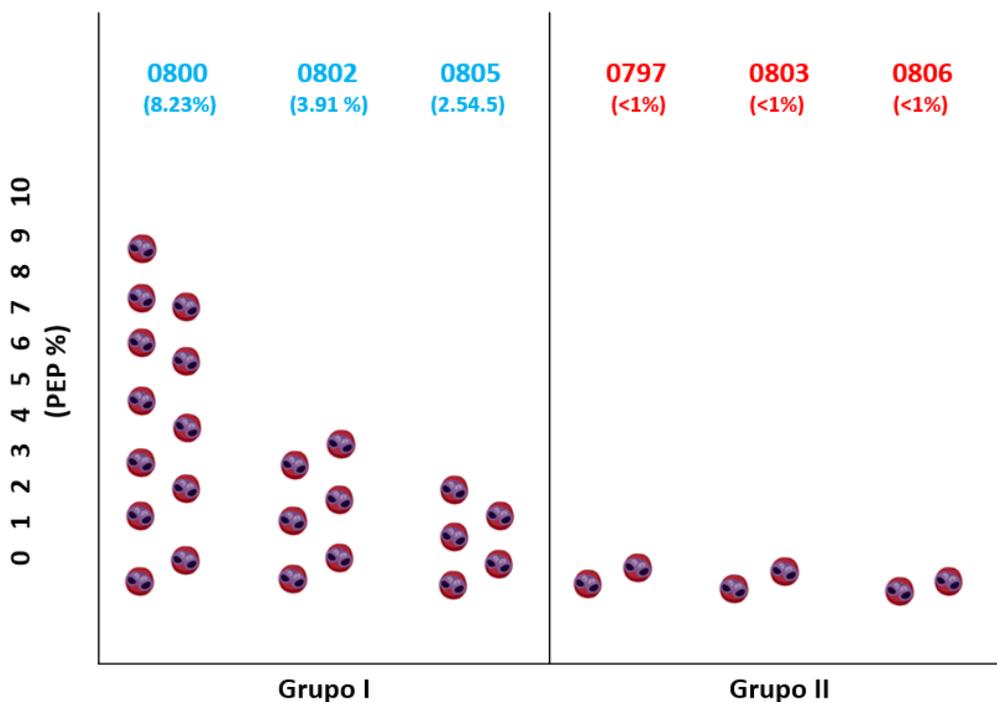


Figura 19. Representación gráfica del PEP de cada uno de los bovinos inoculados con la cepa virulenta (Grupo I), y con la cepa vacunal (Grupo II).

8.3 Monitoreo inmunológico

8.3.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Para el monitoreo inmunológico, mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se utilizó un conjugado comercial anti-IgG de bovino en cabra (Alexa flúor 488) con una dilución 1:1800. 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 grupos.

A la lectura en el microscopio de epifluorescencia se observó que, en promedio, en el GI se encontraron títulos de anticuerpos 1:80 a partir del día 7 P. I., mientras que en los días 8 PI se encontraron títulos hasta 1:160, posteriormente se encontraron

títulos de anticuerpos hasta 1:320 en el día 9 P. I. hasta el día 12 PI, para el día 12 se obtuvieron títulos de anticuerpos hasta 1:640. Finalmente, en el día 14 PI se encontró la mayor titulación de anticuerpos llegando hasta 1:1280.

En el G II, se observaron valores similares, seroconvirtiendo al día 7 P. I. a una dilución 1:80, llegando a un máximo de títulos de anticuerpos al día 21 P. I. con 1:1280 (Figura 20).

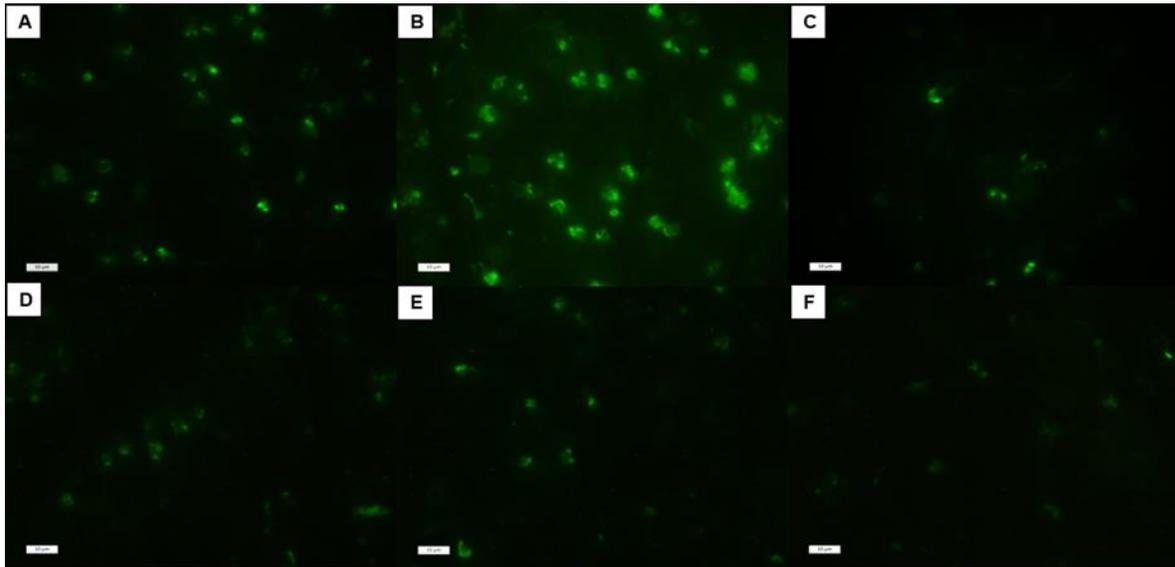


Figura 20. Representación de la cinética y título de anticuerpos específicos contra *Babesia bigemina*, mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI). A-F, corresponden a las diluciones doble seriadas, a partir de 1:80 a 1:2 560. Fotografías tomadas bajo el microscopio de epifluorescencia, 100 X, de la unidad de Babesia del CENID-SAI, INIFAP.

