

Evaluación de la inocuidad y protección de un inmunógeno derivado de cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* multiplicado en bovinos

Evaluation of the inocuity and protection of an attenuated *in vitro* derived *B. bovis* and *B. bigemina* immunogen propagated in bovines

Germinal Jorge Cantó Alarcón^{a,c}, Juan Alberto Ramos Aragón^b, Edmundo Enrique Rojas Ramírez^b, Carlos Agustín Vega y Murguía^b, Valeria Oviedo García^a, Julio Vicente Figueroa Millán^b, Jesús Antonio Alvarez Martínez^b

RESUMEN

A partir de poblaciones atenuadas *in vitro* de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* y con el objeto de reducir lo laborioso y costoso de su propagación para poder usarse como inmunógenos, se utilizaron becerros esplenectomizados e inmunodeprimidos como animales multiplicadores de las poblaciones atenuadas. Los bovinos fueron inoculados con una dosis de 1×10^9 eritrocitos infectados de cada especie del parásito atenuado, obteniéndose un número elevado de dosis de inmunógeno proveniente de estos animales multiplicadores. Asimismo, se comprobó que la multiplicación de *Babesia* spp. en los animales esplenectomizados no produjo cambios en la inocuidad del agente inmunizante, pero mantuvo la capacidad de inducir protección a los animales vacunados en contra de la confrontación con aislados virulentos de campo. Al desafío, los animales inmunizados con eritrocitos infectados con *Babesia* spp. provenientes de becerros esplenectomizados o con parásitos de cultivo, mostraron valores similares en cuanto al promedio máximo de disminución del volumen celular aglomerado, de 15.6 y 22.8 % respectivamente, mientras que en el grupo testigo se observó una disminución del 40.6 % y la muerte de un animal por babesiosis. Los resultados obtenidos en el presente estudio indican la factibilidad de utilizar sangre proveniente de animales esplenectomizados e inmunodeprimidos, previamente inoculados con poblaciones de *Babesia* derivadas de cultivo *in vitro* como inmunógeno, si esto fuese necesario debido al elevado número de animales por inmunizar.

PALABRAS CLAVE: *Babesia*, Bovinos, Cultivo *in vitro*, Inmunización.

ABSTRACT

A study was carried out in order to reduce laboratory production time and costs of an attenuated *B. bovis* and *B. bigemina* immunogen. Splenectomized and immunodepressed young bulls were used as multipliers and a large number of immunizing doses were obtained from these animals after inoculation with the original strains, obtained *in vitro*, at doses of 1×10^9 infected erythrocytes for each species of *Babesia*. After immunization of cattle with these parasite populations propagated in animals, it was seen that multiplication of *Babesia* spp in splenectomized and immunodepressed cattle did not affect the strains' inocuity but was able also to induce protection against challenges of previously evaluated virulent *B. bovis* and *B. bigemina* field isolates. Regardless of the immunization procedure, be it with parasites coming from *in vitro* culture or from parasites propagated in splenectomized cattle, all immunized animals were protected. Reduction in packed cell volume (PCV) was 22.8% and 15.6% respectively. In contrast, those animals belonging to the control group showed a 40.6% decrease in PCV and also, one animal of this group died of acute babesiosis. Thus, an attenuated *in vitro* culture derived immunogen, propagated in splenectomized and immunodepressed animals, could be used as an immunogen against babesiosis if it were necessary when a large number of animals were to be protected.

KEY WORDS: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *In vitro* culture, Immunization, Cattle protection.

Recibido el 4 de septiembre de 2001 y aceptado para su publicación el 23 de enero de 2002.

a Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.

b Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria. INIFAP.

c Centro Nacional de Investigaciones en Fisiología y Mejoramiento Animal. INIFAP. km 1 Carretera a Colón, Ajuchitlán, Querétaro, México. Correspondencia y solicitud de separatas.

Proyecto parcialmente financiado por el CONACyT, 820003-K0005B

INTRODUCCIÓN

La inmunización es considerada como el procedimiento que ofrece las mejores perspectivas en el control de la babesiosis bovina. Las vacunas disponibles en la actualidad en algunos países son elaboradas con organismos vivos de reducida virulencia o patogenicidad y con una efectividad aceptable^(1,2,3,4).

Entre los métodos profilácticos desarrollados y utilizados en Australia por muchos años, se encuentra el uso de organismos vivos de reducida virulencia obtenidos a través de pases seriados de los hemoparásitos en becerros intactos o esplenectomizados^(5,6). Mediante este método es posible obtener grandes volúmenes de dosis de vacunación a bajo costo; sin embargo, se ha demostrado el riesgo de contaminación con otros agentes patógenos debido a los continuos pases que se realizan en bovinos⁽⁷⁾. Esta tecnología ha sido adoptada en Sudáfrica, Argentina, Uruguay y Cuba^(8,9,10,11). En México a partir de eritrocitos infectados con el protozooario provenientes de cultivo *in vitro*^(12,13), se han realizado estudios de vacunación que demuestran que se cuenta con una población de parásitos clonados e irradiados de *B. bovis* y una cepa atenuada de *B. bigemina*, que son capaces de inducir una respuesta inmune capaz de controlar la confrontación de poblaciones patógenas del hemoparásito en condiciones controladas^(2,3,4), eliminando con esto los riesgos de contaminación. Sin embargo, la tecnología para la producción del inmunógeno en condiciones *in vitro* es limitada, laboriosa y costosa debido a la importación de la mayoría de los insumos.

El presente estudio tuvo como objetivo mantener las ventajas de inocuidad y protección de los agentes inmunizantes producidos *in vitro*, buscando incrementar en forma notoria el número de dosis producidas mediante el uso de animales esplenectomizados e inmunodeprimidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del rancho "GB", localizado en el municipio de El Marqués, en Querétaro. Se utilizaron 33 toretes *Bos*

INTRODUCTION

Immunization is considered as the procedure that offers the best perspectives in the control of bovine babesiosis. Currently, vaccines available in some countries are produced with live organisms showing reduced virulence or pathogenicity and showing an acceptable effectiveness^(1,2,3,4).

