

## VACUNA EXPERIMENTAL CONTRA BABESIAS BOVIS Y BIGEMINA, PRODUCIDA CON ATENUACION DE LOS PARASITOS POR IRRADIACION

Luis Arturo Gil \*  
Blanca Higuera \*  
Jaime Orrego \*

### RESUMEN

Las dos especies de Babesia fueron atenuadas por Irradiación gama (30 Krads) e inoculadas a dosis de  $5 \times 10^8$  parásitos, a dos grupos de terneros. Una leve y transitoria parasitemia junto con un descenso del hematocrito, además de una respuesta antigénica contra las dos babesias fueron inducidas. 70 días después, uno de los grupos vacunados y un nuevo grupo control fueron desafiliados con una dosis de  $1 \times 10^8$  parásitos homólogos. Los animales del grupo control sufrieron un descenso de -33% en su hematocrito y un rápido ascenso en la parasitemia, lo que causó la muerte a uno de estos animales; los demás fueron tratados quimioterapéuticamente. Los animales pertenecientes al grupo vacunado no mostraron ningún signo de infección. Los 3 anteriores grupos más un nuevo grupo control (IV) nunca antes expuesto al parásito, fueron llevados a una área endémica el día 192 del experimento. El hematocrito para los dos grupos control fue inferior ( $P < 0.5$ ) hacia el día 292. Aunque ningún animal presentaba parasitemia, los títulos de anticuerpos contra ambas babesias excepto para el grupo IV persistieron. El día 296 todos los animales fueron artificialmente desafiliados con una dosis de  $1 \times 10^8$  parásitos, lo cual resultó en la muerte de 3

de los animales del grupo IV, que ocurrió con una alta parasitemia y un abrupto descenso de -39% del hematocrito; los otros 3 grupos no mostraron parasitemia ni cambios en el hematocrito y respondieron con un aumento en el título de anticuerpos contra ambas babesias.

Este experimento revela la inocuidad y la potencia de esta vacuna bivalente, así como su prolongado efecto protector.

### REVISION BIBLIOGRAFICA

La posibilidad de producir vacunas contra los hemoparásitos del bovino ha sido estudiada por varios años y diversos grupos de investigadores. La hipótesis predominante ha sido que las vacunas muertas originadas en preparaciones crudas tales como eritrocitos infectados o parásitos parcialmente purificados no confieren una inmunidad protectora (1,2,3,4) así mismo los antígenos solubles aislados de cultivos o fracciones de sangre infectada parecen haber sido descartados como potenciales vacunas.

Hasta el momento es una incógnita si por ingeniería genética o por síntesis peptídica directa podrían obtenerse vacunas contra los hemoparásitos del bovino. Investigadores Australianos (5,6,7) han aislado 3 moléculas antigénicas de *B. bovis* una de las cuales presenta reacción cruzada contra *B. bigemina*. La molécula de menor peso molecular es antigenicamente protectora

---

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia e Instituto de Asuntos Nucleares. Con el auspicio de la Agencia Internacional de la Energía Atómica, Viena, Austria.

contra la cepa homóloga. Por el momento se desconoce la secuencia de sus aminoácidos o si contiene un epitopo de máxima antigenicidad. Estos trabajos prosiguen en dirección a la síntesis por ingeniería genética (Wright, comunicación personal), como medio de obtener suficiente material para probar en campo.

La atenuación de la *B. Divergens*, por irradiación gama, ha sido reportada por Purnell (8) así como su potencial uso profiláctico. El mismo método de atenuación fue estudiado por Wright et al. para *B. bovis* (9) quienes además de demostrar la eficacia de tal vacuna, descubrieron la pérdida de una estearasa del parásito, la cual es necesaria para la transmisión transovárica a través de *B. microplus* (10), eliminando así el peligro de diseminación de la infección, que potencialmente entrañan las vacunas vivas replicativas, como la desarrollada por estos investigadores. Igualmente Bishop y Adams, lograron la atenuación de *B. bigemina* mediante el mismo tipo de irradiación gama (11).