8.3.2 Ensayo Inmunoenzimatico indirecto (ELISAI)

Los resultados obtenidos en el monitoreo inmunológico, con la prueba de ELISAI, empleando como antígeno la proteína recombinante RAP-1 (Antígeno Asociado a Roptrias-1) se muestran en la Figura 21. Para determinar la cinética de anticuerpos específicos contra *Babesia bigemina* se estableció en primera instancia el punto de corte (promedio de la DO de los controles negativos +3 desviaciones estándar).

Cabe mencionar que se consideró como positivos todos aquellos sueros que presentaron DO superior con relación al punto de corte.

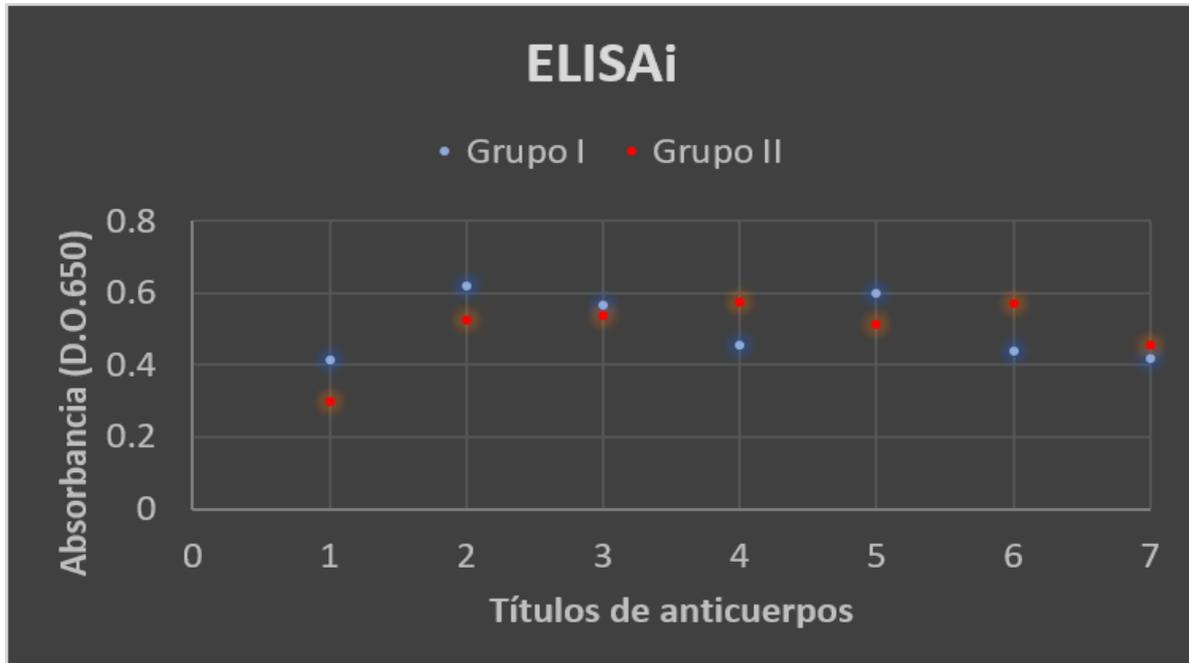


Figura 21. Representación de la cinética de anticuerpos específicos de *Babesia bigemina*, empleando ELISAi.

8.4 Monitoreo molecular

Las bajas parasitemias obtenidas en los bovinos inoculados con la cepa vacunal (GII), se lograron demostrar mediante microscopía con la lectura de los frotis sanguíneos. Sin embargo, a nivel molecular se determinó la detección y establecimiento de los antígenos virulentos y vacunales, logrando visualizar el fragmento de amplificación de 170 pb en el formato de PCR-A. Es importante mencionar que las muestras obtenidas en la extracción de ADN, se sometieron a la prueba de PCR sencillo y PCR anidada (Figura 22). Mediante la PCR- A, se logró detectar el parásito a partir del día 4 PI para ambos grupos (Figura 23).

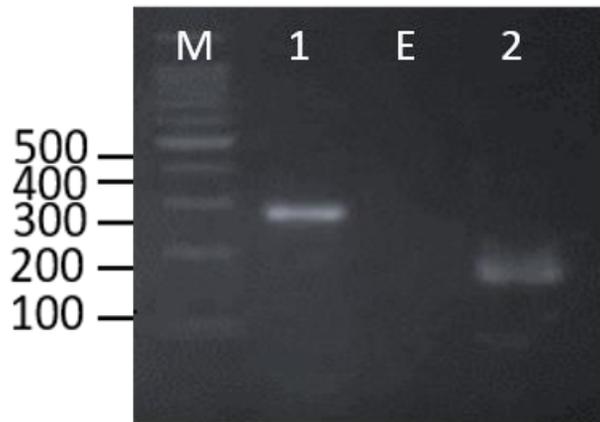


Figura 22. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. M: marcador molecular de 100 pb., 1: Control positivo derivado de eritrocitos infectados con *Babesia bigemina* amplificados mediante PCR sencillo (amplicon de 278) pb), E: espacio, 2: Control positivo derivado de eritrocitos infectados con *Babesia bigemina* amplificados mediante PCR-A (amplicon de 170 pb).



Figura 23. Figura 23. Visualización de los productos de amplificación por PCR-A, mediante el análisis del gel de agarosa al 2.5 % teñido con bromuro de etidio. Correspondiendo de la siguiente manera; M: marcador molecular de 100 pb.; E: espacio; 2-8: muestras obtenidas de los días P. I., a partir del día 1 al día 7 P. I., 9: control negativo 10: control de reacción (agua libre de nucleasas).

IX. Discusión

9.1 Monitoreo clínico en el becerro esplenectomizado

Durante el monitoreo en el becerro esplenectomizado e inoculado con la cepa mexicana virulenta de *Babesia bigemina*, se lograron observar parámetros y una signología severa asociada exclusivamente en las infecciones generadas por la presencia de *Babesia bigemina*, tal cual la literatura lo describe. Iniciando por el exitoso establecimiento de la cepa, morfológicamente a la microscopia se mostró pleomórfica, con un par de corpúsculos en forma de pera, unidos en ángulo agudo dentro de un eritrocito maduro, de 4 a 5 μ de largo por 2 μ de ancho (Quiroz, 2011; Álvarez, *et al.*, 2019).