One of the prophylactic methods developed and used in Australia for many years is the use of live organisms possessing reduced virulence, obtained through several passes of the haemoparasites carried out in intact or splenectomised calves^(5,6). This method allows to obtain high volumes of vaccine doses at low cost. However, a risk of contamination has been demonstrated with other pathogen agents due to continuous passes carried out in bovines⁽⁷⁾. This technology has been adopted in South Africa, Argentina, Uruguay and Cuba^(8,9,10,11). In Mexico, vaccination studies on erythrocytes infected with a protozoan coming from *in vitro* culture^(12,13) have been carried out, showing that a population of cloned parasites and irradiated *B. bovis* and an attenuated strain of *B. bigemina* are able to induce an immune response, and also able to control the confrontation of pathogen populations of the hemoparasite under controlled conditions^(2,3,4), thus eliminating contamination risks. However, the technology for production of the immunogen under *in vitro* conditions is limited, arduous and expensive, owing to the cost of most of the imported inputs.

This study had the objective to maintain the advantages of innocuousness and immunizing protection obtained through *in vitro* culture, in order to increase the amount of doses through use of splenectomised and immunodepressed animals.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out at the «GB» ranch, located in El Marqués, Queretaro, Mexico. Thirty three *Bos taurus* young calves, more than 15 months old, which came from a Boophilus tick free area (Cuatro Ciénegas, Coahuila) were used. The animals were brucellosis and tuberculosis free and also tested for *Anaplasma marginale* by means of ELISA⁽¹⁴⁾, and for *Babesia* spp. by means of the indirect immunofluorescence technique (IFAT)⁽¹⁵⁾.

taurus, mayores de 15 meses de edad, provenientes de una zona libre de garrapatas *Boophilus* (Cuatro Ciénegas, Coahuila). Se comprobó que los animales se encontraban libres de brucelosis y tuberculosis. Asimismo, se verificó su negatividad a *Anaplasma marginale* mediante la técnica de Ensayo inmunoenzimático (ELISA)⁽¹⁴⁾, y *Babesia* spp. mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI)⁽¹⁵⁾.

Los aislados virulentos se obtuvieron de aislados previos de casos clínicos de babesiosis, y que fueron mantenidos en congelación y a través de pases en animales susceptibles^(16,17). Se utilizó la clona BOR, derivada de la cepa KBb por dilución crítica⁽¹⁸⁾ e irradiada en una fuente de ⁶⁰Co a 187 Grays (Gy)⁽¹⁹⁾, la cual se mantiene en forma alterna en cultivo *in vitro* y en congelación. La cepa inmunizante de *Babesia bigemina* se obtuvo originalmente de un caso clínico en México, la que se mantiene alternadamente en congelación y propagada continuamente en cultivo *in vitro*⁽¹³⁾.

El estudio se dividió en dos fases. En la primera y con objeto de multiplicar las cepas vacunales, tres de los bovinos fueron esplenectomizados e inmunodeprimidos con dexametasona durante cinco días consecutivos a una dosis de 6 mg/animal/día. El día de la cirugía dos de los animales fueron inoculados, uno con una dosis de 1×10^9 eritrocitos infectados (Ei) con *B. bovis* procedentes de cultivo *in vitro* y el otro con la misma dosis y origen pero con Ei infectados con *B. bigemina*.

La fase dos del estudio comprendió 30 becerros y en ella se determinó la inocuidad del inmunógeno mixto proveniente de los bovinos multiplicadores del parásito y la protección que éste confirió contra la confrontación de cepas virulentas. El momento de obtención de la sangre de los animales multiplicadores fue cuando el porcentaje de eritrocitos parasitados alcanzó un mínimo del 0.5 % y comenzó un descenso claro en el volumen celular aglomerado (VCA). En todos los casos, con excepción de los grupos testigo de vacunación y confrontación, los animales recibieron eritrocitos infectados provenientes de los animales multiplicadores.

Los 30 animales se dividieron al azar en cinco grupos. El grupo 1 consistió de 10 bovinos que

The virulent isolates were obtained from previous isolations made in clinic cases of babesiosis, which were kept alive through freezing and passes in susceptible animals^(16,17). BOR clone, derived from the strain KBb by critical dilution⁽¹⁸⁾ and irradiated with a ⁶⁰Co source to 187 Grays (Gy) was used⁽¹⁹⁾, and maintained by alternative *in vitro* culture and freezing. The immunizant strain of *B. bigemina* was obtained originally from a clinical case in Mexico, and kept by alternate freezing, and continually propagated by *in vitro* culture⁽¹³⁾.

This study was divided in two phases. In the first one and with the objective of multiplying vaccine strains, three of the bovines were splenectomised and immunodepressed with dexametasona for five serial days with 6 mg/animal/day dose. On the day of the surgery two animals were inoculated, one with a dose of 1×10^9 infected erythrocyte (Ie) with *B. bovis* coming from *in vitro* culture and the other one with the same dose and origin but with Ie infected with *B. bigemina*. In phase two (30 calves), the innocuousness of the mixed immunogen coming from the bovine multipliers of the parasite and the protection which conferred against the confrontation of virulent strains, was determined. The blood of the multiplier animals was obtained after the percentage of parasited erythrocytes reached a minimum of 0.5 % and a clear decrease in the packed cell volume (PCV) began. In all cases, except for the vaccination and confrontation control groups, animals received infected erythrocytes originated in the multiplier animals.

The animals were divided at random in five groups. Group 1 consisted of 10 bovines that received a dose of 1×10^7 infected erythrocytes of each specie of *Babesia*; Group 2 (n= 5) was inoculated with the same dose but using only the specie *B. bigemina*; Group 3 (n= 5) received the same dose but of the specie *B. bovis*. Group 4, vaccination control (n= 5) was immunized with the same doses with mixed inoculums of derived attenuated fresh parasites of the *in vitro* culture. Group 5 (n= 5) remained as confrontation control without any treatment.

Fifty four days after immunization, all the animals were confronted with a dose of 1×10^8 Ie isolated field virulent. Groups 1, 4, and 5, received both

recibieron una dosis de 1×10^7 eritrocitos infectados de cada especie de *Babesia*, el grupo 2 (n= 5) fue inoculado a la misma dosis utilizando únicamente la especie *bigemina*, el grupo 3 (n= 5) recibió la misma dosis pero de la especie *bovis*. El grupo 4, testigo de vacunación (n= 5) fue inmunizado a las mismas dosis con un inóculo mixto de parásitos frescos atenuados derivados del cultivo *in vitro*. El grupo 5 (n= 5) permaneció como testigo de confrontación y no recibió ningún tratamiento.