## MATERIALES Y METODOS

### Parásitos:

Fueron obtenidos en sangre parasitada de un caso de babesiosis. Se mantuvo como estabilizados de 1 ml en nitrógeno líquido, criopreservados con Dimetilsulfoxido, por varios años. Estos estabilizados fueron multiplicados en terneros esplenectomizados cuya sangre sirvió como fuente de la vacuna y de inoculo para los desafíos.

### Animales:

Se usaron 15 terneros Holstein Intactos de aproximadamente un año de edad, cuya seronegatividad había sido demostrada previamente por inmunofluorescencia indirecta (IFA). Los animales fueron divididos en 4 grupos de: 4, 3, 3 y 5 animales respectivamente.

### Irradiación de los parásitos:

Cuando la parasitemia del animal esplenectomizado llegó a 0.2% para *Babesia bovis* y 15% para *Babesia bigemina*, se

tomaron 500 ml de sangre y se sometieron a 30 Krads de radiación gama, provenientes de una fuente de  $\text{Co}^{60}$ , a una tasa de 1 Krad por minuto. Un volumen igual de sangre no irradiada fue preservado (estabilizado 2) en nitrógeno líquido.

### Regimen de Inoculaciones:

El día cero, cada animal perteneciente a los grupos I y III fué inoculado con  $5 \times 10^8$  parásitos irradiados. El día 70 cada animal del grupo I y II fué inoculado intravenosamente con  $1 \times 10^8$  parásitos homólogos procedentes del estabilizado 2. El día 92, los 4 grupos fueron introducidos en un área infestada de garrapatas, y transferidos a una nueva área de mayor infestación, el día 287. El día 296 todos los animales fueron desafiados intravenosamente con  $1 \times 10^8$  parásitos homólogos provenientes del estabilizado 2.

### Parámetros:

A intervalos irregulares suero sanguíneo de cada animal fue evaluado en cuanto a título de anticuerpos contra *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (12) por IFA (GII 1984) y anticuerpos contra *B. bovis* (13) por radioinmunoanálisis (RIA) (Kahal et al. 1982). En capilares heparinizados se recogió sangre para determinación del hematocrito por centrifugación y para extendidos, que coloreados por Giemsa y/o naranja de acridina, sirvieron para determinar el porcentaje de eritrocitos parasitados (parasitemia). El valor neto del hematocrito se graficó directamente. El % de descenso tomado como 100% el valor inicial, antes de inocular al animal, se expresó como una cifra negativa.

Las temperaturas rectales fueron determinadas el mismo día con termómetro clínico. El nivel de significancia para diferencias durante períodos críticos fue establecido mediante pruebas de T.

## RESULTADOS

Los datos del período comprendido entre el día 93 y 192 se perdieron accidentalmente.

#### **Parasitemia:**

Para el grupo I aumentó a partir del día cero hasta un máximo de 0.2% el día 21; después del día 30 la parasitemia no fue detectable, aún con posterioridad al desafío aplicado el día 70 (Figura 1). Para el grupo II la parasitemia comenzó a detectarse el día 70 y llegó a un máximo de 0.4% el día 80, haciéndose indetectable después del día 98; uno de estos animales murió el día 76 y los 2 restantes fueron salvados por tratamiento con Ganaseg, (figura 2). Para el grupo III los parásitos fueron detectables el día 9, llegaron al máximo de 0.64% el día 19 y se hicieron indetectables después del día 30 (figura 3).

Para el grupo IV, la parasitemia llegó a 0.17% el día 298 y se hizo indetectable después del día 318; 3 de estos animales murieron hacia el día 305 y los restantes 2 fueron tratados (figura 4).