En cuestiones de la signología clínica, la temperatura rectal se asocia a la enfermedad, ya que cuando hay liberación de pirógenos endógenos, especialmente IL-1, citosina que está estrechamente relacionada con la inmunidad contra *Babesia* spp. (Brown y Palmer, 1999).

9.2 Monitoreo clínico en los bovinos inoculados experimentalmente

Estudios previos han analizado el monitoreo clínico y serológico en bovinos inoculados con cepas vacunales de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, los cuales han sido confrontados en campo o bajo condiciones controladas. Así mismo, se han evaluado distintas dosis vacunales, con el fin de determinar la eficacia de la vacuna y modificaciones en la obtención de la vacuna derivada de cultivo *in vitro* (Cantó *et al.*, 1996; Cantó *et al.*, 1999; Cantó *et al.*, 2003; Bautista *et al.*, 2016).

En el presente estudio, los parámetros clínicos que se evaluaron fueron, la temperatura rectal, el volumen celular aglomerado y el PEP, este primer parámetro, en el GI, inoculado con la cepa virulenta, se presentó fiebre superior a los 40 °C., y como ya se mencionó anteriormente, la fiebre se considera dentro de los signos clínicos de la babesiosis bovina, es importante mencionar que los rangos normales de la temperatura rectal en los bovinos son de 38 a 40°C, sin embargo, esto dependerá de distintos factores, como la raza, edad y el ambiente en el que se encuentre localizado, por mencionar algunos (Trigo y Valero, 2004). Por lo

previamente descrito, en el presente estudio se determinaron parámetros basales de manera individual en cada grupo experimental. Los resultados obtenidos, son similares a los estudios previamente realizados, comparando con la fase de confrontación, es decir, cuando los bovinos, son expuestos a las cepas virulentas, ya sea en una confrontación de campo o de manera experimental.

Por otro lado, en el GII, los bovinos, no presentaron fiebre, mientras que en trabajos anteriores al día 8 PI se ha descrito fiebre (40.4°C) en los animales a los que se administró el mismo tipo de vacuna (Cantó *et al.*, 2003).

Respecto al descenso de los valores de Volumen Celular Aglomerado, en los bovinos del GI, se asocia a la presentación severa de la babesiosis bovina, especialmente a infecciones por *Babesia bigemina*, además, de la presentación de hemoglobinuria la cual se distingue por la coloración rojo oscura de la orina, lo cual es indicativo de la gravedad del padecimiento y que generalmente va acompañada de una caída drástica del porcentaje del VCA (hematocrito, paquete celular), también pueden ocurrir otros signos, tales como estreñimiento, deshidratación, temblor muscular, debilidad, postración y muerte (Cordero del Campillo, 1999). En estudios similares se ha observado el descenso del hematocrito del 21.4% y 34.2% respecto a valores basales, en donde se administraron dosis de 1×10^8 de *B. bovis* y 1×10^8 de *B. bigemina* (Cantó *et al.*, 1996; Cantó *et al.*, 2003).

Con relación al establecimiento de los parásitos vacunales y virulentos, se determinó mediante la lectura de frotis sanguíneos, logrando obtener altas parasitemias en el GI, mientras que en el GII, la identificación de trofozoítos y/o merozoítos fue más complicada, por lo antes mencionado, se han implementado diferentes técnicas para diagnosticar la babesiosis bovina, generalmente la primera opción es el frotis de sangre fina o gruesa teñido con Giemsa para demostrar microscópicamente la presencia de parásitos, en presencia de cuadros clínicos (Álvarez *et al.*, 2019). En estudios previos se ha determinado el establecimiento de cepas vacunales con un PEP del 0.01%, para *Babesia* spp. (Bautista *et al.*, 2012).

9.3 Monitoreo inmunológico

Para determinar anticuerpos anti-*Babesia* spp. existen distintas pruebas serológicas, tales como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), técnica considerada como la técnica de oro y es importante mencionar que tiene una elevada sensibilidad y especificidad diagnóstica (>90%) (Bautista *et al.*, 2012). Otra de las técnicas empleada es el ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISAI), esta técnica se caracteriza por ser un proceso semi-automático, el cual permite analizar un mayor número de muestras y elimina la subjetividad del operador (Rodríguez-Vivas y Cob, 2005). Respecto a los resultados obtenidos mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), fueron similares a lo reportado previamente, especialmente, en bovinos inoculados con la cepa vacunal de *Babesia bigemina*, durante la fase de vacunación, al obtener títulos de anticuerpos de 1:300 a 1:600 (Cantó *et al.*, 1996; Figueroa *et al.*, 1998; Cantó *et al.*, 2003).

Así mismo, se ha observado una seroconversión de anticuerpos IgG anti-*Babesia bigemina*, a partir del día 7 P.I., cabe destacar que el antígeno empleado durante este estudio fue obtenido y elaborado con el material biológico obtenido del animal esplenectomizado. Por otro lado, la técnica de ELISAI, se empleó como antígeno la Proteína Asociada a Roptrias (RAP-1) de *Babesia* (Mishra *et al.*, 1991; Suárez *et al.*, 1991; Dalrymple *et al.*, 1993). Los polipéptidos RAP-1 están presentes en las roptrias y superficie del merozoito vivo, caracterizada por su inmunogenicidad y por mantenerse conservada en diferentes aislados geográficos (Figueroa *et al.*, 1990).

En los resultados obtenidos durante el monitoreo inmunomolecular de este estudio se logró corroborar lo que la literatura describe respecto a la inmunidad en babesiosis bovina, la cual sugiere que la respuesta protectora involucra tanto a una respuesta de células T cooperadoras de tipo Th1 y la producción de anticuerpos opsonizantes y fijadores de complemento, así como también a la función efectora de los macrófagos. Además, se sabe que la resolución de la infección por *Babesia* spp. en el bovino podría estar relacionada con la citotoxicidad mediada por anticuerpos (Goff *et al.*, 1982). Se ha mencionado que las IgG neutralizan a los esporozoitos (Homer *et al.*, 2000).