Cincuenta y cuatro días posteriores a la inmunización, todos los animales fueron confrontados con aislados virulentos de campo a una dosis de 1×10^8 Ei. Los grupos 1, 4 y 5, recibieron ambas especies del parásito, el grupo 2, sólo *B. bovis* y el grupo 3, solamente *B. bigemina*.

A partir del día cuatro posinoculación (PI), los animales se observaron diariamente durante seis días, y semanalmente hasta la confrontación para determinar reacciones clínicas. Para la identificación directa del parásito y el cálculo del porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP), se obtuvo sangre de la vena caudal mediante tubos al vacío, y se prepararon frotis delgados que se tiñeron con colorante de Giemsa para poder observar al protozoario por microscopía óptica; además, con las muestras de sangre se determinó el VCA por el método de microhematocrito. Asimismo, se registró la temperatura rectal (TR). Durante la confrontación, se determinaron las mismas variables a partir del día cuatro posterior a la confrontación (PC) y hasta la finalización del estudio el día 72 PI. Una semana antes de la inmunización y hasta el día 72 PI, semanalmente se obtuvo plasma de todos los animales para la determinación de anticuerpos específicos contra el parásito, mediante la técnica de IFI⁽¹⁵⁾.

RESULTADOS

En la primera fase del estudio se observó que, en el caso de *B. bigemina*, el becerro inoculado con los parásitos atenuados provenientes del cultivo *in vitro*, presentó hacia el día seis PI una parasitemia de 1.14 % contando en ese momento con aproximadamente 5,040,000 eritrocitos por microlitro (Cuadro 1), lo que significaría un total de 5,740

species of the parasite, Group 2, only *B. bovis* and Group 3, only *B. bigemina*.

Starting from post-inoculation (PI) day 4, animals were observed daily for six days, and weekly until confrontation, to determine clinical reactions. For a direct identification of the parasite and to calculate the percentage of parasited erythrocytes (PEP), blood of the caudal vein was obtained by means of vacuum tubes and slides were prepared with Giemsa to observe the protozoan by microscopy; PCV was determined through the microhematocrit method, and rectal temperature (RT) was also registered. In the confrontation period, the same variables were determined starting from day 4 after confrontation (PC) till the end of the study (day 72 PI). One week before immunization and up to day 72 PI, plasma of all the animals was obtained weekly for determination of antibodies specific for the parasite⁽¹⁵⁾.

RESULTS

In the first phase of the study it was observed that, in the case of *B. bigemina*, the calf inoculated with the attenuated parasites coming from *in vitro* culture, presented towards day 6 PI a parasitemia of 1.14 %, with a count, at that moment, of approximately 5,040,000 erythrocytes per microliter (Table 1), approximately a total of 5,740 doses of the immunogen or 1×10^9 Ie per liter of blood. For *B. bovis*, two splenectomised and immunodepressed calves had to be used, since the inoculation of the first animal only produced a smaller parasitemia than 0.001%, insufficient for the production of high doses of the immunogen (Table 2), in this animal a rectal temperature of 41.5°C was observed and a decrease of 55 % in PCV, being necessary to carry out a pass of infected blood with a dose of 1×10^9 Ie. For day 5 PI, the second animal showed a 0.5 % parasitemia, and a count of 5,150,000 red cells for microliter of blood (Table 3), enough to obtain 2,575 doses of 1×10^9 Ie of immunogen per liter of blood.

Immediately after obtaining the parasitemia in the multipliers animals, Groups 1,2,3, and 4 were immunized with the immunogen coming from these animals (Groups 1,2, and 3) or from the *in vitro*

dosis de inmunógeno a razón de 1×10^7 Ei por litro de sangre. En el caso de *B. bovis*, se tuvieron que utilizar dos becerros esplenectomizados e inmunodeprimidos, ya que la inoculación del primer animal sólo produjo una parasitemia menor a 0.001 %, lo que sería insuficiente para la producción de un número elevado de dosis de inmunógeno (Cuadro 2). En este animal se observó un incremento de temperatura hasta los 41.5 °C y un descenso del 55 % del VCA, por lo que fue necesario realizar un pase de sangre infectada a una dosis de 1×10^9 Ei. Para el día cinco PI, el segundo animal presentó una parasitemia de 0.5 %, con un total de 5'150,000 células rojas por microlitro de sangre (Cuadro 3), lo que sería suficiente para obtener 2,575 dosis de 1×10^7 Ei de inmunógeno por litro de sangre.

Inmediatamente después de obtener las parasitemias deseadas en los animales multiplicadores, los grupos de animales 1,2,3 y 4, fueron inmunizados ya fuese con el inmunógeno procedente de los bovinos multiplicadores (grupos 1,2 y 3) o del cultivo *in vitro* (grupo 4), para su posterior confrontación con aislados patógenos. Los valores promedio de VCA y TR por grupo durante la vacunación y el desafío, se observan en las Figuras 1 y 2.

Cuadro 1. Seguimiento de un bovino multiplicador inoculado con 1×10^9 eritrocitos infectados con *B. bigemina* derivada de cultivo *in vitro*

Table 1. Monitoring of a multiplier bovine inoculated with 1×10^9 erythrocytes infected with *B. bigemina* from *in vitro* culture

Bovine 1	Packed cell volume	Rectal temperature (°C)	Parasitemia (%)
Days postinoculation			
1	30	38.5	—
2	30	38.8	—
3	27	38.9	—
4	26	38.8	+ peripheral blood
5	26	39.1	0.02
6	25	39.2	1.14*

*With a total of 5'040,000 erythrocytes/microliter of blood

culture (Group 4), for a later confrontation with isolated pathogens. Mean values for PCV and RT per group during vaccination and challenge, can be seen in Figures 1 and 2.

During the period of vaccination, all the immunized groups experienced alterations in PCV and RT. Groups 1 and 4, vaccinated with the mixed immunogen of bovine origin or *in vitro* culture respectively, showed a similar performance in relation to PCV (Figure 1). The highest decreases in value for PCV mean per group were 24.5 % for Group 1 and 25.9 % for Group 4, vs 14 % for the control group, taking place in the first two cases towards day 8 PI, and towards day 6 in the last one.

