

TD-EP

H-6
4
12

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

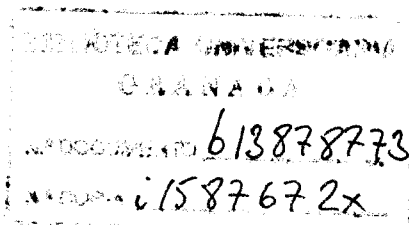
FACULTAD DE FARMACIA

AISLAMIENTO Y CULTIVO *IN VITRO* DE *THEILERIA ANNULATA* Y SU
 EMPLEO EN ENSAYOS DE INMUNIZACION DEL GANADO VACUNO

Javier Viseras Alarcón

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1994



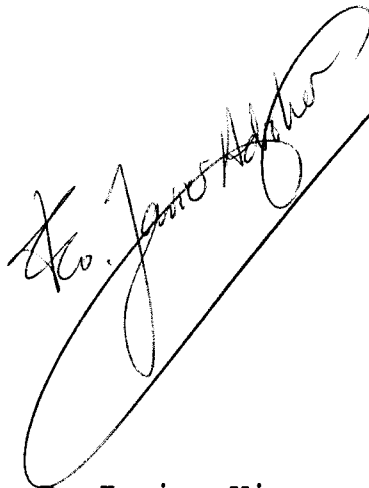
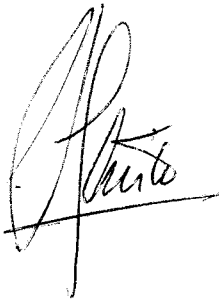
M 20 - 2 - 18

"AISLAMIENTO Y CULTIVO IN VITRO DE THEILERIA ANNULATA Y SU EMPLEO EN ENSAYOS DE INMUNIZACION DEL GANADO VACUNO"

DIRECTORES:

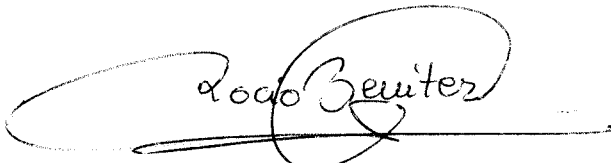
Dr. PEDRO GARCIA FERNANDEZ

Dr. F^{CO} JAVIER ADROHER AUROUX

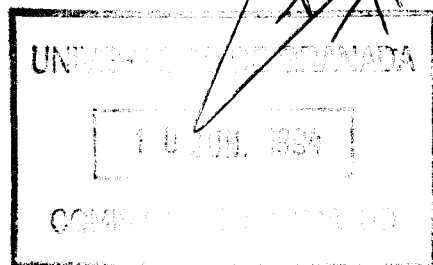


Memoria que presenta el licenciado D. Javier Viseras Alarcón para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia.

Visto Bueno del Tutor:

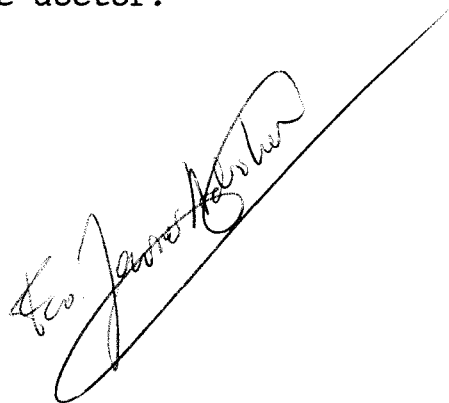


Prof. Dra. Rocio Benítez Rodríguez



Dr. PEDRO GARCIA FERNANDEZ, Investigador Colaborador del Centro de Investigación y Desarrollo Agrario de Granada y Dr. F^{CO} JAVIER ADROHER AUROUX, profesor titular del Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada, como directores de la Tesis Doctoral,

CERTIFICAN: que la Tesis Doctoral titulada "AISLAMIENTO Y CULTIVO IN VITRO DE THEILERIA ANNULATA Y SU EMPLEO EN ENSAYOS DE INMUNIZACION DEL GANADO VACUNO" de la que es autor el Licenciado en Farmacia D. Javier Viseras Alarcón, cumple todos los requisitos legales, y por ello AUTORIZAN su presentación para optar al grado de doctor.



En Granada a de Julio de 1994.

Fdo. Dr. Pedro García Fernández Dr. F^{CO}. Javier Adroher Auroux

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Producción Animal del Centro de Investigación y Desarrollo Agrario de Granada (Junta de Andalucía) y



en el Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada.



Agradecimientos

Quiero mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones cuya contribución más o menos directa ha permitido la realización de este trabajo:

En primer lugar a los Dres. P. García Fernández y F.J. Adroher Auroux. Su grado de compromiso en este trabajo ha ido mucho más allá del estricto papel de directores; sus propias ideas y su propio esfuerzo personal han quedado plasmados en esta memoria. A ellos debo, además, el haberme introducido en este apasionante campo del saber.

Al Dr. L.E. Hueli, por poner a mi disposición sus conocimientos en la compleja disciplina de la taxonomía de los ixódidos.

A los Dres. E. Pipano (Kimron Veterinary Institute, Israel) y B. Shiels (Universidad de Edimburgo, Escocia), quienes, además de ceder amablemente las líneas celulares bovinas P-179 y BL-20 respectivamente, han puesto a disposición de esta investigación, su experiencia en la materia, aportando valiosísimos consejos.

Al Sr. Librado Carrasco, que siempre estuvo dispuesto para contribuir con su vasta experiencia y su colaboración como veterinario.

Al Sr. P.M. Arrones, imprescindible ayuda en la localización de algunos de los casos clínicos de mayor transcendencia para este trabajo.

Al Sr. P. Ballesteros, Director Técnico de la Granja Experimental Ganadera de la Diputación de Granada, por su colaboración, y muy especialmente por su excelente trabajo como cirujano en la esplenectomía de los terneros.

Agradecimientos

Al Sr. A. Rodríguez, quien ha colaborado en este trabajo más como un amigo que como un compañero.

A J. Fernández Benítez y Paco Torres por su inestimable ayuda en la obtención de algunas fotografías que aparecen en este trabajo.

A I. Martín Bravo, por su permanente colaboración en las tareas de laboratorio y al resto de mis compañeros del C.I.D.A. de Granada, en quienes he tenido un estímulo constante a lo largo de estos años.

A mis también compañeros del Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada, en quienes siempre he encontrado ánimo e interés por mi trabajo, y muy especialmente Joaquín, Paqui y Carmen, quienes además me instruyeron en algunas de las técnicas que he utilizado.

A D. Francisco Pérez Román, propietario de la explotación ganadera en la que se ha realizado la experiencia de vacunación de campo, así como a sus empleados Gámez y Francisco, por su ayuda en el siempre complicado manejo del ganado.

A Mari Carmen, no hay palabras para describir mi agradecimiento por su permanente e incondicional estímulo y por tantas horas de trabajo compartidas.

A mi familia, en quienes he encontrado ánimo en todo momento y especialmente a mis hermanos Esther y César cuya experiencia como personas también dedicadas a la investigación no he dudado en aprovechar.

A la Excelentísima Diputación Provincial de Granada por poner a nuestra disposición sus instalaciones ganaderas.

Agradecimientos

También quiero mostrar mi gratitud a la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía por concederme una Beca de Formación de Personal Investigador y a la CICYT por el proyecto GAN 90/0707 en cuyo seno se ha desarrollado este trabajo.

Finalmente, mi agradecimiento para la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, a uno de cuyos Centros de Investigación y Desarrollo he estado adscrito durante estos años.

OBJETIVOS

Objetivos

- 1.- Aislar cepas españolas de *Theileria annulata* en ganado vacuno.
- 2.- Identificar las garrapatas vectoras de la theileriosis mediterránea en España.
- 3.- Preparar una técnica de diagnóstico inmunológico de la theileriosis mediterránea en España, para su utilización en estudios epidemiológicos en sanidad animal.
- 4.- Obtener en laboratorio cultivos celulares de cepas españolas de *T. annulata* por aislamiento a partir de animales infectados.
- 5.- Obtener una vacuna frente a la theileriosis mediterránea para ser usada en nuestro país.

INDICE

OBJETIVOS.....	2
INTRODUCCION.....	7
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	8
1.- ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA Y LOCALIZACION DE ZONAS ENDEMICAS.....	9
1.1.- Encuesta mediante cuestionario.....	9
1.2.- Muestreo sobre garrapatas.....	9
1.3.- Muestreo serológico para seroprevalencia	11
2.- IDENTIFICACION DEL VECTOR DE LA ENFERMEDAD....	14
3.- INFECCION EXPERIMENTAL.....	16
3.1.- Por alimentación de garrapatas.....	16
3.2.- Por inoculación de sangre infectada por <i>Theileria</i>	19
4.- AISLAMIENTO DE <i>THEILERIA ANNULATA IN VITRO</i>	21
5.- CARACTERIZACION DE LA CEPA DE <i>T. ANNULATA</i>	24
6.- METODOLOGIA DE OBTENCION DE UNA VACUNA CONTRA <i>THEILERIA</i>	27
6.1.- Inoculación de sangre de animales infectados.....	27
6.2.- Inmunización por infección y tratamiento.....	30
6.3.- Inmunización con cultivos celulares de virulencia atenuada.....	35

