

# Evaluación de la patogenicidad y capacidad protectora de un inmunógeno fresco combinado de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*\*

Germinal Jorge Canto Alarcón\*\*,\*\*\*

Julio Vicente Figueroa Millan\*\*

Juan Alberto Ramos Aragón\*\*

Jesús Antonio Álvarez Martínez\*\*z

Juan José Mosqueda Gualito\*\*

Carlos Agustín Vega y Murguía\*\*

---

### Abstract

The main objective of this work was to evaluate the inocuity and immunoprotection capability of a combined immunogen of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* at doses of  $1 \times 10^9$  and  $1 \times 10^8$ , respectively, under a controlled challenge. In the first experiment (inocuity), 16 Holstein bovines from a free tick area, and negative to antibodies against *Babesia* spp by the indirect fluorescent test, were used. Animals were inoculated with  $1 \times 10^9$  infected red blood cells (RBC) of an attenuated strain of *Babesia bigemina* and  $1 \times 10^8$  RBC of a clone of *Babesia bovis*. Both derived from an *in vitro* culture. Physiological parameters were monitored from day 7 to day 14 post inoculation (PI), and minimal changes were observed. The second experiment (immunogenicity) was performed 3 months PI, and consisted in the challenge of 8 animals of the previous inoculated bovines from experiment 1 with virulent strains at a dose of  $1 \times 10^8$  RBC, of both species. Four additional animals were used as the control group. The immunized group presented a small drop in the packed cell volume (PCV). No changes in rectal temperature were observed, and the percentage of parasitised erythrocytes (PPE) was 0.06% and <0.01% for *B. bigemina* and *B. bovis*, respectively. In the control group a rectal temperature over  $40^\circ\text{C}$  was observed; the PCV dropped (29%), and the PPE was 0.5% for *B. bigemina* and 0.3% for *B. bovis*. These animals required treatment in order to prevent mortality. It is concluded, that the combined immunogen of *B. bigemina* and *B. bovis* at high doses does not produce severe clinical reactions in susceptible animals, and evokes a solid protection against virulent strain challenge.

**KEY WORDS:** babesia bigemina, babesia Bovis, in vitro culture, immunization, protection, Bovines.

### RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar la inocuidad y la capacidad inmunoprotectora de un inmunógeno combinado de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* a una dosis de  $10^8$  y  $10^9$ , respectivamente, bajo un desafío controlado. En el primer experimento (inocuidad) se utilizaron 16 bovinos Holstein provenientes de una zona libre de garrapatas y negativos a anticuerpos contra *Babesia* spp, mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), los cuales fueron inoculados, vía intramuscular, con  $1 \times 10^9$  eritrocitos infectados (EI) con una cepa atenuada de *B. bigemina* y  $10^8$  EI de una clona irradiada de *B. bovis*, ambas derivadas de cultivo *in vitro*. Se observaron cambios en las constantes fisiológicas a partir del día 7 y hasta el día 14 posinoculación (PI) en los animales sin verse éstos físicamente afectados. El porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) fue <0.01%. El segundo experimento (inmunogenicidad), se realizó tres meses PI y consistió en el desafío de 8 de los animales del experimento 1 con cepas virulentas de ambas especies del protozoario a una dosis de  $10^8$  EI de cada una. Cuatro animales adicionales sirvieron como grupo testigo. El grupo inmunizado presentó ligera disminución en el volumen celular aglomerado (VCA) con temperatura rectal (TR) sin cambios y PEP de 0.06 y <0.01

---

\*Este trabajo fue parcialmente financiado por el Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria del estado de Querétaro.

\*\*Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Apartado Postal 206, CIVAC, 62500, Jiutepec, Morelos, México.

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

para *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente. El grupo testigo presentó TR mayor a 40°C, disminución del VCA (29%) y el PEP fue de 0.5 para *B. bigemina* y 0.03 para *B. bovis*; estos animales requirieron tratamiento para evitar su muerte. Se concluye que el inmunógeno combinado de *B. bigemina* y *B. bovis* a dosis altas no provoca reacciones clínicas severas en animales susceptibles y proporciona una sólida protección al desafío controlado con cepas virulentas.