Relative to the confrontation, at day 54 PI, the PCV began to decrease at day 4 PC. Group 2 immunized and confronted only with *B. bigemina*, was the one with the smallest decrease (13 %), compared with a 40.4 % decrease observed in the control group. Groups 1 and 4, immunized and confronted with the two species, showed maximum decrements in PCV of 16.7 and 23.5 % respectively on days 10 and 8 PC (Figure 1). Three out of five of the bovines that made up the control group

Cuadro 2. Seguimiento del primer bovino multiplicador inoculado con 1×10^9 eritrocitos infestados de *B. bovis* derivada de cultivo *in vitro*

Table 2. Monitoring of the first multiplier bovine inoculated with 1×10^9 erythrocytes infected with *B. bovis* from *in vitro* culture

Bovine 1	Packed cell volume	Rectal temperature (°C)	Parasitemia (%)
Days postinoculation			
1	31	38.6	—
2	30	38.7	—
3	26	40.5	+ capillary blood
4	27	41.0	+ peripheral blood
5	23	41.0	<0.001
6	17	41.5	<0.001

Durante el periodo de vacunación, se observó que todos los grupos inmunizados sufrieron alteraciones en VCA y TR. Los grupos 1 y 4, vacunados con el inmunógeno mixto de origen bovino o cultivo *in vitro* respectivamente, mostraron un comportamiento similar en relación al VCA (Figura 1). Los descensos máximos en el VCA promedio por grupo fueron del 24.5 % para el grupo 1 y del 25.9 % para el grupo 4, contra sólo el 14 % del grupo testigo, ocurriendo los dos primeros hacia el día ocho PI, y hacia el día seis en el último.

A la confrontación, el día 54 PI, se observó que el VCA comenzó a descender a partir el día cuatro PC. El grupo 2, inmunizado y confrontado sólo con *B. bigemina*, fue en el que se observó el menor decremento, siendo del 13 %, comparado con 40.4 % de descenso observado en el grupo testigo. Los grupos 1 y 4, inmunizados y confrontados con las dos especies del parásito, mostraron máximos decrementos en el VCA de 16.7 y 23.5 %, respectivamente, en los días 10 y 8 PC (Figura 1). Tres de los cinco bovinos que conformaron el grupo testigo presentaron un VCA igual o inferior al 18 %. Para el día ocho PC, un bovino de este grupo

presented a PCV lower than 18 %. In day 8 PC, a bovine belonging to this group died from acute babesiosis, showing a PCV of 14 % and a RT of 40.3 °C.

None of the groups showed a rise in mean rectal temperature during vaccination (Figure 2). The smallest changes were detected in Group 2. In no time during this period, a higher RT than 39.5 °C was detected. In Groups 1, 3, and 4, fever higher than 39.5 °C was detected on days 2, 4, and 3 respectively (Table 4).

During the confrontation period, two increments in RT were detected: the first one on day 4 PC and the second on day 10 PC in the control group, and on days 4 and 12 PC in the immunized groups. The maximum mean temperature was 40.3 °C in the control group (Table 5).

During the immunization period, titles of antibodies began to appear starting from day 9 PI, increasing until the day of the confrontation (day 54 PI), while

Cuadro 3. Seguimiento del segundo bovino multiplicador inoculado con 1×10^9 eritrocitos infestados de *B. bovis* provenientes del primer bovino multiplicador

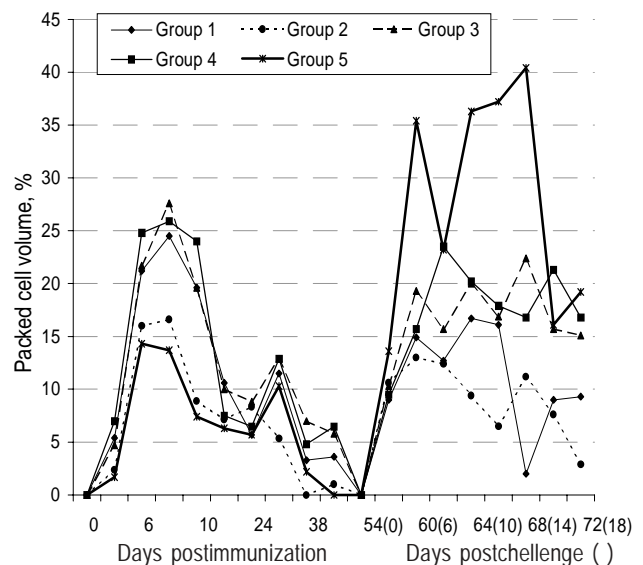
Table 3. Monitoring of the second multiplier bovine inoculated with 1×10^9 erythrocytes infected with *B. bovis* from the first multiplier bovine

Bovine 2	Packed cell volume	Rectal temperature (°C)	Parasitemia (%)
Days postinoculation			
1	29	39.0	—
2	28	39.0	—
3	27	39.2	+ capillary blood
4	27	39.8	+ peripheral blood
5	24	41.5	0.5*

*With a total of $5 \times 150,000$ erythrocytes/microliter of blood

Figura 1. Descenso promedio del volumen celular aglomerado (VCA) en los cinco grupos experimentales

Figure 1. Mean packed cell volume (PCV) in the five experimental groups



Group 1= Combined *in vivo*-derived immunogen; Group 2= *B. bigemina*; Group 3= *B. bovis*; Group 4= Combined *in vitro*-derived immunogen; Group= confrontation control.

murió de babesiosis aguda, presentando un VCA del 14 % y una TR de 40.3 °C.

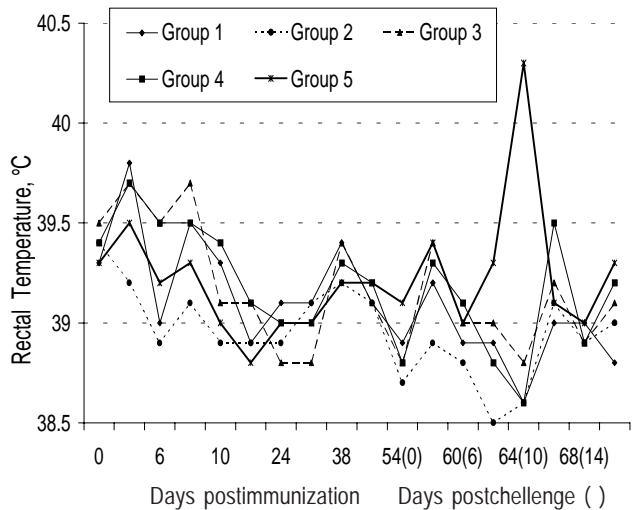
En cuanto a la temperatura rectal, en general no se detectaron valores promedio elevados en ninguno de los grupos experimentales durante la vacunación (Figura 2), detectándose los menores cambios en el grupo 2. En ninguna ocasión, durante este periodo, se detectó una TR mayor a los 39.5 °C. En los grupos 1, 3 y 4, se detectó fiebre por arriba de 39.5 °C en los días 2, 4 y 3 respectivamente (Cuadro 4).