MATERIAL Y METODOS.....	44
1.- ENCUESTAS EPIDEMIOLOGICAS Y LOCALIZACION DE ZONAS ENDEMICAS.....	45
1.1- Encuestas a las inspecciones comarcales veterinarias (ICV) de Andalucía.....	45
1.2.- Explotaciones Pecuarias.....	52
2.- IDENTIFICACION DEL VECTOR DE LA THEILERIOSIS MEDITERRANEA EN ANDALUCIA.....	52
2.1.- Implantación de Hyalomma lusitanicum como vector de la theileriosis mediterránea en España.....	53
2.1.1.- Comprobacion de la negatividad del animal.....	53
2.1.2.- Esplenectomía.....	54
2.1.3.- Recogida en el campo del presunto vector y su preparación.....	55
2.1.4.- Alimentación de las garrapatas sobre el animal susceptible..	56
2.1.5.- Seguimiento del proceso de infección.....	56
3.- AISLAMIENTO DE <i>T. ANNULATA IN VIVO</i>	58
3.1.- Infeccion experimental por inoculación de sangre de animales infectados.....	58
3.1.1.- Material infectivo.....	58
3.1.2.- Animales susceptibles.....	58

Indice

3.2.- Infección experimental por picadura de garrapatas infectadas.....	61
4.- AISLAMIENTO DE <i>T. ANNULATA IN VITRO</i>	61
4.1.- A partir de sangre.....	61
4.1.1.- Método de aislamiento.....	62
4.2.- A partir de ganglio linfático.....	65
4.3.- Mantenimiento en cultivo de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de <i>T. annulata</i>	70
5.- IDENTIFICACION DEL PARASITO AISLADO.....	75
5.1.- Microscopía óptica.....	75
5.2.- Inmunofluorescencia Indirecta.....	76
6.- PRUEBA DE DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (I.F.I.).....	78
6.1.- Preparación del antígeno.....	78
6.2.- Preparación de suero control positivo.	79
6.3.- Preparación de suero control negativo.	80
6.4.- Ejecución de la prueba d diagnóstico..	80
7.- CARACTERIZACION DE LA CEPA AISLADA.....	82
7.1- Electroforesis de isoenzimas.....	83
7.1.1.- Preparación de la muestra.....	83
7.1.2.- Método y técnicas de estudio Electroforesis en gel de almidón..	85
7.1.2.1.- Etapas en la realizacion de la electroforesis.....	85
7.1.2.2.- Preparación de los extractos proteicos.....	86

7.1.2.4.- Preparación de las soluciones tampón y de los geles.....	86
Electroforesis.....	88
Introducción de los extractos en los geles.....	89
Migración electroforética....	89
Revelado enzimático.....	90
8.- DESARROLLO DE UNA VACUNA FRENTE A <i>T. ANNULATA</i> .	93
8.1.- Aislamiento del parásito.....	93
8.2.- Atenuación de la virulencia.....	93
8.2.1. Control del grado de atenuación.	94
8.3.- Comprobación de la seguridad y potencia.....	95
8.3.1. Efectividad de la vacuna frente al "Challenge".....	95
8.4.- Preparación de la vacuna y almacenado.	96
8.4.1.- Vacuna líquida.....	96
8.4.2.- Vacuna criopreservada.....	97
8.4.3.- Ensayo de viabilidad.....	98
9. EXPERIENCIA DE VACUNACION EN EL CAMPO.....	99
9.1.- Selección de la granja.....	99
9.2.- Selección de las reses y establecimiento de lotes.....	100
9.3.- Vacunación de los animales.....	101
9.4.- Seguimiento de la respuesta a la inmunización.....	102

RESULTADOS.....	104
1.- EPIDEMIOLOGIA.....	105
1.1.- Cuestionarios.....	105
1.2.- Seroprevalencia en explotaciones precuarias de zona endémica.....	106
2. CONTRIBUCION A LA IDENTIFICACION DEL VECTOR DE LA THEILERIOSIS TROPICAL EN ANDALUCIA...	107
3.- INFECCION EXPERIMENTAL DE TERNEROS SUSCEPTIBLES POR INOCULACION DE SANGRE.....	109
3.1.- Aislamiento en el ternero nº 97.....	109
3.2.- Aislamiento en los terneros nº 104 y nº 111.....	109
4.- AISLAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO EN CULTIVO IN VITRO DE LINEAS CELULARES INFECTADAS CON <i>T. ANNULATA</i>	110
4.1.- A partir de sangre.....	110
4.2.- A partir de ganglios linfáticos.....	111
5.- IDENTIFICACION DE LOS PARASITOS AISLADOS....	111
5.1.- Por tinción con Giemsa.....	111
5.2.- Por prueba serológica.....	111
6.- DESARROLLO DE LA TECNICA DE DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO I.F.I. EMPLEANDO REACTIVOS PROCEDENTES DE CEPAS ESPAÑOLAS DE <i>T. ANNULATA</i>	112

7.- CARACTERIZACION ISOENZIMATICA DE NUESTRO AISLADO DE <i>T. ANNULATA</i>	113
8.- OBTENCION DE VACUNA FRENTE A <i>T. ANNULATA</i> PROCEDENTE DE ESPAÑA.....	113
8.1.- Obtención del cultivo.....	114
8.2.- Consecución de la atenuación.....	114
8.3.- Prueba de la potencia de la vacuna....	114
8.4.- Prueba de viabilidad de la vacuna.....	117
8.4.1.- Vacuna fresca.....	117
8.4.2.- Vacuna congelada.....	118
9.- ENSAYO DE INMUNIZACION EN CONDICIONES DE CAMPO.....	119
9.1.- Modo de conservación de la vacuna.....	119
9.2.- Efecto de la dosis.....	120
9.3.- Influencia de la edad.....	121
DISCUSION	168
1.- EPIDEMIOLOGIA.....	169
2.- AISLAMIENTO.....	172
3.- PRUEBA DE DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (I.F.I.).....	176
4.- ELECTROFORESIS.....	180
5.- VACUNA.....	182

Indice

CONCLUSIONES.....	191
GLOSARIO DE TERMINOS.....	194
BIBLIOGRAFIA.....	196

INTRODUCCION

Theileria annulata es un protozoo parásito del ganado bovino que se transmite por picadura de garrapatas. En uno de los estadios de su ciclo de vida se presenta en formas intraeritrocíticas, que fueron encontradas por primera vez en ganado procedente de Transcaucasia, en la antigua Unión Soviética (Dschunkowsky y Luhs, 1904). Se observó una semejanza entre este parásito y *Piroplasma parvum* (= *T. parva*), previamente descrito por Koch (1898) en el este de Africa, si bien los protozoos de Transcaucasia eran en su mayor parte redondeados mientras que *P. parvum* presentaba forma de varilla, por los que fueron denominados *P. annulatum*.

Al ser inoculado por la garrapata, el parásito invade células del sistema linfático del bovino, donde se desarrolla como esquizontes. Estos ya habían sido observados con anterioridad, tanto en ganado de Transcaucasia como en el del este de Africa, pero la relación entre las formas intraeritrocíticas y los esquizontes no fue establecida hasta 1910 por Gonder. Este descubrimiento condujo a la reclasificación de este organismo a un nuevo género denominado *Theileria* (Wenyon, 1926).

En la clasificación de los protozoos parásitos de animales domésticos (Levine y col., 1980) el parásito objeto de esta investigación queda clasificado de la siguiente forma:

Subreino	Protozoa
Phylum	Apicomplexa
Clase	Sporozoea
Orden	Piroplasmida
Familia	Theileriidae
Genero	<i>Theileria</i>
Especie	<i>Theileria annulata</i>

T. annulata se transmite por garrapatas del género *Hyalomma* (Neitz, 1957; Robinson, 1982; Irvin, 1987) y da lugar a una parasitosis del ganado bovino conocida como theileriosis tropical o mediterránea.

El desarrollo del parásito dentro del hospedador vertebrado comienza por una fase linfocítica, en la que las formas inoculadas por el vector invaden células linfoides y, por división asexual, forman en un plazo de 5 a 8 días los esquizontes, antes conocidos como cuerpos azules de Koch, que se localizan primeramente en los ganglios linfáticos próximos a la zona de inoculación.

El desarrollo de las formas parásitas conduce a otras modificaciones en la célula hospedadora, de forma que ésta se desdiferencia a célula linfoblastoide, produciéndose una división sincrónica de parásito y célula hospedadora (Stagg y col., 1980).

Según Hulliger y col. (1964) se produce una tracción del huso de la célula en división y, como consecuencia, la rotura del esquizonte; de esta forma en cada célula hija una parte del esquizonte liberado por rotura de la membrana del esquizonte inicial.

Posteriormente la fase linfoproliferativa evoluciona hacia la aparición de merozoítos, por medio de una merogonia que provoca finalmente la rotura de la célula linfoblastoide, pasando los merozoítos a invadir a los eritrocitos, en los cuales tienen la capacidad de dividirse asexualmente y producir hemolisis.

Todo el proceso de evolución del parásito da lugar a un cuadro en el hospedador vertebrado cuyos rasgos más destacados son una hipertermia que va de 40 a 42 °C y ganglios superficiales hipertrofiados en particular los preescapulares y precurales (Ouhelli, 1985). Según Wagner y col. (1974) se produce también una linfocitosis que es desencadenante de edema pulmonar. Además hay una fuerte anemia, con caída del hematocrito hasta el 12% y una hiperbilirrubinemia que conduce a ictericia.

En los casos graves, como consecuencia de la anemia y de las lesiones producidas en el pulmón, fundamentalmente, aparece taquicardia y disnea (taquipnea), que, a medida que avanza el proceso, se hacen más acusadas, sobreviniendo un cuadro típico de choque, muriendo finalmente el animal por insuficiencia cardio-respiratoria (Navarrete y col., 1992).

En el mundo se encuentran en situación de riesgo de sufrir theileriosis por *T. annulata* aproximadamente 250 millones de cabezas de ganado doméstico (Tait y Hall, 1990) situadas en una franja que va desde el sur de Europa y norte de Africa a través de Oriente Medio y sur de la antigua Unión Soviética hasta la India y probablemente sur de China (Purnell, 1978).