**PALABRAS CLAVE:** babesia bigemina, babesia bovis, cultivo in vitro, inmunización, protección, bovino.

## Introducción

La babesiosis bovina es una enfermedad de gran impacto económico en el ámbito mundial y en las regiones tropicales y subtropicales, *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* representan las dos especies más importantes.<sup>1,2</sup> En México, se ha informado la presencia de los dos parásitos<sup>3</sup>, su prevalencia presenta variaciones que van desde 4.54% hasta 96%<sup>4</sup>.

En el país el desarrollo de inmunógenos vivos a partir de cepas atenuadas derivadas del cultivo *in vitro*, ha sido propuesto como una alternativa en el control de la enfermedad y ha presentado resultados alentadores, tanto para parásitos clonados e irradiados de *Babesia bovis*<sup>5,6,7</sup>, como para cepas atenuadas de *Babesia bigemina*.<sup>7,8</sup> En estudios previos se determinó tanto la dosis inmunizante como la dosis de desafío para ambas especies; así, Cantó *et al.*<sup>7</sup> determinaron que a partir de un total de  $1 \times 10^6$  eritrocitos infectados (EI) de una clona irradiada de *Babesia bovis* se confería una protección de 100% al desafiar con  $1 \times 10^8$  EI de una cepa virulenta sin causar efectos posvacunales severos en los animales inmunizados. Por su parte, Figueroa *et al.*<sup>9</sup> determinaron una dosis inmunizante mínima de  $1 \times 10^6$  EI de una cepa atenuada de *Babesia bigemina* como protección segura ante un desafío con  $1 \times 10^8$  EI de una cepa de campo seis meses después. Sin embargo, no se ha hecho una evaluación de estos inmunógenos de manera combinada. Por lo tanto, en este trabajo se evalúan la inocuidad y la capacidad inmunoprotectora de un inmunógeno combinado de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* en un desafío controlado.

## Material y métodos

El estudio se dividió en dos fases con el propósito de evaluar la inocuidad de una dosis alta de inmunógeno combinado derivado del cultivo *in vitro* (experimento 1), así como la capacidad protectora de este último ante un desafío controlado (experimento 2).

### Experimento 1

Evaluación de la inocuidad del inmunógeno mixto: Se utilizaron 16 bovinos Holstein, machos, con una edad entre los 18 y 36 meses, provenientes de una zona libre de garrapatas y negativos a anticuerpos contra *Babesia* spp mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)<sup>10</sup>. Los animales fueron inoculados intramuscularmente (IM) con  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^8$  EI de una

cepa atenuada de *Babesia bigemina* y una clona irradiada de *Babesia bovis*, respectivamente, ambas derivadas del cultivo *in vitro*. La procedencia de ambas cepas, así como las técnicas de clonación, radiación, caracterización y los métodos de cultivo *in vitro*, han sido descritos previamente<sup>11,12,13,14,15</sup>. Los animales tuvieron seguimiento clínicamente desde el día 0 hasta el día 15 posinoculación (PI) y se realizaron observaciones diarias de: Volumen celular aglomerado (VCA) mediante la prueba de microhematocrito<sup>16</sup>; temperatura rectal (TR), porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) mediante la lectura de frotis sanguíneos teñidos con colorante de Giemsa<sup>16</sup> y se determinó el título de anticuerpos específicos mediante la prueba de IFI.

### Experimento 2

Evaluación de la capacidad inmunoprotectora: Se utilizaron 8 de los bovinos inmunizados en el experimento 1, los animales fueron desafiados 1 a los 81 días PI, con cepas virulentas de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* previamente aisladas de casos clínicos de babesiosis y que fueron mantenidas en congelación y a través de pases en animales susceptibles<sup>6,8</sup>. Para la reactivación de las cepas se utilizaron dos bovinos susceptibles; cuando éstos presentaron una parasitemia adecuada, se determinó el volumen de eritrocitos por unidad de volumen, así como el PEP para obtener la dosis de desafío que fue de  $1 \times 10^8$  EI para cada especie del protozooario, la cual se aplicó IM a cada uno de los bovinos. Como grupo testigo se utilizaron cuatro bovinos susceptibles que también fueron inoculados con la misma dosis de parásitos de cada una de las cepas virulentas. Todos los animales tuvieron seguimiento diariamente durante 22 días PI y los valores de TR, VCA y PEP fueron registrados.