Durante el periodo de confrontación, se detectaron dos incrementos en la TR. El primero se observó el día cuatro PC y el segundo para el día 10 PC en el grupo testigo, mientras que para los días 4 y 12 PC en los grupos inmunizados. La temperatura promedio máxima alcanzada fue de 40.3 °C en el grupo testigo (Cuadro 5).

A la inmunización, los títulos de anticuerpos comienzan a aparecer a partir del día nueve PI, incrementándose hasta el día de la confrontación (día 54 PI), mientras que el grupo testigo permaneció negativo. Se detectó que en los grupos inmunizados con sólo *B. bovis* o *B. bigemina*, hubo presencia de

Figura 2. Valor promedio de temperatura rectal en los cinco grupos experimentales

Figure 2. Mean rectal temperature in the five experimental groups



Group 1= Combined *in vivo*-derived immunogen; Group 2= *B. bigemina*; Group 3= *B. bovis*; Group 4= Combined *in vitro*-derived immunogen; Group 5= confrontation control.

Cuadro 4. Curso de la infección en bovinos *Bos taurus* inmunizados con poblaciones atenuadas de *Babesia bovis** y *Babesia bigemina*** a una dosis de 1×10^7 eritrocitos infectados

Table 4. Course of the infection in *Bos taurus* bovines immunized with attenuated populations of *Babesia bovis** and *Babesia bigemina*** to a dose of 1×10^7 infected erythrocytes

Variable	Groups				
	1a	2a	3a	4b	5
RT higher than 39 °C, days***	2+1	0	4+0.5	3+0.5	1+1.0
RT higher than 39.5 °C (No. of animals)	9	4	5	5	4
Maximum temperature, °C ***	39.8+0.5	39.4+0.4	39.7+0.4	39.7+0.5	39.5+0.5
Lower value PCV, % ***	25.0+2.6	28.0+1.8	25.0+1.7	27.0+5.0	30.0+2.5
Maximum reduction PCV, % ***	24.5+4.1	16.6+5.4	27.6+4.8	25.9+5.1	14.2+3.3
Maximum reduction PCV, days	8	8	8	8	6
Lower value PCV/animal, %	20	24	20	22	26

* Inoculated groups 1,3,4

** Inoculated groups 1,2,4

*** Mean per group of animals

a= Blood from multipliers animals

b= Blood from *in vitro* culture

RT= Rectal temperature; PCV= Packed cell volume

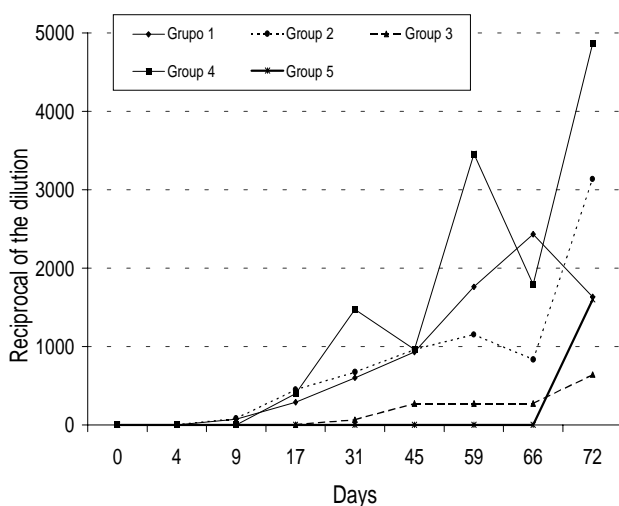
anticuerpos en contra de la otra especie, aunque estos fueron menores en comparación a los otros tres grupos (Figuras 3 y 4). Al desafío, se detectó una respuesta secundaria en todos los animales inmunizados; así como una respuesta primaria en los bovinos del grupo testigo. La respuesta dirigida contra los antígenos de especie heteróloga, fue menor con relación a los otros grupos vacunados y confrontados. Los títulos más altos contra ambas especies de *Babesia*, se observaron en los bovinos que recibieron la inmunización mixta proveniente del cultivo *in vitro*.

DISCUSIÓN

Estudios previos habían demostrado que se cuenta con poblaciones del protozario capaces de inducir protección contra el desafío controlado^(2,3,4) o de campo⁽²⁰⁾. En el presente estudio se demostró la inocuidad y capacidad de inducir una respuesta inmune protectora, de estas poblaciones atenuadas de *Babesia* producidas en cultivo *in vitro*, después de su pase a través de bovinos multiplicadores.

Figura 3. Títulos de anticuerpos anti *Babesia bigemina* mediante inmunofluorescencia indirecta

Figure 3. Antibody titers against *Babesia bigemina* by indirect immunofluorescence



Group 1= Combined *in vivo*-derived immunogen; Group 2= *B. bigemina*; Group 3= *B. bovis*; Group 4= Combined *in vitro*-derived immunogen; Group 5= confrontation control.

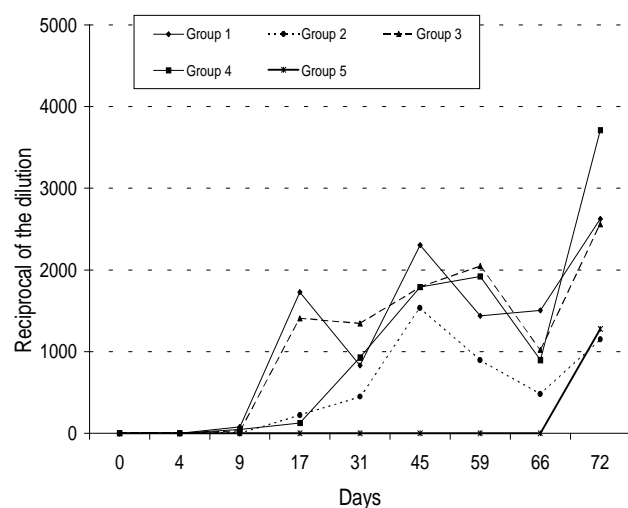
the control group remained negative (Figures 3,4). In the groups immunized with *B. bovis* or *B. bigemina* only, a presence of antibodies against the other species was detected, although smaller in comparison to the other three groups. In the challenge period, a secondary response in all immunized animals was detected, as well as a primary response in the control group. The immune response directed against the antigens of heterologous species, was smaller than in the other vaccinated and confronted groups. The highest titles for both species of *Babesia*, were observed in those bovines which received the mixed immunization coming from the *in vitro* culture.