9.4 Monitoreo Molecular

Molecularmente, se demostró y corroboró la presencia de parásitos circulantes mediante PCR específico para *B. bigemina*, lo cual ocurrió a partir del día 4-5 PI en ambos grupos. Como bien se sabe, los métodos moleculares basados en ADN se han desarrollado con grandes ventajas, tales como las altas tasas de sensibilidad y especificidad analíticas. Así mismo, ensayos de sensibilidad analítica mostraron la detección de tan solo 100 fg de ADN genómico del parásito equivalente al 0,0000001% de eritrocitos infectados la especificidad analítica se demostró por la falta de amplificación del ADN de otros hemoparásitos (Figueroa *et al.*, 1993, Álvarez *et al.*, 2019).

Finalmente, a lo largo del estudio se logró demostrar que la cepa virulenta mantenida en criopreservación en nitrógeno líquido, mantiene su elevada virulencia, una vez que se activa en un hospedador, para la recuperación y su posterior inoculación. Respecto a la cepa vacunal se sigue demostrando que no genera ninguna reacción anafiláctica, al ser una vacuna viva atenuada tampoco hay una reversión a la virulencia, siendo lo suficientemente antigénica para estimular de manera eficaz el sistema inmunológico de los bovinos del GII, al igual que lo reportado en estudios previos de la vacuna viva atenuada y derivada de cultivo *in vitro* contra la babesiosis bovina. (Cantó *et al.*, 1996; Cantó *et al.*, 2003; Bautista *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2017). Adicionalmente se ha demostrado su margen de seguridad, al no transmitirse por la garrapata vector *Rhipicephalus* spp., al menos después de dos pases sucesivos en bovinos (Rojas *et al.*, 2011).

X. Conclusión

Fue posible activar la cepa virulenta de *Babesia bigemina* que se encontraba en criopreservación por medio del uso de un bovino previamente esplenectomizado. Así mismo fue posible inocularla en un grupo de animales clínicamente sanos e inducir la presentación de babesiosis bovina, estos bovinos presentaron signología clínica característica de una infección por *B. bigemina* y una elevada parasitemia. Mediante el monitoreo clínico diario se pudo determinar el PEP, temperatura rectal, porcentaje de hematocrito y detección del parásito en frotis sanguíneo. El trabajo experimental en los dos grupos de bovinos se realizó en un ambiente controlado teniendo como resultado la infección esperada ya que el PEP que fue arriba del 1%, se presentó un aumento en la temperatura en ambos grupos y hubo un descenso del hematocrito mínimo del 50 % en el GI con una cepa virulenta y un 30% en el GII que se inoculó con una cepa atenuada; a pesar de que la cepa virulenta se ha mantenido en criopreservación ha conservado su virulencia. Se obtuvo material biológico para continuar realizando tanto pruebas serológicas como moleculares para el estudio de la babesiosis y futuras investigaciones.

Finalmente, se sabe que la cepa atenuada (vacunal) contra *Babesia bigemina*, confiere una protección como se ha reportado en estudio previos por parte del grupo de investigación de la unidad de Babesia del CENID-SAI, INIFAP, a diferencia de la presentación severa de signos clínicos con la inoculación de la cepa virulenta, para ello es de gran importancia conocer a nivel transcripcional que es lo que ocurre, para poder obtener nuevos blancos a nivel molecular, ya sea para diagnóstico y/o profilaxis de la babesiosis bovina.

XI. Referencias bibliográficas

Abdigoudarzi M, Esmaeilnia K, Shariat N. (2009). Laboratory study on biological control of ticks (Acari: Ixodidae) by entomopathogenic indigenous fungi (*Beauveria bassiana*). Irán J Arthropod Borne Dis. 3(2), 36-43.

Almazán C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, de la Fuente J. (2010). Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitol Res.* 106, 471-479.

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 JA, Rojas C, Figueroa JV. (2019). Diagnostic tools for the identification of *Babesia sp.* in persistently infected cattle. *Pathogens.* 9;8(3):143

Alpizar CL, Medina HE. (1999). Fisiopatología de la fiebre. *Rev Cubana Med Milit,* 28(1), 49-54.

Bautista GCR, Castañeda AR, Álvarez MJ, Rojas RC, Figueroa MJV, Rodríguez LA. (2012) La vacunación simultanea de bovinos con *Lactibacillus casei* y la vacuna bivalente contra babesiosis bovina genera una mejor protección contra *B. bovis* y *B. bigemina* transmitidas por garrapatas en condiciones extremas de campo. *Vet Méx.* 43(3),189-200.

Bautista GCR. (2016) Respuesta inmunitaria de los bovinos y su papel en la babesiosis. Libro Científico No. 3. INIFAP. Ciudad de México, México. 101p.

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

Bradley GK. (2014). Cunningham Fisiología Veterinaria. (5° ed.). Elsevier, España.

- Brown WC, Norimine J, Knowles DP, Goff WL. (2006). Immune control of *Babesia bovis* infection. *Vet Parasitol.* 138, 75–87. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.041
- Brown WC, Palmer GH. (1999). Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Tick-borne Dis.* 5(7),275-81
- Bock RE, Jackson L, de Vos AJ, Jorgensen W. (2004) Babesiosis of cattle. *Parasitology.* 129, 247-269.
- Cantó GJ, Figueroa JV, Álvarez JA, Vega CA. (1996). Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de cultivo *in vitro*. *Tec Pecu Mex.* 34,127-135.
- 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.
- Cantó AGJ, Rojas EE, Álvarez JA, Ramos JA, Mosqueda JJ, Vega CA, Figueroa JV. (2003). Protección contra babesiosis con una vacuna mixta de *B. bovis* y *B. bigemina* derivada de cultivo *in vitro* en una confrontación de campo. II Inmunización en un área endémica. *Téc. Pecu Méx.* 4(3),307-315.
- Cipolini MF, Jacobo RA, Draghi B, Resoagli JP, Storani C A, Dansey B, Martinez D, Infulesky R. (2003). Resultados preliminares del seguimiento serológico del complejo Tristeza bovina, como medida de prevención de brotes. Universidad Nacional del nordeste de Columbia. comunicaciones científicas y tecnológicas. 5(9), 1-3.
- Cordero del Campillo, M. (1999). Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill, S.A.U. Barcelona, España, 283-293.
- CFSPH. (2008). *Rhipicephalus Boophilus microplus*. The Center for Food Security & Public Health. 1-3.