Las pérdidas económicas que ocasiona la enfermedad son difíciles de calcular aunque se sabe que la incidencia en las zonas endémicas es alta y que la mortalidad conlleva graves pérdidas entre los animales exóticos y en los cruces. Además se producen pérdidas de productividad en animales que enferman pero que no sufren infección fatal. Se ha estimado que esta enfermedad junto con la producida por *T. parva* producen, anualmente, la muerte a unos 3 millones de cabezas de ganado (McHardy, 1991).

Introducción

Estas consideraciones nos llevan a dos aspectos principales:

1.- Existe la necesidad de tener datos más actuales y detallados sobre la incidencia, mortalidad y pérdidas de producción debidas a la theileriosis tropical.

2.- Se trata de una enfermedad grave y por tanto se debe considerar la necesidad de mejorar las medidas de control (Tait y Hall, 1990).

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

1. ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA Y LOCALIZACION DE ZONAS ENDEMICAS

1.1. ENCUESTA MEDIANTE CUESTIONARIO

García Fernández (1978) realiza un estudio a cerca de las piroplasmosis en Andalucía, basándose entre otras cosas, en un cuestionario enviado a los clínicos de las diferentes comarcas de la región. Resultados de este trabajo cristalizan en una publicación posterior sobre la distribución de las piroplasmosis en las diferentes comarcas de Andalucía (García Fernández y Romero Rodríguez, 1979).

Según este autor (García-Fernández, 1978) en ganado aparentemente sano de nuestra región, aparecen varias especies productoras de piroplasmosis, que por orden de importancia son *Theileria annulata* (19%), *Babesia bovis* (3,5%) y *B. bigemina* (0,7%). Su localización geográfica se sitúa predominantemente en las provincias de Cádiz y Sevilla, en donde se presenta de manera endémica, si bien aparecen brotes esporádicos en toda Andalucía.

Según Purnell (1978), *T. annulata* es la especie más frecuente en países del litoral norte Mediterráneo, presentándose de forma endémica en Turquía y España, y de forma epidémica en Grecia, la antigua Yugoslavia e Italia.

1.2. MUESTREO SOBRE GARRAPATAS

En 1984 García Fernández y Hueli realizan un muestreo en el que recogen un gran número de garrapatas (2.703) en la

provincia de Granada, correspondiendo el máximo de aparición de las mismas al mes de Junio.

Moll y col. (1981) por su parte llvararon a cabo un estudio epidemiológico en Narok (Kenia) en el que observan una correlación entre la aparición de formas esquizogónicas de *Theileria* en el ganado y la máxima actividad de las garrapatas en la zona, particularmente de *Rhipicephalus appendiculatus*.

Morzaria y col. (1981) realizaron un estudio para relacionar las especies de *Theileria* y sus garrapatas vectoras en el sur de Sudán. Para ello recogieron muestras de suero de ganado y garrapatas, procediendo a la identificación de las mismas y a los análisis serológicos. Observaron una alta prevalencia de *T. mutans*, lo que se asoció a la presencia de la garrapata *Amblyomma variegatum* y *A. lepidum*, mientras que la baja prevalencia de *T. annulata* se explicó por la presencia de *Hyalomma rufipes*, vector no eficiente para la transmisión del parásito, ya que no es frecuente que se alimente sobre el ganado vacuno. También encontraron *R. appendiculatus*, si bien las condiciones climáticas de algunas zonas no eran las idóneas para el desarrollo del ciclo de vida de este vector.

Young (1981) observa una distribución coincidente entre la aparición de casos por *T. parva* y la presencia de *R. appendiculatus*.

Morzaria y col. (1981) destacan la distribución de la garrapata *A. lepidum* por todo el norte de Sudán, asociándose a *T. mutans* en los estudios epidemiológicos.

Gautam (1981) lleva a cabo el registro de casos de theileriosis de algunas zonas de la India y llama la atención sobre la aparición de casos concentrados en la época de las lluvias y en el verano.

Por su parte, en nuestro ámbito geográfico más próximo, Hueli y col. (1982) realizan muestreos sobre garrapatas de interés ganadero en Andalucía.

Flach y Ouhelli (1992), en muestreos sobre 12 granjas de una zona endémica en Marruecos, destacan la presencia de adultos de *H. detritum detritum* entre los meses de Marzo a Octubre, con un máximo en su aparición al final del mes de Junio. Estos autores observan sobre el ganado la presencia de larvas y ninfas de esta garrapata sobre el ganado, desde el mes de Septiembre hasta el principio de Diciembre, con un máximo muy acentuado durante el mes de Octubre.

García Fernández y col. (1993) realizan un estudio sobre las garrapatas parásitas del toro de lidia en ganaderías españolas. Muestrtean durante los meses de Mayo y Junio un total de 187 reses en las que las especies de ixódidos presentes por orden de importancia han sido *H. lusitanicum*, *Rhipicephalus bursa*, *H. marginatum* y *R. pusillus*.

1.3. MUESTREO SEROLOGICO PARA SEROPREVALENCIA

El serodiagnóstico se ha revelado como un método útil para la identificación de las especies de *Theileria*, siendo el método de elección la inmunofluorescencia indirecta (I.F.I) (Young, 1981), ya que es la técnica más adecuada para la identificación de la especie de *Theileria* existente en una zona endémica a la theileriosis, incluso en el caso de coexistir varias especies (Chema y Brocklesby, 1981).

Otras pruebas serológicas que se han utilizado han sido la fijación de complemento (Schindler y Wokatch, 1965; Stepanova, 1968) así como la hemoaglutinación (Tutustin, 1969) y enzima inmuno ensayo como ELISA (Kachani y col. 1992).

Antecedentes bibliográficos

Los primeros trabajos en los que se usa el método de I.F.I. para *Theileria* se deben a Schindler y Wokatch (1965). Posteriormente, investigadores israelíes emplean también esta técnica (Pipano y Cahana, 1968 y 1969).

Transcurridos unos años se desarrolla la técnica de I.F.I. para el diagnóstico en *T. parva* (Burridge, 1971; Burridge y Kimber, 1972; Kimber y Burridge, 1973; Askarov, 1975).

Desde el desarrollo de las técnicas inmunoserológicas, han sido numerosos los autores que las han empleado para estudios epidemiológicos de la theileriosis bovina, hasta es punto de convertirse en el método de diagnóstico más ampliamente aplicado (Irvin y Morrison, 1987).

Moll y col. (1981) realizan encuestas serológicas en la región de Trans-Mara (Kenia), usando antígeno constituido por esquizontes y piroplasmas de *T. parva* y por piroplasmas de *T. mutans*, sobre animales de 6 meses de edad, hallando altos porcentajes de positividad, tanto frente a *T. parva* como a *T. mutans*. El 94% de estos terneros, tenían anticuerpos detectables frente al antígeno de esquizontes de *T. parva*, y el 80% frente al antígeno de piroplasmas de *T. parva*. En cuanto al antígeno de *T. mutans*, mostraron positividad el 98,9% de los terneros. Los mismos autores realizan encuestas a ganado de mayor edad, observando que la mayoría de las reses presentaban piroplasmas en sangre y anticuerpos frente a *T. parva* y *T. mutans*.

Morzaria y col. (1981) llevaron a cabo varios muestreos serológicos en el sur de Sudán. El primero se hizo sobre 31 reses procedentes de Uganda y que llevaban en Sudán unos 8 meses. Observaron que 16 reses (51,6%) fueron seropositivas frente a *T. parva* y 22 (70,9%) fueron seropositivas frente a

T. mutans. Tan solo un animal presentó anticuerpos frente a *T. annulata*.

Otro de los muestreos de Morzaria y col. (1981) fue realizado sobre 13 reses de un año y medio de edad, que habían nacido en la zona del estudio. Encontraron que 8 reses (61,5%) fueron positivas a *T. parva*, 5 (38,5%) eran positivas frente a *T. annulata* y todas eran positivas frente a *T. mutans*. Tan solo un animal mostró conjuntamente anticuerpos frente a *T. parva* y a *T. annulata*.

En una granja de vacas lecheras propiedad del gobierno keniano, los citados autores muestrearon 33 reses con edades comprendidas entre 1 mes y hasta vacas adultas. Observaron una positividad, mediante la técnica I.F.I., del 90,9% frente a *T. mutans*, del 12,1% para *T. parva* y del 6,06% para *T. annulata*. Una vez más, únicamente encontraron un animal con positividad frente a *T. parva* y a *T. annulata*.

Por último, estos autores muestrearon una zona donde se habían registrado de 50 a 60 reses muertas por una enfermedad desconocida y de la que se habían recuperado y sobrevivido otras 40 reses. Tomaron muestras de 25 de ellas además de otras 5 correspondientes a animales jóvenes que se encontraban enfermos, con una sintomatología caracterizada por anorexia, diarrea, ictericia y linfadenopatía. Los resultados del test serológico mostraron que el 100% de las reses tenían anticuerpos frente a *T. mutans*, el 83,3% frente a *T. parva* y el 40% frente a *T. annulata*. En este caso 10 animales mostraron tener anticuerpos tanto frente a *T. parva* como frente a *T. annulata*.

En la India, Bansal y col. (1987), emplean el test de I.F.I. y encuentran una seroprevalencia que oscila, según los casos, desde el 49% al 90% del ganado.

Ya en el ámbito de nuestro país, Juste Jordán y col. (1986) aportan trabajos epidemiológicos en los que se detecta *T. annulata*. Por su parte, Habela y col., en un trabajo reciente (1993) manifiestan que en España, la theileriosis tropical bovina es una enfermedad que se presenta sobre todo en el Sur, y lo hace con relativa frecuencia; sin embargo, no se dispone de cifras precisas sobre su prevalencia.

Para establecer la seroprevalencia, Brandau y Jiménez (1990) realizaron un estudio seroepidemiológico en Madrid encontrando una seropositividad del 90%. Sin embargo, se debe tener presente que estos autores únicamente muestrearon animales que presentaban sintomatología clínica típica de theileriosis.