#### **Temperatura:**

Debido a la poca frecuencia con que se tomó y el método para atrapar y sujetar los animales, ésta no guardó relación con la parasitemia y en consecuencia no tuvo valor interpretativo.

#### **Hematocrito:**

Las figuras 1-4 muestran las fluctuaciones que ocurrieron durante los 386 días del experimento. Los grupos I y III inoculados con parásitos irradiados, exhibieron un descenso en hematocrito del día cero al día 20 cuando fue de -23% para el grupo III y el día 34 cuando fue de -16% para el grupo I; diferencias éstas significativas ( $P<.01$ ,  $P<.05$ ) comparadas con los grupos II y IV, que fueron los respectivos controles.

Como consecuencia del desafío del día 70, el hematocrito del control grupo II, descendió -33%, diferencia altamente significativa en relación con los demás grupos, a la vez que los hematocritos para los grupos I y III no difirieron significativamente de los valores para el grupo IV (control no inoculado). Durante el período en el campo los hematocritos de los 4 grupos fluctuaron entre -20% y -5% aproximadamente, debido a la posibilidad de una baja

infestación de garrapatas y un bajo nivel nutricional. Sin embargo los grupos vacunados, I y III promediaron un descenso menos marcado ( $P<.05$ ) hacia el día 292 comparados con los grupos II y IV.

Después del desafío el día 296, los hematocritos del grupo IV y el II, descendieron rápidamente. El grupo IV llegó a un descenso máximo de -37% el día 316, que difirió del grupo II ( $P<.05$ ) y del grupo I y II ( $<.01$ ). El grupo II llegó a un máximo descenso de -28% el día 320 que difirió ( $P<.05$ ) de los grupos I y III; los cuales no mostraron diferencias significativas entre sí.

El grupo III tuvo un descenso máximo de -28% el día 338, lo que constituyó una diferencia significativa ( $P<.05$ ) con el grupo I.

#### **Anticuerpos:**

Los grupos I y III mostraron un incremento en el título de anticuerpos contra *B. bovis* y *B. bigémina*, concomitante con la aparición de parasitemia. Los mismos grupos mostraron una respuesta anamnética a *B. bigémina* hacia el día 320 como respuesta al desafío.

El grupo II tuvo títulos muy bajos contra *B. Bigémina* del día 80 (después del primer desafío) al día 320 cuando ocurrió un rápido aumento que llegó al máximo título el día 340, como consecuencia del 2º desafío.

Como era de esperarse el grupo IV no tuvo anticuerpos hasta el día 300, después de ser inoculado y llegó al máximo hacia el día 340.

#### **DISCUSION**

Las babesias irradiadas fueron inocuas para los animales del grupo I al ser inoculadas a dosis letal, como se reveló por el estado normal de los animales y por comparación con los animales del grupo II los cuales necesitaron una masiva terapia, a pesar de la cual uno falleció.

Estos hallazgos coinciden con los reportados por investigadores ingleses (Purnell et al 1978) y australianos (Wright et al 1982-83), y han sido recientemente corroborados por