## Resultados

En el Cuadro 1 se presentan los valores obtenidos de las variables estudiadas durante la inmunización y el desafío, incluyendo aquellos de los animales testigo. En el experimento 1 se observó un periodo de incubación de siete días; la temperatura máxima alcanzada por el grupo fue de 39.8°C en promedio, ésta persistió en el grupo durante cinco días (Figura 1). La reducción máxima promedio del VCA del grupo fue de 21.4% en relación con el valor inicial, alcanzándose el día 14 PI (Figura 1). Respecto de la lectura de frotis sanguíneos, se observó un PEP promedio <0.01, tanto para *B. bigemina* como para *B. bovis*, con duración de 4.1 y 1.3 días, respectivamente.

Ningún animal requirió tratamiento y sus constantes fisiológicas se normalizaron dos semanas después.

Al desafío con las cepas virulentas (experimento 2) se observó en el grupo vacunado un periodo de incubación de 10 días, con una TR promedio máxima de 39.7°C, presentándose fiebre en seis animales del grupo con una duración promedio de 3 días. Por otro lado, el grupo testigo presentó fiebre a partir del día 4 PI, alcanzando un máximo de hasta 40.8°C en promedio para el día 10 PI, afectándose seriamente todos los animales del grupo (Figura 2). Con relación al VCA, el grupo desafiado tuvo una reducción del 10.68% del valor inicial el día 9 PI, mientras que el grupo testigo registró una pérdida de31.30% para el día 11 PI (Figura 3). En cuanto al PEP, también se encontraron diferencias entre los dos grupos ya

que se registraron valores de 0.06 y <0.01 para *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente, en el grupo desafiado; mientras que en el grupo testigo se observó para *B. bigemina* una parasitemia de 0.5 y para *B. bovis* un total de 0.03%. Ninguno de los animales del grupo desafiado requirió tratamiento quimioterápico; no así los animales del grupo testigo que debieron ser tratados para evitar su muerte, y a pesar de ello, un bovino de este grupo murió por babesiosis clínica aguda. En la Figura 4 se puede observar que los 16 animales utilizados en el experimento 1 seroconvirtieron para el día 11 PI, presentando títulos promedio de 1:4660 para *B. bovis* y de 1:3520 para *B. bigemina*. En los ocho animales que se mantuvieron para el experimento 2, los niveles de anticuerpos se encontraban antes del inicio de esta fase a niveles de 1:2800 y de 1:2080 para *B. bovis* y *B.*

CUADRO 1

DESCRIPCION DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS Y DE LOS VALORES OBTENIDOS EN LAS DIFERENTES

VARIABLES REGISTRADAS (medias ± sd).

Variable/Grupo	Inmunizado	Inmunizado desafiado	Testigo desafiado
Animales por grupo	16	8	4
Periodo de incubación (días)	7 ± 0.93	10 ± 2.1	7 ± 05
Temperatura máxima (°C)	39.8 ± 0.23	39.7 ± 0.75	40.8 ± 1.2
Temperatura > 39.5°C (días)	5 ± 0.54	3 ± 0.58	3 ± 1.6
Máxima reducción VCA* (%)	21.4 ± 3.53	8 82 ± 5.2	31.3 ± 6.6
Eritrocitos infectados con B.bigemina (%)	<0.01 ± 0.0	0.06 ± 0.08	0.5 ± 0.3
Eritrocitos infectados con B.bovis (%)	<0.01 ± 0.0	<0.01 ± 0.0	0.03 ± 0.04
Parasitemia B.bigemina(días)	4.1 ± 1.21	3.8 ± 1.7	3 ± 1.5
Parasitemia B.bovis(días)	1.3 ± 0.80	3.4 ± 1.5	2 ± 1.7
Quimioterapia (Núm. de animales)	0	0	4
Mortalidad (Núm. de animales)	0	0	1