Rol (1990) muestrea ganado frisón en el término municipal de Casar de Cáceres y obtiene, por la prueba de I.F.I., una positividad del 7,3%.

En el citado trabajo de Habela y col. (1993) se muestra un estudio seroepidemiológico sobre ganado frisón de la provincia de Granada. Para la técnica de I.F.I. estos investigadores emplearon como antígeno piroplasmas de una cepa de *T. annulata* procedente de Arabia Saudí, obteniendo una prevalencia del 13,71%, lo que les llevó a considerar a la provincia como zona hipoendémica inestable, con posibilidad de aparición de brotes clínicos de la enfermedad.

2. IDENTIFICACION DEL VECTOR DE LA ENFERMEDAD

El estudio de poblaciones de garrapatas existentes en un área se ha utilizado en numerosas ocasiones para dictaminar la presencia de determinada especie de *Theileria*. Sin embargo, según Young (1981), el procedimiento debe consistir en la

identificación de la garrapata vectora que hay en una región, después de identificar la especie de *Theileria* existente en una zona endémica.

En este sentido, se ha puesto de manifiesto que *R. appendiculatus* es el principal vector de *T. parva*, ya que la distribución de ambos coincide en el campo. Por otro lado, no se ha comprobado si otras especies de garrapatas transmiten *T. parva* dentro del área en que se encuentra *R. appendiculatus*.

Morzaria y col. (1981), llevaron a cabo un estudio para identificar varias especies de *Theileria* y sus respectivos vectores en el sur de Sudán. Para una de estas experiencias tomaron garrapatas de la especie *A. lepidum* que se habían alimentado sobre un animal parasitado por *T. mutans*, lo aplicaron sobre otro ternero esplenectomizado y realizaron un seguimiento clínico de la experiencia. El animal desarrolló una parasitosis que alcanzó el 33,5% de los eritrocitos en su máximo y un título de anticuerpos, medidos por I.F.I., de 2560 que sólo fue positivo frente al antígeno de *T. mutans* y negativo frente a otros. Esta es la primera demostración de la capacidad vectora de *A. lepidum* para *T. mutans*, si bien ya se sabía que las especies de *Amblyomma* podían actuar también como vectores efectivos para este parásito en otras partes de Africa.

Fujisaki y col. (1988) realizaron unos trabajos de identificación del vector de la theileriosis bovina en la zona más meridional de Japón, donde no aparece el vector habitual de *T. sergenti*, *Haemaphysalis longicornis*, y sin embargo es muy frecuente encontrar *H. mageshimaensis*. En la experiencia emplearon 3 terneros Holstein de 4 a 6 meses de edad que habían sido esplenectomizados un mes antes de la infección.

Previamente se comprobó su negatividad en cuanto a piroplasmas en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, así como de anticuerpos medidos por I.F.I. y/o ELISA. El primer ternero fue infectado con *T. sergenti* por alimentación de ninfas de *H. longicornis*. Sobre este ternero se alimentaron garrapatas de la especie *H. mageshimaensis*, por el método de las bolsas en las orejas, quedando así infectadas. Cuando mudaron a adultos fueron aplicadas a la oreja de un nuevo ternero no infectado que, posteriormente, alcanzó una parasitemia del 10 al 30%. Este ternero sirvió para repetir el proceso nuevamente. De este modo, los citados autores consiguieron demostrar la implicación de esta garrapata como vector de la enfermedad en la zona.

3. INFECCION EXPERIMENTAL

Son numerosos los trabajos que a lo largo de la historia se han realizado para conseguir que animales de experimentación desarrollen una theileriosis.

3.1. POR ALIMENTACION DE GARRAPATAS

El citado trabajo de Fujisaki y col. (1988) constituye un claro ejemplo de infección experimental por alimentación de garrapatas.

Paling y Geysen (1981) realizaron la infección experimental de animales machos de 18 meses de edad, con objeto de aislar una cepa de *T. parva*. Para ello, seleccionaron una granja con historial largo de ausencia de theileriosis y llevaron a cabo pruebas serológicas y frotis sanguíneos para constatar la negatividad de los animales frente a *T. parva* y *T. mutans*.

Antecedentes bibliográficos

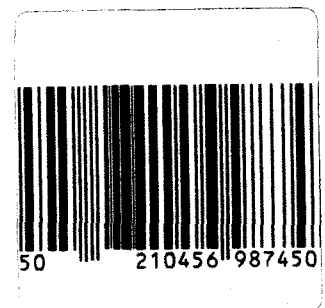
El método empleado para infectar consistió en alimentar a ejemplares semialimentados de *R. appendiculatus* sobre un animal susceptible.

Irvin y col. (1981), por su parte, observaron que se producía una pérdida muy grande de parasitemia desde la encontrada en el hospedador vertebrado en que se alimenta la garrapata y la que aparece después de que ésta realice la transmisión a un nuevo animal susceptible.

McHardy y Morgan (1981) realizaron infecciones experimentales de terneros con objeto de estudiar la efectividad de fármacos como 993C y halofuginona. Así, infectaron 10 reses que pesaban de 120 a 190 Kg con "estabilizados" de *T. parva* y después trataron a 5 de ella, que se recuperaron, mientras que los 5 animales no tratados murieron en 19 ó 20 días. En todos los terneros que enfermaron y se recuperaron, la temperatura osciló entre 40,1 y 41 °C.

Schein y Voigt (1981) llevaron a cabo infecciones experimentales en grupos de reses con "estabilizados" de *T. parva* (cepa Muguga) y en otros casos con *T. annulata* (cepa Ankara), para controlar de nuevo la efectividad de la halofuginona en el tratamiento, dejando en cada caso un animal no tratado como control y estudiaron su evolución. En los animales tratados consiguieron la recuperación con más o menos éxito. Todos los animales recuperados fueron inmunes a "challenge" homólogos.

Navarrete y col. (1992) infectan experimentalmente un ternero con un "estabilizado" de *T. annulata*. La temperatura máxima que alcanzó el ternero fue de 40,3 °C, que correspondió a una parasitación del 3 y 5% y un título de anticuerpos, medidos por la técnica I.F.I., de 320.



Samish y Pipano (1981) realizaron infecciones experimentales con estabilizados de ixódidos separando entre garrapatas machos y hembras.

Grootenhuis y Young (1981), publican un trabajo acerca del posible papel que juegan los bovinos salvajes en las infecciones por *Theileria*. Para ello realizaron infecciones experimentales de ganado vacuno doméstico por inoculación de sangre con diferentes especies de *Theileria* procedentes de búfalos africanos o con garrapatas que se habían alimentado sobre éstos, estudiando la patogenicidad del parásito en los nuevos hospedadores.

Según Radley (1981), la severidad de la reacción en la Fiebre de la Costa Este depende de la dosis infectiva introducida al animal. No obstante, en experiencias en las que se ha administrado una dosis infectiva baja a un grupo de animales, se han dado reacciones desde leves a severas con incluso muertes en las reses.

Young (1981) señala que garrapatas alimentadas sobre animales con baja parasitemia, dan lugar a veces a nuevas bajas parasitemias.

Subramanian y col. (1987) infectaron varios terneros, por alimentación de garrapatas en unos casos, y, en otros por inoculación de un estabilizado de garrapatas, para conseguir diferentes aislados de *T. annulata* de la India. La selección previa de los terneros se hizo en base a su negatividad en la prueba de I.F.I.

3.2. POR INOCULACION DE SANGRE INFECTADA CON THEILERIA

La sangre del ganado en la fase aguda de la infección con *T. annulata*, cuando los esquizontes pueden detectarse en extensiones de hígado, es invariablemente infectiva para el ganado receptor (FAO, 1988).

Con la intención de recavar más información sobre la patogenicidad de *T. mutans* en Nigeria, Saidu (1981) llevó a cabo infecciones experimentales de terneros, tanto esplenectomizados como intactos. Seleccionó 3 terneros de cebú intactos y 4 esplenectomizados. De todos ellos, 2 de los intactos y 2 de los esplenectomizados sirvieron como controles no infectados. Se infectaron por inoculación de sangre y el seguimiento de la experiencia consistió en la medida de la temperatura, parasitemia, hematocrito y recuento de eritrocitos y leucocitos.

Los terneros esplenectomizados desarrollaron una parasitemia superior al 69 por mil y, finalmente, murieron. En cambio, los terneros intactos mostraron una anemia transitoria y una baja parasitemia (4 eritrocitos infectados de cada 1000), recuperándose sin necesidad de tratamiento.

Morzaria y col. (1981 b) seleccionaron terneros (*Bos taurus*) con 2 ó 3 días de vida y los mantuvieron en condiciones de laboratorio en zona libre de garrapatas. Fueron esplenectomizados seleccionándose sólo aquellos que resultaron negativos a la presencia de merozoitos y anticuerpos de *T. mutans*, *T. parva* y *T. annulata*, mediante la prueba de I.F.I.. Durante el experimento, el seguimiento consistió en toma de temperatura rectal, frotis sanguíneos, palpación de nódulos linfáticos y frotis de las biopsias de ganglios, cuando fue necesario.

Se realizó el aislamiento de especies de *Theileria* por inoculación intravenosa de 1,5 ml de sangre a 2 terneros susceptibles. Ambos animales mostraron en sus frotis sanguíneos formas de *Theileria*, sirviendo posteriormente como portadores. En las pruebas de I.F.I. mostraron tener anticuerpos frente a *T. mutans* pero no frente a *T. parva* y *T. annulata*. Estos autores encontraron seroconversión en los animales desde títulos de menos de 40 antes del experimento a 1280 en 181 días.

Juste y col. (1989) destacan la importancia de transmisión de otros agentes infecciosos como *Citocetes phagocytophila* cuando se realizan las inoculaciones de sangre de unos animales a otros.