**FIG. I** GRUPO I (4 terneros) vacunados y desafinados en la primera etapa.

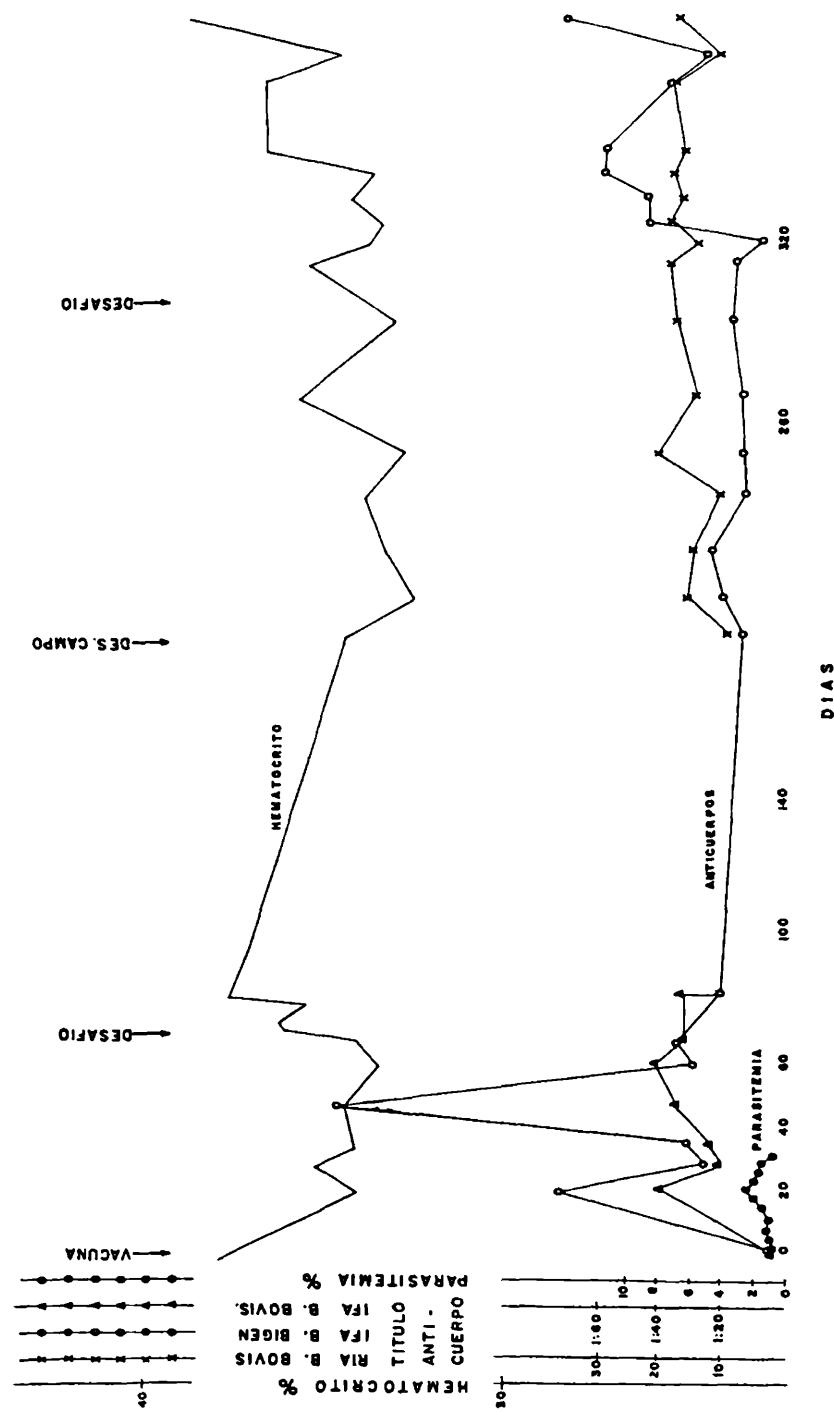
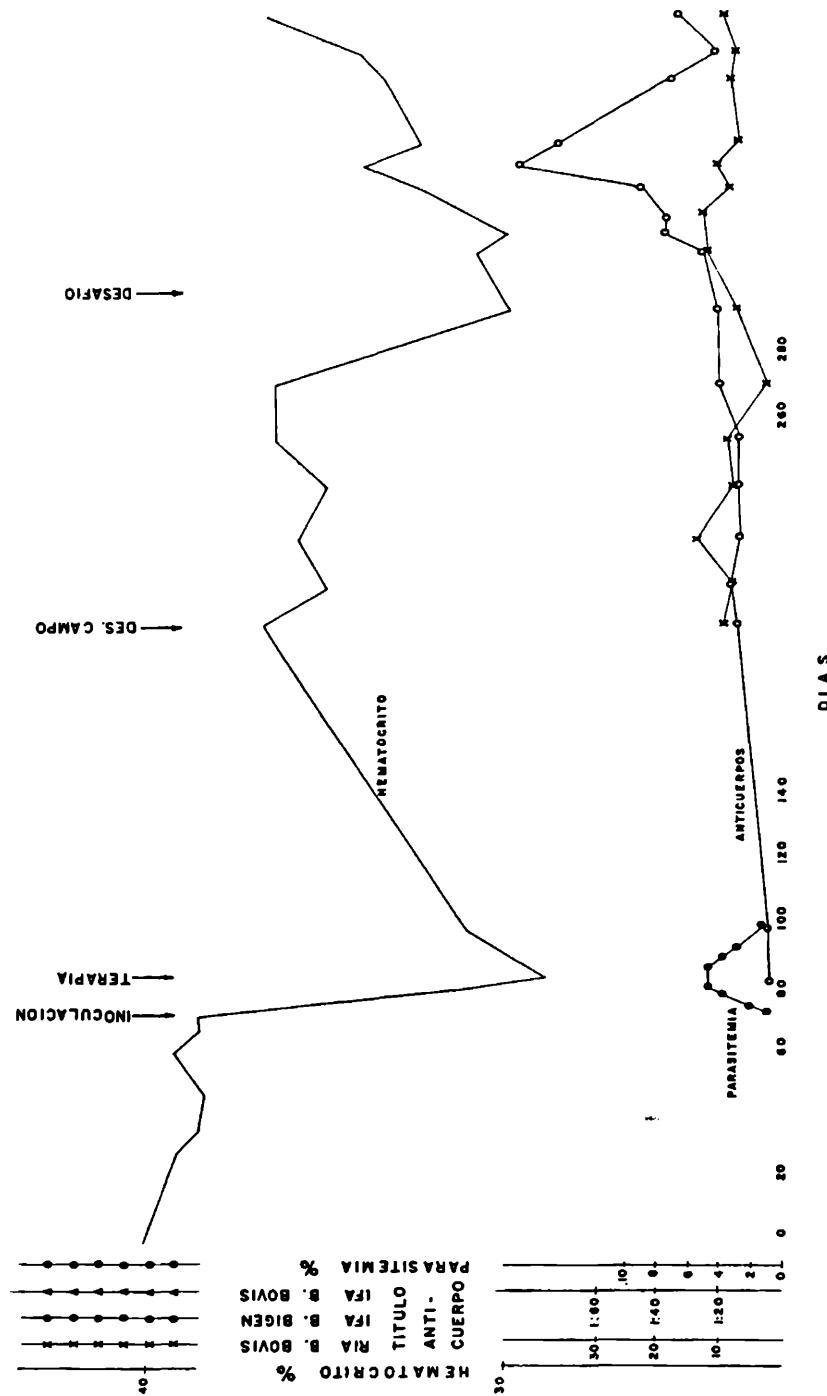