Davey, R., George, J., y Snyder, D. (2001). Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosod, against *Boophilus microplus* (Acarie: Ixodidae) on cattle. *Vet.Parasitol.* 99, 41-52.

De la Fuente J, Almazán C, Canales M, Pérez de la Lastra JM, Kocan KM, Willadsen P. (2007). A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews.* 8, 23-28.

De la Sota MD. (2005). Manual de procedimientos anaplasmosis y babesiosis. SENASA. Recuperado de http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales_de_procedimiento/29%20Anaplasmosis.pdf

Dalrymple, B.P., R.E. Casu, J.M. Peters, C.M. Dimmock, K.R. Gale, R. Bose, and I.G. Wright. (1993). Characterization of a family of multi-copy genes encoding rhostry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57:35-40.

Fernández RM, Cantó AGJ, Aboytes TR. (1995) Prevalencia de anticuerpos séricos en contra de *Babesia* spp. y *Anaplasma marginale* en el municipio de Santiago Escuintla, Nayarit. *Vet. Méx.* 26(4), 407-409.

Figuroa JV, Cantó AG, Juárez FJ y Ruiz LF, (1984). *Babesia bovis*: Establecimiento y condiciones óptimas de multiplicación. *Téc. Pec. Méx.* 46, 46.

Figuroa JV., Buening GM., Kinden DA., Green TJ., (1990). Identification of common surface antigens among *B. bigemina* isolate by using monoclonal antibodies. *Parasitol.* 100, 161-165.

Figuroa JV, Chieves LP, Jhonson GS, Buening GM. (1993). Multiplex polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasitol.* 50,69-81.

Figuroa JV, Buening GM. (1995). Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 75, 75-92.

Figuroa JV, Cantó GJ, Álvarez JA, Rocio LG, Ramos JA, Vega CA. (1998). Capacidad Protectora en bovinos de una cepa de *Babesia bigemina* derivada del cultivo *in vitro*. *Tec. Pec. Méx.* 36(2), 95-100.

Figuroa J., y Álvarez J. (2003). Investigaciones sobre aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la *Babesiosis bovina*. *Ciencia Veterinaria.* 9-2003-4.

Florin-Christensen M, Suarez CE, Rodriguez AE, Flores DA, Schnittger L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and posible roads ahead. *Parásitol Today.* 28; 1-30. 1563-1592.doi:10.1017/S0031182014000961

Gallego LGM, Cooke BM, Suarez CE. (2019). Interplay between attenuation- and virulence-factors of *Babesia bovis* and their contribution to the establishment of persistent infections in cattle. *Pathogens.* 97(8), 1-13.

García GJC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, Rodríguez M, Joglar M, Machado H, González IL, Valdés M, Méndez L, de la Fuente J. (2000). Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine.* 18, 2275-2287.

García TD, Álvarez MJA, Figuroa MJV, Vega y MCA. (2003). Babesiosis bovina: características relevantes de la respuesta inmune. *Ciencia veterinaria.* 9(4), 15-122.

Goff WL, Wagner GG, Craig TM, Long RF. (1982). The bovine immune response to tick-derived *Babesia bovis* infection: serological studies of isolated immunoglobulins. *Vet Parasitol;*(11): 109-120.

Goff WL., Jhonson WC., Tuo W., Valdez RA., Parsih SM., B.G. and D.W., (2008). Age-related innate immune response in calves to *Babesia bovis* involves IL-12 induction and IL-10 modulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969, 164–168.

Guerrero F, Miller R, Pérez de León A. (2012). Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge. *Int J Parasitol.* 42, 421-427.

Guimarães AM, Oliveira CAH, Oliveira DD, Barcellos MCM, Hirsch C. (2010). Soroprevalência e fatores de risco para *Babesia bovis* em rebanhos leiteiros na região sul de minas gerais. *Ciênc. agrotec, Lavras.* 35(4),826-832.

Hernández RY. (2016). Control integrated of ticks (*Rhipicephalus microplus*) in a small bovine Flock. *Red. Vet.* 17(9), 1-10.

Homer IA, Aguilar DI, Telford SR, Krause PJ, Persing DH. (2000). Babesiosis. *Clin. Microbiol.* 13(3):451-469.

IICA (2021) Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. La ganadería en México tiene amplio potencial para contribuir a la mitigación y la adaptación al cambio climático. Consultado el 2 de junio de 2022, de: <https://www.iica.int/es/prensa/noticias/la-ganaderia-en-mexico-tiene-amplio-potencial-para-contribuir-la-mitigacion-y-la>

International Organization for Biological Control (IOBC). (2018). Consultada el 3 de agosto del 2021, de <http://www.iobc-global.org/index.html>.

Jarmey JM, Riding GA, Pearson RD, Mckena RV, Willadsen P (1995) Carboxydipeptidase from *Boophilus microplus*: a "Concealed" antigen whit similarity to angiotensin-converting enzyme. *Insect Biochem Mol Biol.* 25, 969-974.

Jenkins MC. (2001). Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Vet. Parasitol.*101 (3- 4), 291-310.

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. *Vet. Parasitol.* 137, 1-10.

Kleppe KE, Ohtsuka R, Kleppe I, Molineux HG. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic ADN's as catalyzed by ADN polymerases. *J Mol Biol.* 56, 341–361.

Lagunes QRE, Bautista GCR. (2019). El control inmunológico: Una alternativa contra garrapatas del ganado bovino. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 7(1). <https://doi.org/10.19136/era.a7n1.2263>.

León CMA, Hernández RCE. (2012). Descripción de la proteína bm86, su polimorfismo y su papel como inmunógeno en el ganado bovino infestado por garrapatas. ISSN: 1794-2470 ed: Imprenta Nacional de Colombia 10(17), 113-115.

Levine ND. (1980). Taxonomy of the Piroplasm. *Trans. Amer. Micros. Soco.* 90(1), 2-33.

Lira AJJ, Martínez GG, Santamaria ERM, Castañeda ARO, Ojeda CJJ, Ávila RG, Figueroa MJV. (2021). Comparative study of indirect fluorescent antibody, ELISA, and immunochromatography tests for serological diagnosis of *bovine babesiosis* caused by *Babesia bovis*. *Animals*.11(12):3358.