Ishii y col. (1992) infectaron experimentalmente a reses por inoculación de sangre y obtuvieron una baja parasitemia. Para estimular la subida del índice de parasitación, procedieron a inyectar prednisolona a los animales.

En la preselección de los terneros empleados en infecciones experimentales con especies de *Theileria*, los diferentes autores coinciden en que se deben examinar frotis sanguíneos del animal para la detección de piroplasmas y pruebas serológicas, que prácticamente siempre se reducen a la I.F.I., para detectar anticuerpos específicos frente a la especie en cuestión, (Morzaria y col., 1981; Sato y col., 1993).

4. AISLAMIENTO DE *T. annulata in vitro*

En 1945, Tsur-Tchermoretz consiguió cultivar *in vitro* esquizontes de *T. annulata* a partir de explantes de hígado y bazo, si bien no conseguía producir gran cantidad de esquizontes.

Fue el eminente virólogo Abraham Kimron (en un trabajo no publicado) quién obtuvo por primera vez un cultivo de *T. annulata* en monocapa a partir de un tejido tripsinizado de un riñón extraído a un ternero que se estaba muriendo de theileriosis (Pipano 1991).

Posteriormente, fueron obtenidos otros cultivos de *T. annulata* en monocapa a partir de otros órganos internos (Tsur y Adler, 1962) y de sangre infectada de bovinos enfermos (Tsur y Adler, 1965).

Una vez demostrado que el aislamiento y cultivo *in vitro* de la fase esquizogónica de *T. annulata* era posible, se concluyó que este era además el mejor método para el mantenimiento de las cepas de *T. annulata* de cada zona donde la theileriosis constituía un problema. Por lo tanto, éste fue el principal objetivo de la investigación en las diferentes áreas endémicas en los siguientes años. Fruto de este esfuerzo fue el aislamiento de numerosas cepas del parásito en zonas del mundo muy alejadas entre si, lo que permitió el posterior establecimiento en cultivo de estas cepas.

Así, Shein y col. (1975) aislaron en Turquía la cepa que denominaron "Ankara", por la localización del aislamiento dentro del país.

En Irán, unos años antes, Hooshmand-Rad y Hashemi-Fesharki (1968), y años después Shad-Del (1977), durante el transcurso de su tesis doctoral aislaron 3 cepas más de *T. annulata* en el Instituto Razi de Teherán, y las nombraron como S3, S15 y S19.

Mientras tanto Gill y col. (1976), aislaron e identificaron otra cepa de *T. annulata* en la India, que en este caso fue denominada cepa "Hissar".

Por su parte, Sharma y Brown (1981) realizaron el aislamiento y establecimiento en cultivo de varias líneas celulares de *T. annulata* procedentes de animales enfermos. Partieron en sus experiencias de biopsias de ganglios linfáticos, de sangre infectada y, en algunos casos, de órganos postmortem.

El tiempo mínimo que necesitaron para conseguir la transformación y el establecimiento de los cultivos *in vitro*, fue de 7 a 10 días. Los cambios de medio de cultivo fueron en unos casos 2 veces por semana y en otros 3. Llevaron a cabo la criopreservación de las líneas celulares, almacenándolas en la fase de vapor de un contenedor de nitrógeno líquido, y empleando dimetil sulfóxido al 10% como crioprotector.

Estos autores emplearon los cultivos para la preparación de antígeno destinado a la prueba I.F.I. Según Uilenberg y Pipano (1981), este tipo de antígeno, al menos en *T. parva*, es más específico y detecta anticuerpos durante un periodo de tiempo más prolongado que el antígeno de piroplasmas.

Ouhelli (1985), durante la realización de su tesis doctoral, aisló una cepa de *T. annulata* en Marruecos, denominándola cepa "Gharb".

Todas estas cepas han constituido la materia prima para estudios de caracterización del parásito. Para los trabajos de caracterización y, en general, cualquier profundización en el conocimiento de las cepas aisladas, es necesario disponer de masa suficiente del parásito, lo que implica la necesidad de cultivarlo *in vitro*. Los progresos conseguidos en el cultivo *in vitro* de *Theileria*, desde que se iniciaron en los años 40 (Tsur-Tchermonoretz, 1945), han sido lentos y escasos. Tan solo un estadio, el macroesquizonte, se ha conseguido cultivar con técnicas reproducibles y que nos permitan disponer de cantidades suficientes del parásito como para poder ser usado en experimentos de laboratorio. Intentos de cultivar otros estadios del ciclo de vida han dado resultados muy limitados en el caso de estadio intraeritrocítico (Conrad y col., 1985), así como en estadios del parásito que se desarrollan en órganos de la garrapata (Bell, 1984).

Algo más exitoso ha sido el trabajo encaminado a favorecer la transición de un estadio del parásito a otro en condiciones de cultivo *in vitro*. En este sentido Brown y col. (1973) desarrollaron una investigación en la que demuestran que diferentes especies pueden mantenerse en cultivo de linfoblastos bovinos en forma de esquizontes, pero partiendo de esporozoítos extraídos de garrapatas infectadas. No obstante, no ha sido posible que estos esquizontes dieran lugar a merozoítos capaces de infectar a eritrocitos. Además, las garrapatas no pueden ser infectadas con los eritrocitos cultivados (Brown, 1987).

Shiels y col. (1992) han trabajado en la inducción de líneas celulares infectadas con esquizontes de *T. annulata* para conseguir la diferenciación de éstos al siguiente estadio del ciclo de vida, es decir los merozoítos, sometiendo los cultivos a la temperatura de 41 °C durante periodos de tiempo limitado.

En cuanto al mantenimiento de las células linfoblastoides infectadas con esquizontes de *T. annulata*, se puede concluir que las técnicas de cultivo se han ido mejorando con el paso de los años y todas las mejoras y sus posibles aplicaciones han sido extensamente revisadas en los trabajos de Brown (1979; 1980; 1981; 1983). Además, de una forma detallada para cada una de las diferentes especies de *Theileria*, se han publicado trabajos por diferentes autores: Pipano (1984) en *T. annulata*; Kurtti y col. (1981) y Stagg y col. (1981) en *T. parva* (aunque anteriormente Malmquist y col., 1970, ya propusieron un método de cultivo para *T. parva*); Hooshmand-Rad y Hawa (1975) en *T. hirci*; Stagg y col. (1974) en *T. lawrencei*; Stagg y col. (1976) en *T. taurotragi*. En todos los casos se consiguieron establecer líneas celulares de células linfoblastoides infectadas con esquizontes.

Por último, Pipano y col. (1989) realizaron una comparación entre los diferentes métodos de aislamiento de células linfoblastoides infectadas a partir de animales enfermos y el éxito en la consecución de líneas celulares establecidas.

5. CARACTERIZACION DE LA CEPA DE *T. annulata* AISLADA

Desde mediados de los años 30, ya se tenía constancia de las diferencias antigénicas existentes entre diferentes aislados de *T. annulata* procedentes de áreas geográficas distintas (Sergent y col., 1936).

Animales recuperados de la infección por una cepa, resisten la reinfección por la misma cepa, pero no están completamente protegidos contra otra, sobre todo si ésta es más virulenta que la primera (Gautam, 1981).

La inmunización contra la theileriosis por *T. annulata* parece ser el método de elección para reducir las pérdidas económicas por esta enfermedad. Además es preferible preparar una vacuna a partir de aislados locales en vez de con cepas del parásito de áreas geográficas alejadas (Ozkoc y Pipano, 1981).

Para la diferenciación de cepas de *Theileria* dentro de una misma especie se ha empleado, entre otros métodos, el patrón isoenzimático de los parásitos (Uilenberg, 1981). El análisis electroforético de isoenzimas, ha sido aplicado con anterioridad a protozoos como *Entamoeba histolytica* (Montalvo y Reeves, 1968), *Toxoplasma gondii* (Bloomfield y Remington, 1970), *Plasmodium berghei* y *P. vinckei* (Carter, 1973), pasó rápidamente a ser utilizada en la caracterización de los *Trypanosomatidae*, y dentro de ellos sobre todo al género *Leishmania*: Así, Gardener y Howells (1972), Kilgour y Godgrey (1973), Ebert (1973), Kilgour y col. (1974) y Kreutzer y Christensen (1980), introducen la electroforesis en acetato de celulosa en la tipificación de *Leishmania* y demuestran que es posible identificar una cepa o especie de este género mediante el estudio de tan solo tres isoenzimas (PGD, MPI Y GPI).

Rioux y col. (1980) identifican por primera vez a *L. infantum* como agente etiológico de la leishmaniosis cutánea en los Pirineos Orientales (Francia), empleando la técnica de electroforesis de isoenzimas en gel de almidón.

Melrose y col. (1980) compararon cinco cepas de *T. annulata* procedentes de tres áreas geográficas diferentes y una cepa de *T. parva*. Se emplearon macroesquizontes cultivados en células linfoblastoides bovinas. Para la prueba realizaron una electroforesis en gel de almidón. La diferenciación entre las cepas se hizo en base a su patrón isoenzimático para la glucosa fosfato isomerasa (GPI). Encontraron que los cultivos en

células derivadas de cuatro reses diferentes mostraban un patrón isoenzimáticos semejante, tanto en el hospedador como en el parásito. Por otro lado, dos cepas de *T. annulata* y una cepa de *T. parva* crecidas en células linfoides derivadas del mismo animal mostraron idéntico patrón isoenzimático para el hospedador, mientras que el patrón de isoenzimas asociado con cada parásito fue diferente. Cepas de *T.annulata* procedentes de distintas zonas geográficas poseían diferentes patrones del isoenzima, mientras que no observaron diferencias entre las cepas que pertenecían a la misma zona.