FIG. 2 GRUPO 2 (3 Terneros) Central, no vacunados.



Orrego (Tesis, Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia, U. Nal., 1986) en un trabajo auspiciado por el ICA.

Aunque no se revelaron parasitemias, mediante frotis de sangre teñidos con Giemsa, durante la exposición a bajas infestaciones de garrapatas en el campo, si se detectó una diferencia en resistencia evidenciada por los cambios de hematocrito entre los animales vacunados (grupos I y III) y los no vacunados (grupos II y IV), a pesar de que el grupo II había sido premunizado mediante el desafío del día 70.

El inferior título de anticuerpos del grupo II, puede atribuirse al corto tiempo de infección, mientras que la ausencia de anticuerpos en el grupo IV se debió a que nunca antes habían sido expuestos a los parásitos.

Los animales de este último grupo fueron altamente susceptibles al desafío, causando la muerte a 3 de ellos, los restantes 2 se salvaron sólo mediante quimioterapia masiva.

Estas observaciones son ejemplo de la imposibilidad del bovino para adquirir resistencia contra las babesias por infección natural cuando el nivel o la duración de la misma es sub-óptima.

El grupo III, que fue vacunado pero desafiado una sola vez, mostró tan buen grado de protección como el grupo I, vacunado y desafiado dos veces, revelándose que la inmunidad conferida por ambas especies irradiadas es de prolongada duración.

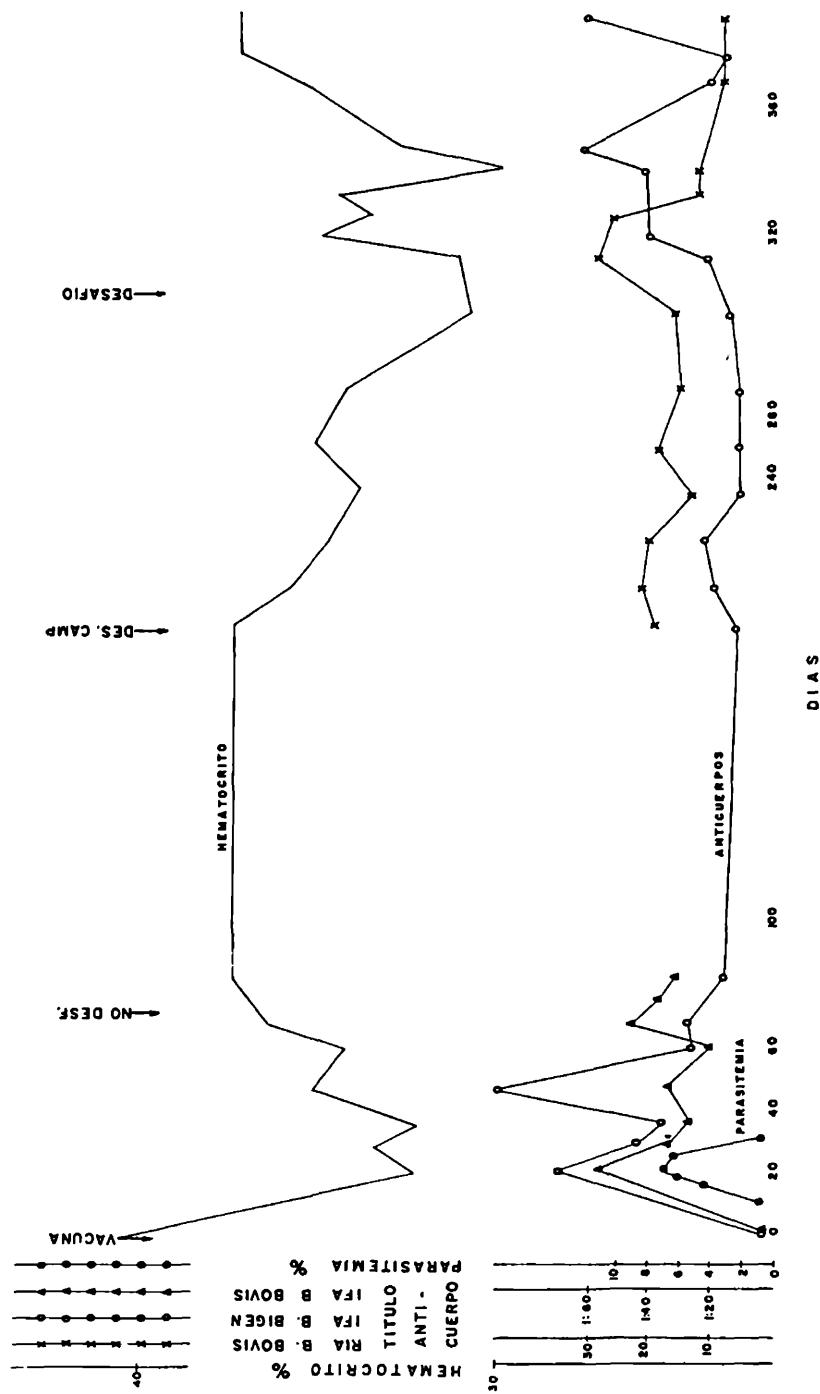
Aunque no se realizaron contejos diferenciales para las dos especies de babesias irradiadas o usadas como desafío, los títulos de anticuerpos llegaron a valores igualmente altos y fueron protectivos contra las dos especies. Tal hecho indica la presencia de los dos organismos, y la difícil observación que de *B. bovis* puede hacerse por frotis teñidos, ya que por lo común este parásito se adosa a los capilares cerebrales, haciéndose poco visible en sangre.