DISCUSSION

Previous studies had shown that populations of protozoa were able to induce protection against a controlled^(2,3,4) or field challenge⁽²⁰⁾. In the present study the innocuousness and capacity of inducing an immune protective response to these attenuated populations of *Babesia*, after passes through multiplier bovines was confirmed.

Figura 4. Títulos de anticuerpos anti *Babesia bovis* mediante inmunofluorescencia indirecta

Figure 4. Antibody titers against *Babesia bovis* by indirect immunofluorescence



Group 1= Combined *in vivo*-derived immunogen; Group 2= *B. bigemina*; Group 3= *B. bovis*; Group 4= Combined *in vitro*-derived immunogen; Group 5= confrontation control.

Cuadro 5. Curso de la infección en bovinos *Bos taurus*, previamente inmunizados, confrontados con poblaciones patógenas de *Babesia bovis** y *Babesia bigemina*** a una dosis de 1×10^8 eritrocitos infectados

 Table 5. Course of the infection in *Bos taurus* bovines previously immunized, confronted with attenuated populations of *Babesia bovis** and *Babesia bigemina* ** to a dose of 1×10^8 infected erythrocytes

Variable	Groups				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^b	5
RT higher than 39 °C (days)***	0	0	0	1+0.5	2+1.0
RT higher than 39.5 °C (No. of animals)	9	4	5	5	4
Maximum temperature , °C ***	39.3+0.4	39.1+0.3	39.4+0.4	39.5+0.4	39.9+0.6
Lower value PCV, % ***	27.0+2.3	29.0+1.7	26.0+1.8	27.0+2.1	19.0+4.2
Maximum reduction PCV, % ***	16.7+3.6	13+3.3	22.4+4.1	23.5+3.7	40.4+5.1
Maximum reduction PCV, days	10	6	14	8	14
Lower value PCV/animal, %	23	26	25	24	14

* Confronted groups 1,3,4,5

** Confronted groups 1,2,4,5

*** Mean per group of animals

a= Animals previously vaccinated with blood from multipliers animals

b= Animals previously vaccinated with blood from *in vitro* culture

RT= Rectal temperature; PCV= Packed cell volume

La inocuidad pudo demostrarse después de la inoculación de becerros esplenectomizados e inmunodeprimidos, ya que a pesar de recibir una dosis 10 veces mayor a la recomendada para la vacunación, no presentaron parasitemias superiores al 1.14 % en ninguno de los casos, además de que no se observó un fuerte descenso en el VCA y sólo en un día se presentó fiebre por arriba de los 41 °C. Asimismo, se observó que, dependiendo de la condición corporal de los animales multiplicadores, es posible obtener miles de dosis del inmunógeno atenuado a partir de ellos, reduciendo con esto los costos de producción de la vacuna.

El principal obstáculo en el uso de vacunas provenientes de animales, es la posible transmisión de agentes patógenos. Este hecho fue documentado por Rogers *et al*⁽⁷⁾, al demostrar la contaminación de vacunas producidas *in vivo* contra babesiosis, con el virus de leucosis bovina. Este tipo de vacunas atenuadas en animales, ya sea por pases rápidos en becerros esplenectomizados, como es el caso de *B. bovis*⁽²¹⁾, o pases lentos en animales intactos, como sucede en *B. bigemina*⁽⁶⁾ requiere de múltiples pases de sangre de un animal a otro, con objeto de atenuar las poblaciones de parásitos. En el presente estudio, la problemática de la transmisión de sangre entre animales, aunque

The innocuousness was established after inoculation of splenectomised and immunodepressed calves, which, even when having received a dose 10 times higher to the one recommended for vaccination, did not present in any case, parasitemias higher than 1.14%. Besides, a high decrease in PCV was not observed and a fever higher than 41 °C was present only during one day. Also, it was observed that, depending on the body condition of the multiplier animals, it is possible to obtain thousands of doses of the attenuated immunogen, thus reducing the vaccine's production cost.

The main obstacle for the use of vaccines obtained from animals, is the possible transmission of pathogen agents, information cited by Rogers *et al*⁽⁷⁾, who verified the contamination with bovine leucosis virus of babesiosis vaccines produced *in vivo*. This type of vaccines attenuated in animals, either through rapid passes in splenectomised calves, as in the case of *B. bovis*⁽²¹⁾, or by means of slow passes through intact animals, like in *B. bigemina*⁽⁶⁾, which requires of multiple passes of blood from one animal to another in order to attenuate the parasite populations. In this study, the problem of blood transmission between animals, was considerably decreased, since populations previously

está presente, se redujo drásticamente, ya que se utilizan poblaciones previamente atenuadas mediante el cultivo *in vitro*, por lo que el uso de animales no es con objeto de reducir patogenicidad, sino solamente de multiplicar los parásitos atenuados.

Con respecto a los resultados obtenidos durante la vacunación, en los que fue posible detectar una máxima reducción del VCA del 24.5 % y 25.9 % para los grupos vacunados con el inmunógeno mixto proveniente de los bovinos multiplicadores y del cultivo *in vitro* respectivamente, ésta es parecida a lo observado por Cantó *et al.*⁽⁴⁾ en ganado Holstein y bajo un desafío controlado, en donde se obtuvo un descenso del VCA del 21.4 %. En el caso de los inmunógenos inoculados en forma individual, Figueroa *et al.*⁽³⁾ observaron un descenso máximo de 4.8 % durante la vacunación con *B. bigemina* contra el 16.6 % que se detectó en el presente estudio. Aunque esto podría indicar un incremento en la virulencia del protozoo, probablemente éste no sea el caso, ya que en el grupo testigo, el cual no recibió tratamiento, se observó un decremento del 14.2 %. Este hecho se pudo haber presentado debido a la procedencia de los animales y al corto tiempo de aclimatación antes del inicio del experimento. Los animales provenían de una zona con una gran escasez de agua, y probablemente la baja en la concentración celular fue producida, por el proceso de adaptación fisiológica en respuesta a un nuevo entorno ambiental. En estudios previos de vacunación con ganado Holstein, originario de Querétaro, se observaron valores promedio de VCA del 30 %^(2,3,4), mientras que los bovinos experimentales utilizados en el presente estudio, provenientes de Coahuila, presentaban valores de VCA de 34.2 %. En la vacunación con *B. bovis*, el descenso promedio del VCA del 27.6 % en el presente estudio, es muy parecido al 26 % observado por Cantó *et al.*⁽⁴⁾.