Van der Meer y col. (1981) realizaron un estudio isoenzimático del estadio intraeritrocítico de *Theileria*. Para ello tomaron sangre bovina que contenía piroplasmas de *T. parva* y sangre no infectada. Revelaron solo la banda de la actividad glucosa fosfato isomerasa (GPI) asociada al parásito. No fue necesaria la purificación de los piroplasmas, porque no hay interferencia entre la banda GPI de la célula hospedadora y la del parásito. Según estos autores, la gran desventaja de usar piroplasmas en el estudio de los isoenzimas de *T. parva* es el hecho de que el animal suele morir antes de que su parasitemia sea lo suficientemente elevada como para conseguir la preparación satisfactoria de las muestras.

Sharma y Brown (1981), estudiaron la diferenciación de cepas de *T. parva* por el isoenzima GPI en varias líneas celulares establecidas en cultivo a partir de animales enfermos.

Nyormoy y Bwayo (1981), tratando de desarrollar un método para tipificar las diferentes cepas de *T. parva*, prepararon extractos enzimáticos. Para ello emplearon varios tipos celulares infectados y sin infectar con *T. parva*, así como esquizontes purificados del parásito. La electroforesis fue

realizada en geles de poliacrilamida y los sistemas enzimáticos estudiados fueron: Glucosa fosfato isomerasa (GPI), fosfoglucomutasa (PGM), Glutamato deshidrogenasa (GDH), Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), Lactato deshidrogenasa (LDH) y Malato deshidrogenasa (MDH). Estos investigadores, concluyeron que hay isoenzimas de MDH, LDH y GPI que son útiles en la diferenciación de especies y cepas de *Theileria*.

Melrose y col. (1984), usando la electroforesis en gel de almidón, demuestran que hay una marcada actividad glucosa fosfato isomerasa (GPI) asociada con el parásito y distinta a la actividad de la célula hospedadora. No encuentran evidencia de otras isoenzimas específicas del parásito, pero sí la existencia de un considerable polimorfismo en cuanto a la GPI entre varios aislados de *T. annulata* procedentes de diferentes zonas.

6. METODOLOGIA DE OBTENCION DE UNA VACUNA CONTRA *THEILERIA*

6.1. INOCULACION DE SANGRE DE ANIMALES INFECTADOS

Los primeros trabajos de vacunación frente a *T. annulata* fueron realizados por Sergent y col. (1945) en Argelia. Estos investigadores aislaron una cepa de baja virulencia que denominaron "Kouba" y la mantuvieron *in vivo* por inoculación a animales de experimentación susceptibles. Realizaban un pase cada 17 a 25 días y esto daba lugar a la pérdida de los estadios eritrocíticos pero no se modificaba la virulencia. Usaron esta cepa para vacunación en el periodo que transcurrió entre el pase nº 52 y el pase nº 220 durante más de 10 años. Como vacuna se administraba una inyección de 5 a 10 ml de sangre de un animal que se encontraba en un estadio agudo de la enfermedad.

El pase de la cepa en animales de experimentación conllevó la muerte del 3,2% de los mismos.

Posteriormente, investigadores israelíes (Alder y Ellenbogen, 1934), con el propósito de conferir protección al ganado de raza frisona, que era importado a Israel para mejorar la cabaña vacuna, comenzaron a practicar experiencias de este tipo. Inicialmente, emplearon para vacunar varias cepas argelinas de baja virulencia, entre las que se incluyó la llamada cepa "Brunete", que causaba una mortalidad post-vacunación del 1,8%. Observaron que las cepas argelinas no conferían suficiente protección por sí solas, y decidieron que sería conveniente inocular, transcurrido de uno a dos meses desde la vacunación, una cepa virulenta autóctona de Israel, la cepa "Tova", reforzándose así la inmunidad. Durante este periodo se consiguieron resultados muy satisfactorios ya que, partiendo de una mortalidad del 13% causada por theileriosis en ganado no vacunado, pasaron a tener una mortalidad del 0,03% en un rebaño estudiado de aproximadamente 3000 cabezas de ganado (Sturman, 1959), si bien estas cifras no incluyen la mortalidad causada por la vacunación en sí misma, que fue del 1 al 2%. La cepa "Brunete" se mantuvo en el laboratorio del Instituto Veterinario Israelí de Beit Dagan durante 420 pases, hasta que, en 1963, dos terneros inoculados con la cepa murieron sin que fuesen encontrados esquizontes en sus ganglios linfáticos, y su sangre, inoculada a terneros susceptibles, no fue capaz de dar lugar a una nueva infección. Este suceso espoleó a los investigadores hacia la búsqueda de un método alternativo de vacunación.

Desde 1974, en Japón se realizan experiencias de inmunización frente a *T. sergenti* utilizando sangre infectada como vacuna viva (Minami y col., 1981). Inoculaban por vía subcutánea 2×10^8 eritrocitos parasitados, observando que

esta vacuna viva de *Theileria* tenía un efecto inhibitorio en la manifestaciones clínicas de la theileriosis. Este tipo de vacunación fue prohibida en Japón en 1979 por dar lugar a la diseminación de otras enfermedades.

En años posteriores se pusieron a punto las técnicas de cultivo *in vitro* de células linfoblastoides bovinas infectadas con esquizontes (Brown, 1979), permitiendo así disponer del parásito en grandes cantidades y observar el comportamiento de los esquizontes en cultivo.

El método de inmunización requiere el establecimiento de la infección en las células del animal que está siendo inmunizado (Irvin y Morrison, 1987) y, gracias al desarrollo de las pruebas serológicas, tenemos la posibilidad de valorar la respuesta de los animales en la experiencia de inmunización (Dolan, 1981).

Los primeros intentos de vacunación en Africa contra la fiebre de la Costa Este (theileriosis producida por *T. parva*) se deben a Spreull (1914), que inoculaba un macerado de bazo y ganglio linfático para la prevención de esta enfermedad en el ganado.

Como puede comprobarse, los métodos de inmunización contra las especies de *Theileria* han sido estudiados durante años y, hasta ahora, el único método que ha dado resultados prácticos en condiciones de campo es el que emplea una vacuna derivada de un cultivo de células infectadas con macroesquizontes del parásito (Radley, 1981). Este método ha sido usado con éxito en algunos países en el caso de *T. annulata*, pero no da resultados tan satisfactorios para *T. parva* y *T. lawrencei*. En estas dos especies ha de emplearse el método conocido como "infección y tratamiento".

6.2. INMUNIZACION POR INFECCION Y TRATAMIENTO

Según este método (Radley, 1981), hay que infectar al ganado con el parásito, para tratarlo seguidamente con un quimioterápico que actúe durante la primera fase de la enfermedad y evitando la aparición de una reacción severa, de forma que el animal queda inmune a posteriores infecciones. Como fuente de material infectivo se emplean garrapatas y seguidamente se administran tetraciclinas durante un periodo prolongado.

Según Jarret y col. (1969), para alcanzar el éxito en este proceso, resulta adecuada la administración de 16 dosis (1 al día) de tetraciclinas por vía oral a razón de 16 mg/kg.

Esta técnica, en cualquier caso, no fue aceptada, debido a la cantidad de tiempo necesario para llevarla a cabo y al elevado precio de la tetraciclina en la época en que se ideó el método (Radley, 1981).

Los trabajos subsiguientes fueron encaminados a la reducción tanto de la dosis como del número de días de administración, hasta que se obtuvo una tetraciclina de acción prolongada que permitía su administración en una sola dosis de 20 mg/kg, a la vez que se inoculaba el agente infectivo, consiguiéndose la inmunidad del ganado con unas reacciones adversas mínimas (Radley, 1981).

La existencia de cepas es un factor que hace más complicada una efectiva inmunización frente a las especies de *Theileria*. En un principio se pensó que la solución sería buscar una cepa que poseyera todo el mosaico inmunogénico que podían tener las diferentes cepas encontradas, de tal modo que vacunando con esta cepa se protegería contra todas. La búsqueda

de esta cepa lleva mucho tiempo un proceso a largo plazo y existe una posibilidad grande de que ni siquiera exista. Como alternativa, se pueden buscar cepas que resulten más protectoras que otras, realizando la inmunización con una combinación de las mismas.

En el caso de *T. parva*, se realizó una combinación con *T. parva* (cepa Muguga), *T. parva* (cepa Kiambu 5) y *T. lawrencei* (cepa Serengeti), que se denominó cóctel Muguga. En ensayos de laboratorio dió resultados esperanzadores frente a *T. parva*.

Posteriormente, Uilenberg y col. (1976 y 1977), realizaron ensayos de campo usando el citado cóctel en Pugu (Tanzania). Mientras los animales control murieron cuando fueron expuestos al agente infectivo de forma natural, ninguno de los animales vacunados murieron de theileriosis, si bien alguno de ellos murió de babesiosis y otras enfermedades.

Purnell (1977) opina que paralelamente al método de vacunación por infección y tratamiento se debe de continuar con los trabajos que posibiliten una vacuna de cultivo de tejidos contra la E.C.F., ya que tal vacuna sería más segura y más fácil de administrar.

Para *T. lawrencei* los resultados fueron bien distintos, ya que sólo resultaron protegidos el 50% de los animales vacunados y el otro 50% murieron al ser re infectados, si bien del lote control murieron el 80%. Después, añadieron al cóctel el "challenge" de *T. lawrencei* usado anteriormente, y esto hizo mejorar de manera muy considerable la capacidad de resistencia a una nueva infección. Con esto se demostró que el mosaico inmunogénico se puede conseguir mediante el uso de una combinación de cepas (Radley, 1981).

Antecedentes bibliográficos

En el caso de *T. annulata* el método de infección y tratamiento con 1 ó 2 dosis de oxitetraciclina de acción retardada ha sido usado con éxito por Gill y col. (1978). La única forma de poner a prueba un método de inmunización desarrollado en el laboratorio, es mediante un ensayo de inmunización en condiciones de campo. Este ensayo consistiría según Radley (1981), en tener ganado vacunado junto con animales no vacunados en las mismas condiciones y comparar la incidencia de theileriosis y la razón de mortalidad y de productividad en ambos grupos. Este autor indica, que la inmunización conseguida probablemente dura años, e incluso toda la vida del animal en un área endémica en donde hay un constante enfrentamiento con el agente infeccioso.