\*VCA = Volumen celular aglomerado

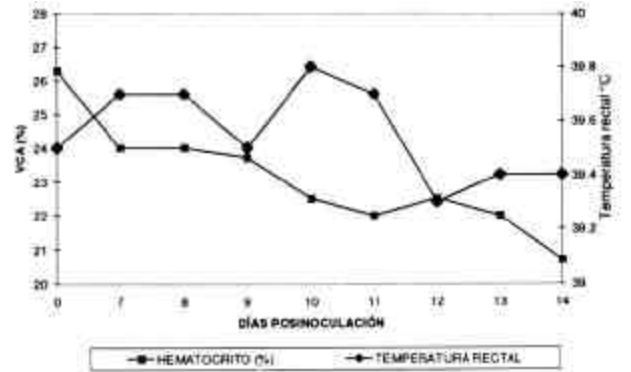


Figura 1. Valores de volumen celular aglomerado y temperatura rectal registrados durante la evaluación de la inocuidad del inmunógeno utilizado.

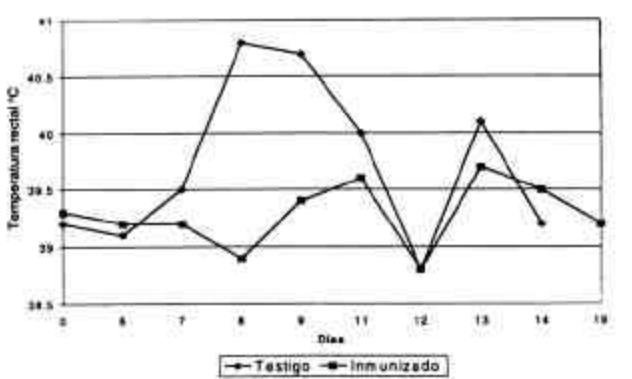


Figura 2. Valores de temperatura rectal determinados en los grupos inmunizado y testigo durante los 19 días después del desafío.

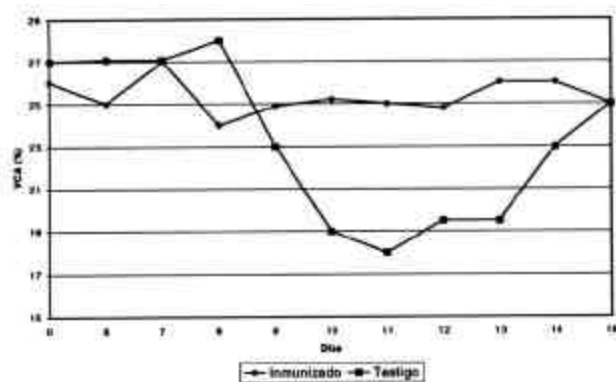


Figura 3. Valores de volumen celular aglomerado en los grupos inmunizado y testigo durante los 19 días posteriores al desafío.

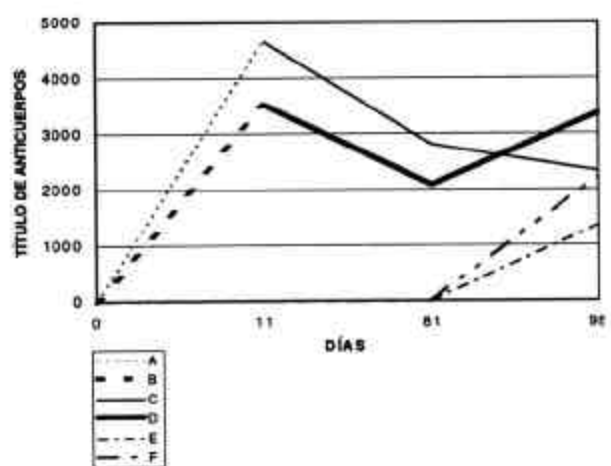


Figura 4. Títulos de anticuerpos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta contra *B. Bovis* y *B. Bigemina* en animales vacunados (día 0) y posteriormente confrontados (día 81). Los grupos A y B consistieron de los mismos 16 bovinos, de ahí se obtuvieron ocho que formaron los grupos C y D, los cuales fueron desafiados. Se muestran los títulos observados en los cuatro animales testigo (grupos E y F). Las letras A, C y E, indican los títulos de anticuerpos contra *B. Bovis* y las letras B, D y F, indican los títulos contra *B. Bigemina*.