Marcelino I, Martinho AA, Ventosa M, Pruneau L, Meyer D F, Martinez D, Lefrançois T, Vachiéry N, Varela A. (2012). Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccines. *J of Proteomics.* 74(14), 4232-4250.

Martínez-García G, Santamaria-Espinosa RM, Lira-Amaya JJ, Figueroa-Millán JV. (2021). Challenges in Tick-Borne Pathogen Detection: The case for *Babesia* spp. Identification .in the tick vector. *Pathogens.* 20; 10(2),92. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020092>.

Mas E., Poza J., Ciriza J., Zaragoza P., Osta R y Rodellar C. (2001). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *AquaTic*, 15, 35.

Mishra, V.Z., E.B. Stephens, J.B. Dame, L.E. Perryman, T.C. McGuiire, and T.F.

McElwain. (1991). Immunogenicity and sequence analysis of recombinant p58: a neutralization-sensitive, antigenically conserved *Babesia bigemina* merozoite surface protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47:207-212.

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

Mosqueda J, Falcón A, Ramos J, Cantó G, Camacho NM. (2012a). Estrategias genómicas y moleculares para el control de la babesiosis bovina *Rev Méx Cienc Pecu:* 3 (Supl1):51-59. recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242012000500007.

Mosqueda J, Olvera A, Aguilar G, Cantó G. (2012b). Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Curr med chem*, 19, 1504- 1518. DOI: 10.2174 / 092986712799828355.

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.

Mwangi EN, Hassan SM, Kaaya G, Essuman S. (1997). The impact of *Ixodiphagus hookeri*, a tick parasitoid, on *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in a field trial in Kenya. *Exp Applied Acarol.* 21, 177-126.

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.

Ojeda JJ, Orozco L, Flores R, Rojas C, Figueroa JV, Álvarez JA. (2010). Validation of an attenuated live vaccine against babesiosis in native cattle in an endemic area. *Transb and emer dis.* 57(1-2),84-86.

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

Quesada ME, Álvarez SC. (2008). Hongos Entomopatógenos. En J. A. Jacas y A. Urbaneja, Control Biológico de Plagas Agrícolas (pp. 98-120). S.L. MV PHYTOMA-ESPAÑA, Valencia.

Quijada T, Contreras J, Foriano M. (1998). Seropositividad a *Babesia bigemina* en bovinos mestizos de las Yaguas, Carora, Estado Lara, Venezuela. *Vet. Tropical.* 23(1), 13-24.

Quiroz RH, Figueroa JA, Ibarra CF, López ME. (2011). Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. 1ª ed. 477-495.

Ramírez CGT., Domínguez AJL., 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 RR, González BA, Nevaréz GAM, Rodríguez TLE. (2011). Informe de tres casos de rabia paralítica y babesiosis bovina en el municipio de Aldama, Tamaulipas. *Vet. Méx.* 42(4), 331- 338.

Regassa GA. (2001). Antibody response to *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by vaccinated and unvaccinated cattle in an endemic area of South Africa. [tesis maestría]. Africa. University of Pretoria, Faculty of Veterinary Science.

Ribera CH, María CA, Barba CG, Carrique MJJ, Walker A. (2000). Estudio sobre babesiosis y anaplasmosis en relación con la carga de garrapatas en terneros lecheros del oriente Bolivia. *Vet. Méx.* 31(1), 39-46.

Ríos OLA, Zapata SL, Reyes J, Mejía J, Baena A. (2010). Estabilidad enzoótica de babesiosis bovina en la región de puerto Berrío, Colombia. *Rev. Cient.* 20(5), 485-492.

Rodríguez-Vivas, Cob GL. (2005). Técnicas diagnósticas en parasitología veterinaria. Segunda ed. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.

Rodríguez-Vivas RI, Hodgkinson J. E., Trees A J. (2012). Acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Current status and mechanisms of resistance. *Rev. Mex. Cien. Pecu.* 3, 9-24

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 Mex Cienc Pecu*, 8(1), 61-74.

Rojas E, Domínguez P, García M, Cruz VC, Figueroa J, Ramos J. (2004). Prevalencia e incidencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en un hato bovino en Axochiapan, Morelos. *Avances Invest Agropec.* 8 (2), 1-8. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83780207>

Rojas EE, Mosqueda JJ, Álvarez JA, Hernández R, Ramos JA, Rojas C, Cantó GJ, Vega CA, Figueroa JV. (2017). Putrescine: Essential factor for *in vitro* proliferation of *Babesia bovis*. *Exp. Parasitol.* 175:79-84.

Rojas MC, Figueroa MJV, Álvarez MJA. (2009). Cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. Folleto técnico No 5.

Rojas MC, Rodríguez RIV, Figueroa JVM, Acosta KYV, Gutiérrez EJR, Álvarez JAM. (2016). *In vitro* culture of *Babesia bovis* in a bovine serum-free culture medium supplemented with insulin, transferrin, and selenite. *Exp Parasitol.* 170:214-219.

Rosario CGM, Rodríguez VJE, (2005). Roles played by esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in populations of *Boophilus microplus* (acari: ixodidae) collected from Yucatan. *J Med Entomol.* 42(6), 1020-1025.

Sánchez MB, Flores VS, Rodríguez HE, Anaya EAM, Contreras CEA. (2020). Causas y consecuencias del cambio climático en la producción pecuaria y salud

animal. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu*, 11(Supl. 2), 126-145. Epub 30 de junio de 2020.<https://doi.org/10.22319/rmcp.v11s2.4742>.

Santamaria ERM. (2015). Estimación de la prevalencia e incidencia de babesiosis en el hato bovino del sitio experimental “La Posta”, Paso del Toro, Ver. Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario Amecameca. Tesis de licenciatura.

Santamaria ERM, Lira AJJ, Vargas UP, Álvarez MJA, Rojas MC, Figueroa MV. (2020). Validation of an indirect ELISA using recombinant proteins as antigen to identify animals exposed to *Babesia bigemina*. *Transb Emer Dis*. 67(2), 201-207.

SENASICA-SADER. (2021). 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>

SIAP (2020). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Inventario Bovino para carne y leche. Disponible en:
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/655392/Inventario_2020_bovinos_carne_y_leche.pdf

Smith RD. (1978). Ciclo biológico de *Babesia* en la garrapata. INIP. SARH; 2: 234-264.