Paling y Geysen (1981), considerando que la theileriosis era el principal problema para la mejora de la cabaña ganadera en Ruanda, concluyeron que la solución posible al problema era el desarrollo de una vacuna frente a *T. parva* basada en cepas locales del parásito. Para conseguir esto llevaron a cabo tres experiencias de investigación:

- Aislamiento y caracterización de una cepa local de *T. parva*, la cual serviría como cepa para la vacuna.

- Aislamiento de otras cepas en diferentes zonas del país y realizar pruebas de inmunidad cruzada con la cepa que constituye la vacuna.

- Exposición de animales vacunados a las condiciones de campo.

Irvin y col. (1981) realizaron un trabajo de inmunización en Kenia con la cepa "Muguga" de *T. parva*. Para demostrar la eficacia de la vacuna, inocularon 4 reses vacunadas con un

"estabilizado" de una cepa de *T. parva* de otra región del país denominada "Kilifi". En las 4 reses no se produjo ninguna reacción, mientras que en 5 reses control no inmunizadas que también habían sido inoculadas las consecuencias fueron fatales. En este trabajo concluyeron que, tanto la vacunación como el "challenge", se habían realizado con dos aislados que pertenecían a cepas idénticas separadas geográficamente por eventuales traslados de bueyes de una zona a la otra.

Paling y Geysen (1981) seleccionaron una cepa de *T. parva* aislada en Ruanda para ser empleada como vacuna en esta zona. Emplearon los animales de 18 meses que resultaron negativos a las pruebas de I.F.I. y de búsqueda de piroplasmas en extensiones sanguíneas tanto para *T. parva* como para *T. mutans*. En estas experiencias las reses recibieron el "challenge" posterior a la vacunación por inoculación del parásito por inyección en unos casos y por exposición en el campo en otros.

Pipano (1981), publica una experiencia de vacunación frente a *T. annulata*, por el método de inmunización y tratamiento, en la que se consiguen resultados bastante satisfactorios, y que demuestran la eficacia del método para éste parásito. El autor hace una valoración en comparación con el método usado habitualmente para la vacunación contra *T. annulata* y concluye que es más ventajoso el método habitual de vacunación con linfoblastos infectados con esquizontes del parásito.

Morzaria y col. (1987) realizan unas experiencias en Kenia empleando 2 cepas diferentes de *T. parva* para inmunizar a 52 reses, quedando 33 como controles susceptibles. Estas reses son expuestas a "challenge" de campo haciéndoles permanecer de 42 a 90 días en tres zonas endémicas a la theileriosis de la costa de Kenia. El ganado expuesto a "challenge" en uno de los

sitios, había sido inmunizado un año antes, y mantenido en un lugar libre de garrapatas. Mostró un nivel de protección similar al del ganado inmunizado de 1 a 2 meses antes de la exposición; por lo tanto, la inmunidad no había decaído en un año. Para el trabajo seleccionaron tres granjas, en base a que se conocían los problemas que tenían con la theileriosis y la importancia que representaba la enfermedad como obstáculo para la cria de ganado en las respectivas zonas.

En la granja Mtwapa, de 11 toros Jersey vacunaron a 8 y dejaron a 3 controles.

En la granja de Kiswani inmunizaron a 18 terneros y dejaron 7 como control. Los que sobrevivieron a este experimento junto con 12 terneros adicionales de la misma edad, fueron sometidos a challenge de campo en una segunda fase del experimento.

En la granja Kibarani, hicieron dos ensayos. En el primero vacunaron a 17 reses y 5 quedaron como control. En el segundo, de 25 reses, vacunaron a 12 y dejaron a 13 como animales susceptibles. El seguimiento fue monitorizado controlando los anticuerpos por el método de I.F.I.

Mutugi y col. (1991), para una experiencia de inmunización frente *T. parva* en una granja, realizaron un muestreo serológico previo de los animales de la explotación, con objeto de conocer el nivel de exposición a *Theileria* que tenían los animales de esta granja.

Según Pipano (1981), el método de infección y tratamiento parece proporcionar una protección más fuerte al "challenge" en el campo, pero el método de inmunización con cultivos atenuados es más seguro ya que permite una mejor cuantificación

y un mejor control de calidad de la vacuna.

Rana y Dhar (1993) recientemente han llevado a cabo una experiencia de inmunización contra la theileriosis tropical por infección y tratamiento. Estos autores han observado una clara diferencia en cuanto a la resistencia a un challenge por parte de los terneros inmunizados, si bien mostraron algunas reacciones clínicopatológicas que atribuyen a un efecto residual de la buparvacuona. Consideran como buen indicador de la inmunidad, la respuesta de anticuerpos observada en los terneros.

6.3. INMUNIZACION CON CULTIVOS CELULARES DE VIRULENCIA ATENUADA

Desde un principio, existe el convencimiento de que las pocas vacunas que han dado buenos resultados frente a infecciones por parásitos son las basadas en la administración de organismos vivos atenuados (Callow, 1977; Pipano, 1974), e intentos de inmunizar con parásitos muertos, en la mayoría de los casos, han conducido a fracasos (Morrison, 1987).

El problema principal cuando se usan cultivos celulares está relacionado con la necesidad de transferir los macroesquizontes de las células donadoras a las células receptoras, con el fin de estimular la generación de inmunidad protectora en el animal receptor.

La facilidad de transferencia está determinada por el grado de compatibilidad inmunológica entre los dos tipos de células. Esta puede ser muy variable, del mismo modo que lo es la generación de inmunidad. Estos factores inmunológicos

constituyen un problema para el uso como vacuna de cultivos celulares de *T. parva*, pero no ocurre así en el caso de *T. annulata* (FAO, 1988).

Desde que Tsur-Tchermoretz (1945) consiguió aislar *in vitro* esquizontes de *T. annulata*, se pensó en la posibilidad de que éstos podrían servir para la preparación de una vacuna contra la enfermedad. Sin embargo los cultivos a base de explantes de hígado y bazo usados por este autor no eran muy indicados para un proceso de producción a gran escala como el que se necesita para la fabricación de una vacuna.

En años posteriores se aislaron linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *T. annulata* a partir de órganos y de sangre de terneros enfermos consiguiéndose el cultivo en monocapa (Tsur y Alder, 1962 y 1965).

Los primeros estudios mostraron que el líquido sobrenadante de los cultivos en monocapa contenía esquizontes libres, así como células linfoblastoides infectadas con esquizontes. Este material era invariablemente infectivo para el ganado, pero el periodo de supervivencia de los esquizontes era muy corto, y si éstos eran guardados a 4 °C de 24 a 48 horas, a veces no provocaban la enfermedad en el ternero inoculado.

Otras observaciones mostraron que el cultivo prolongado conducía a una pérdida de la virulencia de los esquizontes (Tsur y col., 1964), y una vez atenuados, éstos conferían protección frente a parásitos virulentos homólogos (Pipano y Tsur, 1966).

A finales de los años sesenta, se empezó a aplicar en Israel una vacuna frente a la theileriosis derivada de un

cultivo de *T. annulata*. Durante las dos décadas siguientes, en muchas de las zonas enzoóticas para la theileriosis producida por *T. annulata*, se han llevado a cabo ensayos de cultivo e inmunización contra esta enfermedad. De esta forma, en 1973 investigadores iraníes aislaron tres cepas locales a partir de ganado infectado de forma natural (Hashemi-Fesharki, 1988), usando dos de ellas para obtener vacunas y la tercera para tener un "challenge" definido, que les serviría para comprobar la inmunogenicidad de la vacuna.

Pirie y col. (1970) intentaron un método de vacunación en el que recogían en los linfocitos infectados con macroesquizontes de los ganglios linfáticos extraídos de animales muertos. Vacunaron el ganado por inoculación intravenosa de una suspensión que contenía de 10^8 a 10^{10} macroesquizontes. Dos dosis de 10^9 macroesquizontes con un intervalo de tres semanas entre las dos inoculaciones parecía dar los mejores resultados, protegiendo 8 de cada 10 diez animales frente a un subsecuente challenge de garrapatas.

En general, durante los años setenta, el conocimiento de las técnicas de cultivo *in vitro* adaptadas a los esquizontes de *Theileria* (Brown y col., 1973), hizo posible que en varios países se trabajara con el objetivo de la consecución de vacunas adecuadas contra la theileriosis.

Así, Pipano (1977a) comienza las experiencias de vacunación en Israel. Hooshmand-Rad y Hashemi-Fesharki (1968) destacan la importancia del aislamiento de cepas locales en la consecución de una vacuna para luchar contra la enfermedad en una zona. Por su parte Van den Ende y Edlinger (1971) en Túnez, Hooshmand-Rad (1975) en Irak, Gill y col. (1976) en la India y Zablotsky (1967) en la antigua Unión Soviética usan cultivos en suspensión.

Antecedentes bibliográficos

Stepanova (1977) recoge los resultados de una gran experiencia de campo con un seguimiento de tres años, y en la que se vacunaron 410 reses, quedando 66 como sujetos susceptibles. Ninguno de los animales vacunados mostró theileriosis clínica, mientras que todos los terneros susceptibles enfermaron, muriendo 22 de ellos.

Pipano y col. (1977b) realizan experiencias de inmunización con esquizontes de *T. annulata* muertos, comprobando que el ganado es susceptible a la infección con esporozoitos y resistente a la infección con esquizontes homólogos virulentos. Concluyeron que la inmunidad generada por los parásitos muertos es específica de cada estadio.