A la confrontación, se observó que los aislados de campo utilizados, se comportaron de forma virulenta al inducir cambios fisiológicos aparentes en el grupo testigo, donde se tuvo un descenso máximo promedio en el VCA del 40.4 %, una TR máxima promedio de 39.9 °C y la muerte de un bovino de este grupo por babesiosis.

Los descensos en el VCA, son superiores al 8.8 % observado previamente con ganado Holstein,

attenuated by means of *in vitro* culture were used, and the use of animals was not with the object of reducing pathogenicity, but for multiplying the attenuated parasites.

During vaccination it was possible to detect a maximum 24.5% and 25.9 % PCV reduction for the groups vaccinated with the mixed immunogen coming from bovine multipliers and *in vitro* culture respectively; results in accordance to those obtained by Cantó *et al.*⁽⁴⁾ in Holstein cattle and in a controlled challenge, where a PCV decrease of 21.4 % was found. In the case of the immunogens individually inoculated, Figueroa *et al.*⁽³⁾ observed a maximum decrease of 4.8 % during vaccination with *B. bigemina* vs. 16.6 % detected in the present study. Although this could indicate an increment in the virulence of the protozoan, probably this is not the case, since a decrease of 14.2 % was observed in the control group, which did not receive any treatment. This fact could have presented itself because of the animals' origin and to the short acclimatization period before the experiment. The animals came from an area showing a great water shortage, and probably a drop in cellular concentration was produced by a process of physiologic adaptation in answer to a new environment. In previous vaccination studies with native Holstein from Queretaro, 30 % PCV mean values were observed^(2,3,4), while the bovines used in this study, coming from Coahuila, presented values of 34.2 %. With *B. bovis*, a mean 27.6 % PCV decrease, is similar to the 26 % observed by Cantó *et al.*⁽⁴⁾.

During confrontation, it was observed that the field isolation, behaved in a virulent way inducing apparent physiologic changes in the control group, in which a mean maximum decrease of 40.4 % in PCV, a highest RT mean of 39.9°C and the death of a bovine due to babesiosis was observed.

The decreases in PCV are higher than the 8.8 % observed previously in Holstein cattle using *in vitro* origin immunogen⁽⁴⁾ in a controlled confrontation, and lower than that observed by Vega *et al.*⁽²⁰⁾ in a field confrontation where a decrease of 34.3 % was displayed.

The immunization of bovines with erythrocytes infected with *B. bigemina* or *B. bovis* coming from multiplier animals showed, in the simple confrontation,

utilizando el inmunógeno de origen *in vitro*⁽⁴⁾ bajo una confrontación controlada, e inferiores a lo observado por Vega *et al.*⁽²⁰⁾ en una confrontación de campo donde se presentó un descenso del 34.3 %.

La inmunización de bovinos con eritrocitos infectados con *B. bigemina* o *B. bovis* provenientes de animales multiplicadores mostró, a la confrontación simple, una baja de 13 y 22.4 % respectivamente, lo cual es cercano a lo observado en estudios previos, donde se determinaron descensos del 11.3 % para *B. bigemina* y de 20.3 % para *B. bovis*^(3,4).

Por otro lado, los resultados obtenidos con relación a la respuesta inmune contra los antígenos de *B. bovis* y *B. bigemina*, indican un adecuado reconocimiento del protozoario por parte de los animales inmunizados. Fue posible detectar una respuesta muy baja en los animales inmunizados en forma monoespecífica en contra de la otra especie del hemoparásito, observándose un mayor reconocimiento cruzado de los anticuerpos específicos producidos en contra de *B. bigemina* hacia antígenos de *B. bovis*. Estos resultados apoyan lo observado por Wright *et al.*⁽²²⁾, que indican que fracciones purificadas de *B. bigemina* podrían llegar a inducir la protección contra *B. bovis*, así como lo descrito por Vega *et al.*⁽²⁰⁾ al demostrar que, la inmunidad cruzada producida por los organismos atenuados de ambas especies de *Babesia*, no es suficiente para proteger animales contra la confrontación heteróloga.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Mediante el uso de animales esplenectomizados e inmunodeprimidos fue posible producir un elevado número de dosis de inmunógeno de *B. bovis* y *B. bigemina*, los que resultaron ser inocuos al inmunizar animales libres de anticuerpos contra el protozoario. Asimismo, su aplicación indujo una respuesta inmune adecuada para resistir la confrontación de aislados patógenos de campo. Es muy importante hacer notar que la multiplicación de estas poblaciones atenuadas de *Babesia* spp. en bovinos, se debe realizar a partir de las poblaciones originales procedentes de cultivo *in vitro*, ya que de otro modo, éstas podrían revertir a la virulencia al

a drop of 13% and 22.4 % respectively, which is close to those observed in previous studies, where decreases of 11.3 % were determined for *B. bigemina* and of 20.3 % for *B. bovis*^(3,4).