Mientras no se demuestre la posibilidad de crear una vacuna constituida por una proteína reproducida por síntesis o ingeniería genética, o alguno de sus epítopos, la mejor opción profiláctica contra la babesiosis continúa siendo la vacunación con organismos atenuados por irradiación, como se ha demostrado con el presente trabajo. Este además aporta prueba de que las dos Babesias pueden ser atenuadas en el mismo inoculo permitiendo la producción de una vacuna dívalente.

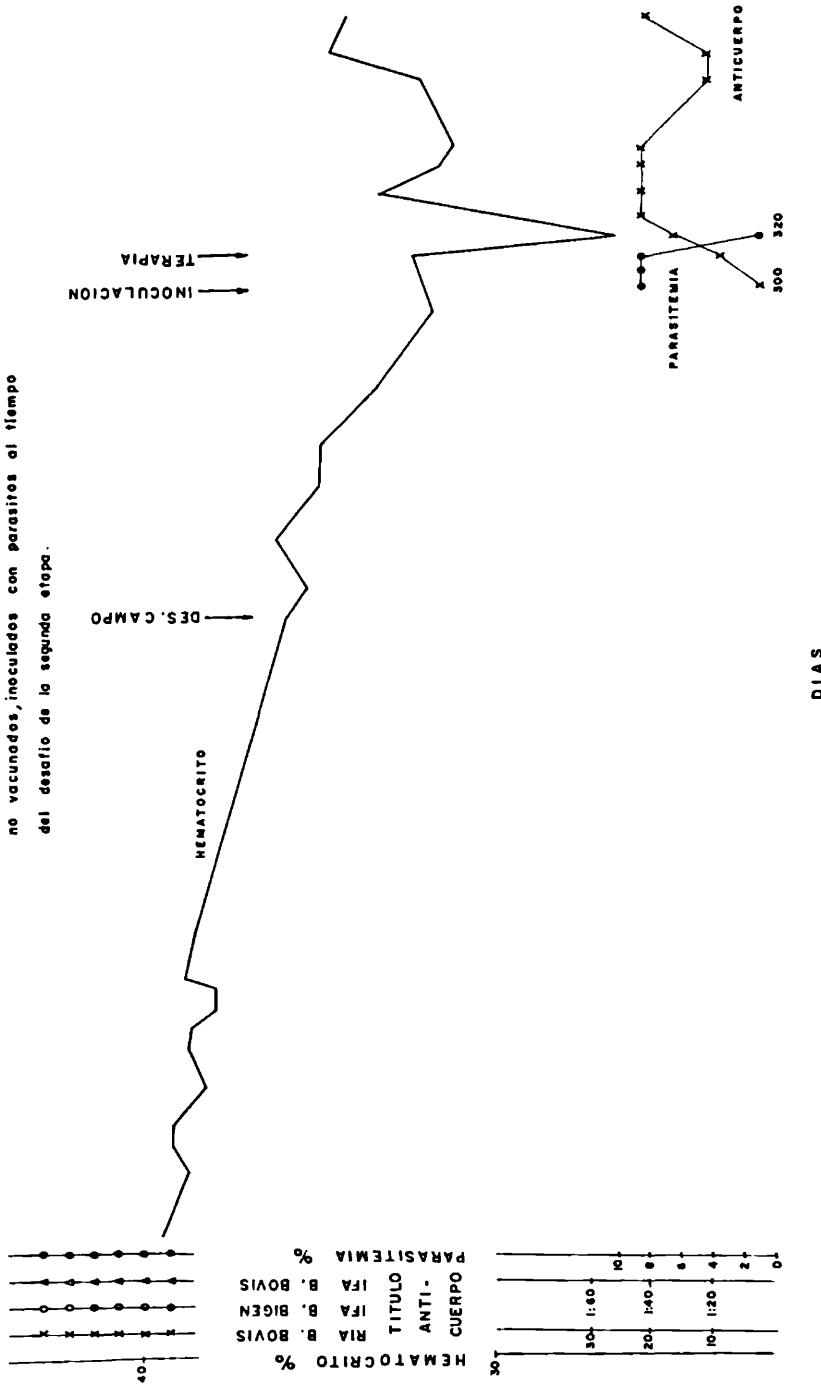
De momento, el desarrollo técnico más urgente necesario para hacer viable la producción y utilización masiva de esta vacuna, es el de métodos de preservación que extiendan la vida útil de la vacuna desde su producción hasta el momento de su uso en el campo.