Simoës D, Chirinos A, Martínez N, Castejón O, Ávila S. (1995). Prevalence of bovine babesiosis in Sector Cuatro (Playa Bonita), Mara County. *FCV-LUZ*. 5(1), 5-10.

Shkap V, de Vos AJ, Zweygarth E, Jongejan F. (2007). Attenuated vaccines for tropical theileriosis, babesiosis and heartwater: the continuing necessity. *Trends Parasitol*. 23(9),420-426.

Solorio RJL, Rodríguez VRI. (1997a). Epidemiología de la babesiosis bovina. I. Componentes Epidemiológicos. *Rev Biomed*; 8(1), 37- 47.

Solorio RJL, Rodríguez VRI. (1997b). Epidemiología de la babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. *Rev Biomed*; 8(2), 95-105.

Soulsby LE J, 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7a edición, Interamericana, México D. F. pp.729-724.90.

Sparagano OAE, Allsopp MTEP, Mank RA, Rijpkema SGT, Figueroa JV, Jongejan F. (1999). Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): A review. *Exp Applied Acarol*. 23(12), 929-960.

Suarez, C.E., T.F. McElwain, E.B. Stephens, V.Z. Mishra, and G.H. Palmer. (1991). Sequence conservation among merozoite apical complex proteins of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and other Apicomplexa. *Mol Biochem Parasitol*. 49:329-332.

Trigo TFJ., Valero EG. (2004). Patología General Veterinaria. (4ª ed.). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia, México.

Tizard I. (2013). Veterinary Immunology. Immunodiagnostic Techniques. Cap. 41. pp.447-499.

Vaca CA. (2010). Evaluación de la vacuna Combavac contra babesiosis y anaplasmosis en cuatro razas de bovinos mestizos de carne [tesis licenciatura] Santa cruz, Bolivia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.A.G.R.M.

Vega CA, Buening GM, Green TJ, Carson CA. (1985). *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am J Vet Res*. 46, 416-420.

Vega CA, Buening GM, Rodríguez SD, Carson CA. (1986). Cloning of *in vitro* propagated *Babesia bigemina*. *Vet Parasitol*. 22(3-4), 223-233.

Vial H, Gorenflot A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Vet Parasitol*. 138, (1-2), 147-160. Wharton R, Utech K, Turner H. (1970). Resistance to the cattle tick,

Boophilus microplus in a herd of Australian Illawarra Shorthorn cattle: its assessment and heritability. *Austr J Agric Res.* 21,163-181.

Wharton RH (1974). Control of Arthropods of Medical and Veterinary Importance. R. Pal *et al.* (eds.) Plenum Press, New York 1974.

Willadsen P. (2006). Tick Control: Thoughts on a research agenda. *Vet Parasitol.*138, 161-168.

Zapata SR, Lara RM, Baena ZA, Reyes VJ, Ríos OLA. (2008). Seroprevalencia de babesiosis bovina en la hacienda Vegas de la Clara, Gómez Plata (Antioquia). *Rev Med Vet.* 21(1), 63- 71

Zhang GJ, Guo, XW. (2009). Immunochromatographic lateral flow strip tests. En: A. Rasooly, K.E. Herold (eds). *Methods in molecular biology: Biosensors and biodetection*, Vol.504, Electrochemical and mechanical detectors, Lateral flow and ligands for biosensors. Humana Press, New York, N.Y. 169-183.

XII. Anexos

12.1 Técnica quirúrgica (Esplenectomía)

Se deberá dejar al bovino en un ayuno de sólidos y líquidos de un tiempo no menor a 12 horas, para comenzar con el procedimiento se deberá realizar una tricotomía en el flanco izquierdo, en cuanto a la tranquilización se lleva a cabo con la administración de xilacina al 2% a una dosis de 0.1 mg/kg de peso vivo, por vía I.M., mientras que la anestesia se aplica localmente infiltrando debajo de la piel utilizando lidocaína al 2% con epinefrina dibujando una línea y dejando 1 cm de espacio entre cada aplicación.

Se inicia colocando al bovino en posición de decúbito lateral derecho, con sujeción en miembros anteriores y posteriores, importante colocar la cabeza a lo alto, con ayuda de una almohada; posteriormente, se realiza la asepsia con ayuda de clorhexidina en la región de las últimas cinco vértebras lumbares y región lateral a la altura de la fosa paralumbar.

Primer tiempo:

Se administra anestesia local con ayuda de lidocaína al 2% por infiltración en la línea de incisión, a continuación, se realiza una incisión de aproximadamente 15 cm. paralela al borde posterior de la última costilla y a 3 cm de la misma; se inicia a 10 cm por debajo de la apófisis transversa de las vértebras lumbares, abarcando la dermis y tejido subcutáneo, después se hace una debridación hasta observar los músculos (Figura 24).

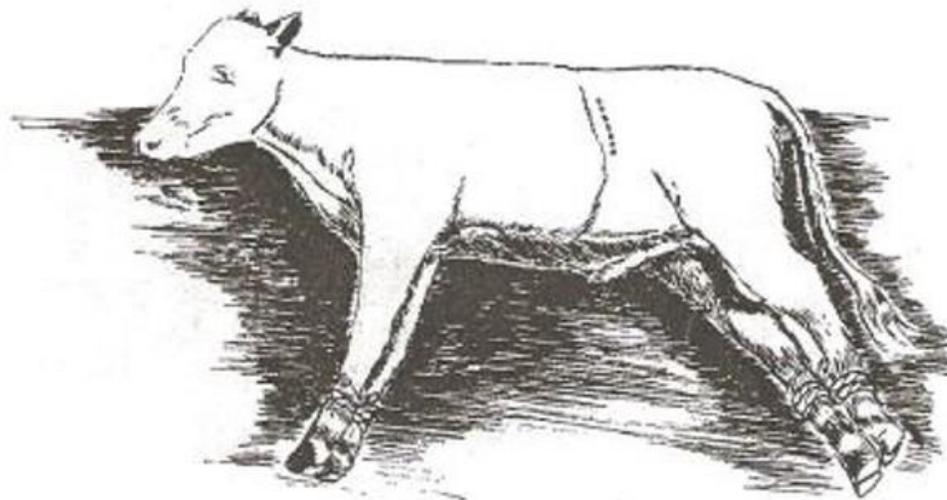


Figura 24. Posición del bovino en decúbito lateral derecho para abordaje quirúrgico y realización de esplenectomía.