The results obtained in relation to an immune response to *B. bovis* and *B. bigemina* antigens, indicate an appropriate recognition of the protozoan by the immunized animals. It was possible to detect a very low response in the animals immunized in mono-specific form against the other species of the hemoparasite, although a higher crossed recognition of specific antibodies for *B. bigemina* towards antigens of *B. bovis* was observed. These results support reports by Wright *et al.*⁽²²⁾ who indicated that purified fractions of *B. bigemina* could end up inducing protection against *B. bovis*, as well as that described by Vega *et al.*⁽²⁰⁾ which showed that crossed immunity by attenuated organisms of both species of *Babesia*, is not enough to protect animals against an heterologous confrontation.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

By means of the use of splenectomised and immunodepressed animals, it was possible to produce a high number of immunogen doses of *B. bovis* and *B. bigemina*, that turned out to be innocuous when immunizing animals free of antibodies against the protozoan. Also, their application induced an immune answer adequate to resist the confrontation of isolated field pathogens. It is very important to take notice that the multiplication of these attenuated populations of *Babesia* spp. in bovines, should be carried out starting from original populations coming from *in vitro* culture, otherwise, these could revert to virulence in a new pass through bovines, besides, that would increase the possibility to transmit pathogens if using animals carrying other undesirable biological agents. Also, taking into account a possible risk of contamination, it is suggested that this tool against bovine babesiosis should only be used in cases in which the necessary vaccine doses, were more than what is feasible to produce in the laboratory by means of the traditional method of *in vitro* culture, in consequence, its use would only be indicated in cases of emergency.

realizar otro pase en bovinos, además de que se incrementaría notablemente la posibilidad de transmisión de agentes patógenos al utilizar animales portadores probables de otros agentes biológicos no deseables. Asimismo, considerando el riesgo de contaminación que se pudiese presentar, se sugiere que esta herramienta en contra de la babesiosis bovina sólo se debería de utilizar en casos en los que las dosis de vacuna a utilizar, fueran superiores a lo que es factible producir en el laboratorio mediante el método tradicional de cultivo *in vitro*, por lo que su uso sólo sería indicado en casos justificables de emergencia.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONACyT por el financiamiento parcial del estudio a través del Proyecto 820003-K0005B; así como al Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria del estado de Querétaro, por las facilidades otorgadas para realizar el estudio en el rancho "GB".

LITERATURA CITADA

1. Mahoney DF. The development of control methods for tick fevers of cattle in Australia. *Aust Vet J* 1994;71(9):283-287.
2. Cantó AGJ, Figueroa MJV, Alvarez MJA, Ramos AJA, Vega MCA. Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de cultivo *in vitro*. *Téc Pecu Méx* 1996;34(3):127-135.
3. Figueroa MJV, Cantó AGJ, Alvarez MJA, Lona GR, Ramos AJA, Vega MCA. Capacidad protectora en bovinos de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro*. *Téc Pecu Méx* 1998;36(2):95-107.
4. Cantó GJ, Figueroa JV, Ramos JA, Alvarez, JA, Mosqueda JJ, Vega CA. Evaluación de la patogenicidad protectora de un inmunógeno fresco combinado de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. *Vet Méx* 1999;30(3):215-219.
5. Callow LL. Vaccination against bovine babesiosis. In: Miller H, Pino JA, McKelvey JJ editores. *Immunity to blood parasites of animals and man. Advances in experimental medicine and biology.* New York; Plenum Press; 1977;(93):121-149.
6. Dalglish RJ, Callow LL, Mellors LT, McGregor W. Development of a highly infective *Babesia bigemina* vaccine of reduced virulence. *Aust Vet J* 1981;57:8-11.
7. Rogers RJ, Dimmock CK, de Vos AJ, Rodwell BJ. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced *in vivo* against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust Vet J* 1988;65:285-290.
8. Callow LL. Métodos australianos de vacunación contra la anaplasmosis y babesiosis. *Rev Mundial Zootec* 1976;18:9-18.

ACKNOWLEDGMENTS

To CONACyT for partial funding of this study through Project 820003-K0005B; as well as to the Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Querétaro, for the permission granted and the help provided to carry out this study in the "GB" ranch.

End of english version

9. REDLAB/Programa de Hemoparásitos. Protocolo para evaluar la seguridad y eficacia de los inmunógenos contra anaplasmosis y babesiosis bovina. FAO, Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile, 1994.
10. Alonso M, Blandino T, Mendoza E, Savon L, Camacho M. Development of a *Babesia bovis* live attenuated vaccine. *Arch Med Res* 1994;25(2):273-278.
11. Pipano E. Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trop Anim Hlth Prod* 1997;29:86-91.
12. Erp EE, Smith RD, Ristic M, Osorno MB. Continuous cultivation *in vitro* of *Babesia bovis*. *Am J Vet Res* 1980;41:1141-1145.
13. Vega CA, Buening GM, Green TJ, Carson CA. *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am J Vet Res* 1985;48:416-421.
14. Tello M, Alvarez JA, Ramos JA, Aboytes R, Cantó GJ. La prueba de ELISA en el diagnóstico de la anaplasmosis. *Téc Pecu Méx* 1986;52:45-52.
15. Goldman M, Pipano E, Rosemberg AS. Fluorescent antibody tests for *Babesia bigemina* and *Babesia berbera*. *Res Vet Sci* 1972;13:77-81.
16. Salas TE, García GJ, Ramos AJ, Rodríguez RE, Aboytes R, Buening GM, Vega MCA. Patogenia de una clona irradiada de *Babesia bovis* obtenida de cultivo *in vitro*. *Téc Pecu Méx* 1988;26:36-43.
17. Hernández OR, Alvarez MJA, Buening GM, Cantó AGJ, Ramos AJ, Vega MCA. Infectividad de diferentes aislamientos de *Babesia bigemina* a garrapatas *Boophilus microplus* y su transmisibilidad a bovinos adultos. *Téc Pecu Méx* 1990;28(2):63-68.
18. Rodríguez SD, Buening GM, Green TJ, Carson CA. Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Infect Immun* 1983;42:15-19.
19. Rodríguez SD, Buening GM, Carson CA. Caracterización bioquímica preliminar de clones de *Babesia bovis* irradiada con cobalto 60. *Téc Pecu Méx* 1993;31:16-22.
20. Vega MCA, Figueroa MJV, Rojas REE, Ramos AJA, Cantó AG J. Insuficiente inmunidad cruzada en bovinos por *Babesia bigemina* y/o *Babesia bovis* derivadas de cultivo *in vitro*. *Téc Pecu Méx* 1999;37(1):13-19.
21. Callow LL, Mellors LT, McGregor W. Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. *Int J Parasitol* 1979;9:333-337.
22. Wright IG, Goodger BV, Leatch G, Aylward JH, Rode-Bramanis K, Wältisbuhl DJ. Protection of *Babesia bigemina*-immune animals against challenge with virulent *Babesia bovis*. *Infec Immun* 1987;55:364-369.