Los organismos estatales y las agrupaciones privadas deberían prestar su apoyo a tales estudios, ya que los beneficios que de ellos se deriven serían de impacto socio económico mundial y en particular para el país.

**FIG. 3 GRUPO 3. (3 terneros) vacunados, no deslillados en la 1<sup>a</sup> etapa.**



**FIG. 4. GRUPO 4 (5 terneros) Control para la fase de campo, no vacunados, inyectados con parásitos al tiempo del desarrollo de la segunda etapa.**



## REFERENCIAS

1. RISTIC M. The Illinois Veterinarian, Vol. II, 7 (1968).
2. FERNANDEZ L. and LORA C.A., Agricultural Research Service Bulletin. Ministerio de Agricultura. Lima, Perú, 1-16 (1966).
3. RISTIC M., D.K. MANN and R. KODRAS. Am. J. Vet. Res., 24, 472 (1963).
4. ZARAZA H., K.L. KUTTLER. Rev. ICA, Vol. III, 323 (1968).
5. MOHONEY B.V., I. G. WRIGHT and B.V. GOODGER. Preventive Veterinary Med. 2, 401 (1984).
6. GOODGER B.V., I. G. WRIGHT, and D.J. WALSTIS-BUHL. Z. Parasitenkunde, 69, 473 (1983).
7. WRIGHT I.G. M. WHITE P. D. TRACEY-PATTE, R.A. DONALDSON. B.V. GOODGER. D.J. WALSTISBUHT and D.F. MAHONEY Infection and Immunity 41, 244 (1983).
8. PURNELL R. E., D. LEWIS, A. BRABAZON, L.M.A. FRANCIS, y E. R. YOUNG. Vet. Record, 108, 28 (1981).
9. WRIGHT I.G., D.F. MAHONEY, G.B. MIRRE, B.V. GOODGER and J.D. KERR. Vet. Immunology and Immunopathology, 3, 591. (1982).
10. WRIGHT I.G., G.B. MIRRE, D.F. MAHONEY and B.V. GOODGER. Res. Vet. Sc. 34, 124 (1983).
11. BISHOP J. P. y L. G. ADAMS Exp. Parasit. 35, 35 (1974).
12. GIL, A. Revista Analac, 52, 19(1984)
13. KAHAL L.P., R.F. ANDERS, L.L. CALLOW, B. J. RODWELL y G.F. MITCHELL International Journal of Parasitology, 12, 103(1982).