Segundo tiempo:

Una vez visualizado el músculo oblicuo abdominal externo, seguido del músculo oblicuo abdominal interno y finalmente el musculo transverso abdominal, cuya cara interna está en contacto directo con el peritoneo (Figura 25).

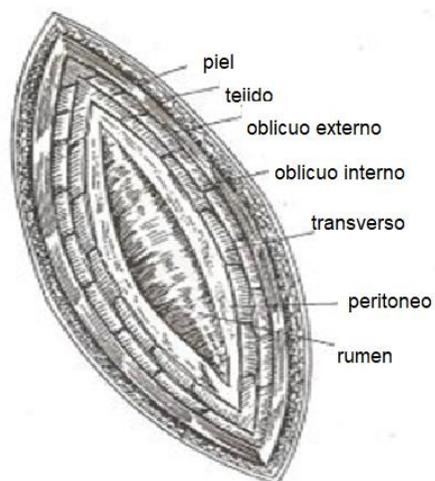


Figura 25. Representación esquemática de los planos anatómicos que se podrán observar.

Tercer tiempo:

Una vez incididos los tres músculos; se realiza hemostasia de las venas y arterias intercostales, así como la rama de la arteria circunfleja, iliaca profunda y vena iliaca.

Cuarto tiempo:

Se incide el peritoneo en la misma longitud a los músculos, se podrá observar parte del rumen, el epiplón y parte de los intestinos, para poder localizar el bazo, es importante introducir la mano hacia adelante y ligeramente hacia arriba.

Quinto tiempo:

El bazo se encuentra ubicado anatómicamente en la pared lateral izquierda y superior al rumen, en el saco dorsal del mismo, con una forma elíptica alargada, con extremos redondos y delgados.

Para exponer el órgano es importante tomar una compresa y sujetar la pared lateral del rumen, haciendo una ligera tracción hacia atrás, hasta lograr observar el hilio. La cara parietal es convexa y se relaciona con el diafragma; la cara visceral es cóncava y está en contacto con el saco dorsal del rumen. La porción anterodorsal esta fija al rumen por medio de un pliegue peritoneal y tejido conectivo; como la porción ventral y posterior es libre, no está rodeada por peritoneo, el hilio está situado en el borde dorsal de la cara visceral, cerca del extremo anterior.

Sexto tiempo:

Se inicia con la separación del pliegue peritoneal, hasta llegar al hilio; teniendo cuidado para no romper la vena y arteria esplénicas, ramas de la celiaca.

Séptimo tiempo:

Una vez que el bazo queda separado del peritoneo, se debe ligar la arteria y vena esplénica, con catgut crómico del No. 1, para evitar hemorragia.

Octavo tiempo:

Se corrobora que no haya hemorragia y se procede a suturar el peritoneo, con

sutura de ácido poliglicólico del No. 1, realizando puntos en “X”. Posteriormente, se sutura el siguiente plano que corresponde a los músculos oblicuos interno y externo con puntos en “X”. Finalmente, se realiza la sutura en piel con puntos separados en “U” con sutura de nylon del no. 1.

Noveno tiempo.

Se realiza limpieza de la herida con ayuda de clorhexidina y se aplica aluminio micronizado como promotor de la cicatrización.

Es importante mantener el monitoreo de las constantes fisiológicas a lo largo de la cirugía.

Posterior a la cirugía se debe mantener una terapia de antibiótico y analgésico, así como la higiene de la herida.

12.2 Preparación de soluciones

PBS 10X Stock

Disolver en 200 mL de agua destilada.

Reactivo	Cantidad (gr.)
Fosfato de sodio monobásico monohidratado (NaH ₂ HPO ₄ · H ₂ O)	2.62
Fosfato de sodio difásico anhidro (Na ₂ HPO ₄)	11.5

Aforar a 1000 mL con agua destilada.

Mantener a 4°C.

Solución TAE 50X Stock

Disolver en 800 ml de agua destilada.

Reactivo	Cantidad
Trizma Base (SIGMA)	242 gr.
EDTA 0.5M (pH8.0)	100 mL.
Ácido acético glacial	57.1 mL.

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

Mantener a 4°C.

12.3 Extracción de ADN (Kit MOBIO)

1. Seleccionar la muestra de eritrocitos.
2. Preparar la proteinasa K.
3. Agregar 500 µl de eritrocitos a 20 µl de proteinasa K en un tubo de 1.5 ML
4. Agregar 200 µl de Solución B1.
5. Agitar en vórtex durante 15 segundos.
6. Incubar a 65 ° C durante 10 min.
7. Centrifugar brevemente para eliminar las gotas de la parte superior de la tapa.
8. Agregar 200 µl de Solución B2 y agite en el vórtex durante 15 segundos.
9. Centrifugar brevemente para eliminar las gotas de la parte superior de la tapa.
10. Transferir toda la mezcla al tubo con filtro de 1.5 mL.
11. Centrifugar 1 min a 13 000 rpm.
12. Transferir el tubo con filtro a un tubo nuevo.
13. Agregar 500 µl de Solución B3 para centrifugar el filtro.
14. Centrifugar 30 segundos a 13 000 rpm.
15. Retirar el filtro de centrifugado, descargue el flujo y reemplace el filtro de centrifugado.
16. Agregar 500 µl de Solución B4 para centrifugar el filtro.
17. Centrifugar 30 segundos a 13 000 rpm.
18. Retirar el filtro de centrifugado, descargue el flujo y reemplace el filtro de centrifugado.
19. Centrifugar nuevamente durante 30 segundos a 13 000 rpm.

20. Retirar con cuidado el filtro y transferir a un tubo nuevo sin que entre en contacto con el sobrenadante.
21. Agregar 50 μ L de Solución B5.
22. Centrifugar durante 1 min. a 13 000 rpm.
23. Retirar el filtro y cerrar la tapa del tubo. El ADN genómico en el tubo ahora está listo para usar en cualquier aplicación.