*bigemina*, respectivamente. A la confrontación se observó en los animales previamente inmunizados un pequeño incremento en el título de anticuerpos contra *B. bigemina*, mientras que en el grupo testigo, los valores fueron de 1:1360 para *B. bovis* y de 1:2240 para *B. bigemina*.

## Discusión

En estudios previos se ha demostrado tanto la inocuidad como la capacidad protectora de ambas especies de *Babesia*, derivadas de cultivo *in vitro*, a diferentes dosis<sup>7,9</sup>; en dichos trabajos se observó que bovinos inoculados con  $1 \times 10^9$  EI con *B. bigemina*, así como con  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  EI con *B. bovis*, presentaban ciertas reacciones clínicas diferentes a las observadas al utilizar dosis con menor cantidad de parásitos. Estas reacciones fueron periodos prepatentes más cortos, mayor persistencia del parásito en la circulación sanguínea y parasitemias más

altas, un mayor decremento del VCA y temperatura rectal más elevada. Los resultados no indicaban lo que podría suceder en relación con los efectos clínicos que pudiesen presentarse a la inoculación simultánea de ambos inmunógenos, ni tampoco la capacidad de protección que se podría presentar al desafío con cepas virulentas de campo. Los resultados de este estudio mostraron que aun cuando la vacunación se realizó en forma mixta y a dosis de  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  para *B. bovis* y *B. bigemina*, respectivamente, los valores tanto de TR, VCA y PEP, nunca comprometieron la salud de los animales durante el periodo de vacunación. Esto último probablemente pudo deberse a la adecuada atenuación que han sufrido las cepas vacunales y al excelente estado físico que presentaban los animales al momento de la inmunización, lo que debe de ser tomado en cuenta para futuros estudios de vacunación.

La evaluación de inmunógenos vivos atenuados obtenidos de cultivo *in vitro*, ha sido descrita por varios autores. Yunker *et al.*<sup>17</sup> informan de una población atenuada de *B. bovis* que fue obtenida después de cultivar al parásito *in vitro* utilizando suero de caballo. Los autores indican que esta población indujo una sólida inmunidad contra la confrontación de parásitos virulentos. Asimismo, Jorgensen *et al.*<sup>18</sup> y Mangold *et al.*<sup>19</sup>, en Australia y Argentina, respectivamente, informan de la producción de vacunas contra *B. bovis* y *B. bigemina* a partir de parásitos multiplicados *in vitro*.

Resultados de trabajos previos de inmunización en los que se utilizó una sola de las especies de hemoparásitos como agente inmunizante, a la misma dosis que en el presente estudio, indican en el caso de *B. bigemina*<sup>9</sup> valores máximos de TR de  $39.1^{\circ}\text{C}$ , de disminución del VCA de 13.2% y de PEP de 0.04%; mientras que para el caso de *B. bovis* los autores informan de valores máximos de TR de  $41.5^{\circ}\text{C}$ , de disminución máxima de VCA de 31.5% y PEP de 0.02%. Comparando estos resultados con los obtenidos en el presente estudio que fueron de  $39.8^{\circ}\text{C}$ , 21.4% y < 0.01% para TR, VCA y PEP, respectivamente, se observa que no existió ningún efecto aditivo detrimental por la inoculación de ambos inmunógenos, lo que indica la factibilidad de utilizar el inmunógeno combinado para inducir inmunidad contra el desafío. Además estos resultados probablemente también indiquen que las cepas vacunales se encuentran aún más atenuadas que en los primeros estudios.

En trabajos previos a la confrontación con  $1 \times 10^8$  eritrocitos infectados con una cepa de campo, bovinos inmunizados con dosis de  $1 \times 10^9$  parásitos atenuados de *B. bigemina* y de  $1 \times 10^8$  parásitos atenuados de *B. bovis*, Figueroa *et al.*<sup>9</sup> y Cantó *et al.*<sup>7</sup> informan del incremento de temperatura promedio a  $40.2^{\circ}\text{C}$ , una reducción en el VCA del 18.5% y PEP de 0.02% para *B. bigemina*, mientras que para *B. bovis* se indican valores de  $39.7^{\circ}\text{C}$ , 19% y < 0.01% para las variables de temperatura, VCA y PEP, respectivamente. En el presente estudio los valores obtenidos en las variables de temperatura, VCA y PEP para ambas especies fueron de  $39.7^{\circ}\text{C}$ , 8.82% y 0.06% y < 0.01% para *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente.

Comparando los resultados del inmunógeno fresco combinado del hemoprotozoario con los obtenidos en los estudios previos, cuando se utilizó sólo una especie del parásito, se podría pensar que el inmunógeno combinado incrementó el desarrollo de inmunidad en los animales vacunados, ya que las respuestas observadas en las variables estudiadas sufrieron menos cambios.

La diferencia de tres días observada en el periodo de incubación entre los animales vacunados y los testigos posterior a la confrontación, reflejan probablemente una respuesta inmune parcial que se tradujo en un retraso en la aparición del protozoario en la sangre periférica. Esta posible respuesta incompleta, también se observa en el porcentaje de parasitemia que se presentó, con ambas especies de *Babesia*, entre los animales vacunados y testigo. Aunque existió la presencia de parásitos en todos los animales en experimentación, los animales testigo presentaron parasitemias diez veces mayores que las observadas en los animales vacunados.

Los resultados de inocuidad y capacidad en la inducción de protección del inmunógeno fresco combinado de *B. bigemina* y *B. bovis* son alentadores; sin embargo, es indispensable conocer la capacidad de protección de dicho inmunógeno al confrontar a los animales vacunados con cepas patógenas en condiciones naturales utilizando preferentemente el inmunógeno previamente congelado, con objeto de facilitar su transporte y conservación. que en los primeros estudios.

En trabajos previos a la confrontación con  $1 \times 10^8$  eritrocitos infectados con una cepa de campo, bovinos inmunizados con dosis de  $1 \times 10^9$  parásitos atenuados de *B. bigemina* y de  $1 \times 10^8$  parásitos atenuados de *B. bovis*, Figueroa *et al.* <sup>9</sup> y Cantó *et al.* <sup>7</sup> informan del incremento de temperatura promedio a  $40.2^\circ\text{C}$ , una reducción en el VCA del 18.5% y PEP de 0.02% para *B. bigemina*, mientras que para *B. bovis* se indican valores de  $39.7^\circ\text{C}$ , 19% y  $<0.01\%$  para las variables de temperatura, VCA y PEP, respectivamente. En el presente estudio los valores obtenidos en las variables de temperatura, VCA y PEP para ambas especies fueron de  $39.7^\circ\text{C}$ , 8.82% y 0.06% y  $<0.01\%$  para *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente.

Comparando los resultados del inmunógeno fresco combinado del hemoprotozoario con los obtenidos en los estudios previos, cuando se utilizó sólo una especie del parásito, se podría pensar que el inmunógeno combinado incrementó el desarrollo de inmunidad en los animales vacunados, ya que las respuestas observadas en las variables estudiadas sufrieron menos cambios.

La diferencia de tres días observada en el periodo de incubación entre los animales vacunados y los testigos posterior a la confrontación, reflejan probablemente una respuesta inmune parcial que se tradujo en un retraso en la aparición del protozoario en la sangre periférica. Esta posible respuesta incompleta, también se observa en el porcentaje de parasitemia que se presentó, con ambas especies de *Babesia*, entre los animales vacunados y testigo. Aunque existió la presencia de parásitos en todos los animales en experimentación, los animales testigo presentaron parasitemias diez veces mayores que las

observadas en los animales vacunados.

Los resultados de inocuidad y capacidad en la inducción de protección del inmunógeno fresco combinado de *B. bigemina* y *B. bovis* son alentadores; sin embargo, es indispensable conocer la capacidad de protección de dicho inmunógeno al confrontar a los animales vacunados con cepas patógenas en condiciones naturales utilizando preferentemente el inmunógeno previamente congelado, con objeto de facilitar su transporte y conservación.

## Referencias

1. McCosker PI. The global importance of babesiosis. In: Ristic M, Krier I, editors. Babesiosis. New York: Academic Press, 1981:1-24.
2. Wright IG. Immunodiagnosis and immunoprophylaxis against the hemoparasites *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. in domestic animals. Rev Sci Tech Off Int Epizoot 1990;9:345-350.
3. Osorno MB. Babesiosis en México. Vet Méx 1978;9:203-207.
4. Alvarez IA, Cantó GI. Epidemiología de la babesiosis. En: Quiroz H, García Y, editores. Parasitología Volumen Conmemorativo. México (DF): Sociedad Mexicana de Parasitología A.C., 1985:55-72.
5. Buening GM, Kuttler KL, Rodriguez SD. Evaluation of a cloned *Babesia bovis* organism as a live immunogen. Vet Parasitol 1986;22:235-238.
6. Salas E, García I, Ramos IA, Rodríguez E, Aboytes R, Buening G, et al. Patogenia de una clona irradiada de *Babesia bovis* obtenida del cultivo in vitro. Téc Pecu Méx 1988;26:36-43.
7. Cantó GI, Figueroa IV, Alvarez IA, Ramos IA, Vega CA. Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de cultivo in vitro. Téc Pecu Méx 1996; 34:127-135.
8. Hernández R, Alvarez IA, Buening G, Cantó GI, Monroy M, Ramos IA, et al. Diferencias en la virulencia y en la inducción de resistencia de aislamientos de *Babesia bigemina* obtenidos de cultivo in vitro. Téc Pecu Méx 1990;28:51-59.
9. Figueroa IV, Cantó GI, Alvarez IA, Lona R, Ramos IA, Vega CA. Capacidad protectora en bovinos de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo in vitro. Téc Pecu Méx 1998;36:95-105.
10. Goldman M, Pipano E, Rosenberg AS. Fluorescent antibody tests for *Babesia bigemina* and *Babesia berbera*. Res Vet Sci 1972;13:77-81.
11. Levy M, Ristic M. *Babesia bovis*: continuous cultivation in microaerophilous stationary phase culture. Science 1980;207:1218-1230.
12. Vega CA, Buening G, Green TJ, Carson CA. In vitro cultivation of *Babesia bigemina*. Am J Vet Res 1985;46:416-421.
13. Rodríguez SD, Buening G, Green TJ, Carson CA. Cloning of *Babesia bovis* by in vitro cultivation. Infect Immun 1983;42:15-19.
14. Hernández R, Álvarez JA, Buening G, Cantó GI,

- Ramos JA, Vega CA. Infectividad de diferentes aislamientos de *Babesia bigemina* a garrapatas *Boophilus microplus* y su transmisibilidad a bovinos adultos. *Téc Pecu Méx* 1990;28:63-69.
15. Rodríguez SD, Buening G, Carson CA. Caracterización bioquímica preliminar de clones de *Babesia bovis* irradiadas con cobalto 60. *Téc Pecu Méx* 1993;31:16-21.
  16. Schalm OW, Jain NC, Carrol EJ. Materials and methods for the study of the blood, including brief comments on factors to be considered in interpretation. In: Schalm OW, editor. *Veterinary hematology*. 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986:15-81.
  17. Yunker CE, Kuttler KL, Johnson LW. Attenuation of *Babesia bovis* by in vitro cultivation. *Vet Parasitol* 1987;24:7-13.
  18. Jorgensen WK, Waldron SJ, McGrath JL, Roman RJ, de Vos AJ, Williams KA. Growth of *Babesia bigemina* parasites in suspension cultures for vaccine production. *Parasitol Res* 1993;78:423-427.
  19. Mangold AJ, Vanzini VR, Echaide IE, de Echaide ST, Volpogni MM, Guglielmone AA. Viability after thawing and dilution of simultaneously cryopreserved vaccinal *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* strains cultured in vitro. *Vet Parasitol* 1996;61:345-349.