En el trabajo de Pipano (1977a) se sostiene que cualquier aislado de campo virulento puede ser atenuado por cultivo *in vitro*, y por lo tanto debería ser posible inmunizar al ganado con aislados locales y así evitar las potenciales complicaciones debidas a las cepas.

Así mismo, el autor señala que la duración de la inmunidad en ausencia de "challenge", no ha sido evaluada, si bien las observaciones de campo sugieren que la protección debería durar al menos de 2 a 3 años. El ganado inmunizado experimentalmente se comprobado que no muestra signos de infección cuando es inoculado con esquizontes virulentos homólogos 18 meses después de la vacunación.

Pipano (1981) indica que el mecanismo de atenuación de la virulencia de los esquizontes de *T. annulata* no se conoce, aunque parece ser que el tiempo de mantenimiento en cultivo *in vitro* necesario para alcanzar la atenuación total no está relacionado con la virulencia inicial del aislado.

Los esquizontes completamente atenuados, al ser inoculados, no causan fiebre ni parasitemia detectable, mientras que la respuesta a la vacuna es valorada mediante serología.

Pipano (1981), también observa que la vacuna de esquizontes atenuados induce una inmunidad que protege totalmente contra la reinfección con esquizontes virulentos homólogos procedentes de un cultivo celular. Para este autor, los ensayos de campo necesarios para la comprobación de la potencia de la vacuna son deseables, aunque presentan el problema de que su realización en las condiciones experimentales apropiadas, para recoger la información necesaria acerca de la capacidad protectora de la vacuna, es muy costosa.

El mismo autor, en una prueba encaminada a determinar la potencia de una vacuna, expuso 22 terneros de raza frisona a la infección por garrapatas. De ellos, 15 presentaron baja parasitemia y/o leve fiebre y los 7 restantes permanecieron asintomáticos. Mientras tanto, varios de los terneros controles desarrollaron theileriosis clínica y en algunos casos murieron. Se concluyó que la vacuna resultaba igualmente efectiva para animales jóvenes y adultos.

Gill y col. (1981) cultivaron dos cepas virulentas de la India hasta su atenuación, hecho que evidenciaron por inoculación de estas cepas a terneros susceptibles, a los que confirieron resistencia a "challenge" homólogo letal.

En general se comprueba que la mortalidad y la gravedad de los síntomas clínicos producida por los cultivos de *T. annulata* va decreciendo con el número de pases, hasta que, después de algunos meses o años, la virulencia se pierde completamente (Pipano, 1989).

Los índices de morbilidad y mortalidad de esta enfermedad varían mucho en función de la etiología específica de la patogenicidad de la cepa de que se trate (Melhorn y Schein, 1984).

Emery y col. (1981) llevaron a cabo experiencias de inmunización con terneros, realizando el "challenge" en un grupo de los animales con 5×10^8 células, y en otro grupo de 3 terneros con 10^7 , 5×10^6 y 10^6 células autólogas infectadas respectivamente. También lo realizaron con esporozoítos. Comprobaron que la inmunidad en animales vacunados frente a *T. parva* no estaba correlacionada con la elaboración de anticuerpos específicos frente a los macroesquizontes del parásito. Encontraron que la inducción de la protección se presentaba paralela a la emergencia de la respuesta citotóxica, la cual era restrictiva para las células autólogas parasitadas. El ganado inoculado con células parasitadas inactivadas con o sin adyuvante era susceptible a los esporozoítos infectivos de *T. parva*, a pesar de la presencia de altos títulos de anticuerpos frente al parásito.

Para Ozkoc y Pipano (1981), la inmunización es el método de elección para la lucha contra la theileriosis por *T. annulata*. En este trabajo presentan resultados preliminares en el desarrollo de una vacuna de esquizontes de cepas turcas. Aislaron esquizontes de una cepa de Ankara y la mantuvieron en cultivo para intentar atenuarla, comprobando la virulencia de los esquizontes cada 20 a 30 pases, mediante la inoculación a terneros susceptibles, hasta que no hubo producción de esquizontes ni de piroplasmas. Posteriormente, procedieron a la preparación de un lote de vacuna criopreservada y la aplicaron en el campo a 40 reses de una granja, previa realización de un examen serológico de la explotación. Una considerable porción de los animales vacunados mostraron un

leve aumento de la temperatura corporal durante un periodo de tiempo. En todos los terneros se detectaron anticuerpos anti-*Theileria* entre los días 35 y 49 postvacunación. En años posteriores inmunizaron con vacuna congelada a 140 vacas frisonas importadas y a 36 terneros nacidos en Turquía.

Morrison y col. (1981) desarrollaron experiencias consistentes en la inoculación de ganado con diferentes dosis de líneas celulares autólogas infectadas, con el fin de conocer mejor la cinética de la infección así como el número de células requerido para inducir inmunidad en el caso de *T. parva*.

Cowan (1981) señala que la significancia y el papel de la respuesta humoral en la theileriosis es desconocido, si bien proporciona un indicador del *status* inmune, al tiempo que supone una estimable ayuda en trabajos de diagnóstico y epidemiológicos. El hecho de que un animal presente anticuerpos circulantes frente a piroplasmas y macroequizontes de *T. parva*, no nos indica necesariamente que sea inmune. No obstante, en los animales en los que los anticuerpos han sido inducidos, bien mediante infección por inoculación de un "estabilizado" de garrapatas, o bien por inoculación de un cultivo de linfoblastos infectados con esquizontes de *T. parva*, se detecta una correlación entre la presencia de anticuerpos medidos por I.F.I. y la resistencia de los animales a un nuevo enfrentamiento con *T. parva* (Burridge, 1971).

En la segunda mitad de la década de los ochenta, los trabajos de vacunación frente a la theileriosis tropical han tenido una especial importancia en la India, merced a la labor realizada por el equipo del Dr. Subramanian, quienes llevaron a cabo el cultivo *in vitro* de células hasta conseguir su total atenuación (Subramanian y col., 1988).

Antecedentes bibliográficos

Para Hall (1988), la inmunización con vacuna de macroesquizontes atenuados resulta en una infección subclínica que induce fuerte inmunidad frente a "challenge" tanto homólogo como heterólogo.

Subramanian y col. (1989) inmunizaron 55 terneros recién nacidos con una vacuna de linfoblastos infectados con esquizontes atenuados por cultivo *in vitro*. Inocularon una dosis inferior a la habitual y realizaron el seguimiento del proceso, constatando que evolucionaba de forma satisfactoria, usando la prueba de I.F.I. No obstante, los citados autores no recomiendan la vacunación para neonatos, por haber encontrado reacciones adversas atribuibles a *Theileria* en 3 de los terneros, posiblemente debido a factores relacionados con la compatibilidad antigénica entre las células linfoides empleadas en la vacuna y las del animal receptor.

En la India, Singh (1990) ha desarrollado recientemente una vacuna con esquizontes de *T. annulata* de una cepa de la India atenuados por cultivo *in vitro*, aunque la aplicación ha cubierto una zona limitada debido a los problemas de almacenaje y transporte de la vacuna en este país.

Recientemente, Singh y col. (1993) han establecido una línea celular de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *T. annulata* aislados en Anand (India). Han mantenido la línea en cultivo durante 453 pases, inoculando a terneros de experimentación el cultivo a los pases 12, 27, 48, 100 y 150, con objeto de conocer su grado de atenuación y su potencia como vacuna. Los autores han comprobado que la virulencia se reduce con el tiempo en cultivo, y así al inocular a los terneros 5×10^6 células linfoides infectadas con esquizontes de 150 pases, presentan reacciones postinoculación mínimas mientras que resisten a un challenge

Antecedentes bibliográficos

virulento de *T. annulata* a los 47 días después de la vacunación. Estos autores concluyen que la línea celular aislada en Anand de linfoblastos bovinos infectados, a los 150 pases e inoculados a una dosis de 5×10^6 por animal puede ser usada para la inmunización contra la theileriosis tropical. El seguimiento de los terneros ha consistido en el cálculo de la parasitemia, hematocrito, temperatura rectal y observación del grado de inflamación de los ganglios linfáticos.

En España, hasta el momento, no se ha llevado a cabo ningún trabajo de obtención de vacuna ni de experiencia de inmunización de ganado vacuno, a pesar de ser un país en el que todos los años hay casos clínicos de theileriosis producida por *T. annulata*, y de tener en el territorio zonas endémicas para esta enfermedad.

Quisiera destacar que hacer mención en esta revisión de todos los trabajos relacionados con el tema de estudio podría constituir una labor interminable. A lo largo del texto, sin embargo, se irán comentando todas las contribuciones que se han utilizado en esta investigación y que no he considerado imprescindible exponer aquí detalladamente.

MATERIAL Y METODOS

1. ENCUESTAS EPIDEMIOLOGICAS Y LOCALIZACION DE ZONAS ENDEMICAS.

1.1. ENCUESTAS A LAS INSPECCIONES COMARCALES VETERINARIAS (ICV) DE ANDALUCIA.

Como primer paso para el estudio de la parasitosis, se hace necesario el localizar de una forma precisa y concreta las zonas donde se presenta la enfermedad de manera endémica. En este sentido, se ha elegido como campo de acción para esta investigación la Comunidad Autónoma Andaluza, que abarca todo el Sur de España y cuenta con zonas ganaderas de vacuno muy importantes. Aunque existe información de partida acerca de las zonas más frecuentes de piroplasmosis en nuestra región (García Fernández y Romero Rodríguez, 1979), consideramos imprescindible llevar a cabo una actualización de los datos.

La primera acción encaminada a hacer frente a esta cuestión consistió en la realización de encuestas a las ICV de toda Andalucía. Para ello se confeccionó un cuestionario en donde se reflejan aspectos zootécnicos, tipo de diagnóstico, patología, incidencia anual, etiología (*Babesia* o *Theileria*), dinámica estacional y localización geográfica.

El cuestionario enviado constaba de las siguientes preguntas:

- 1- ¿Existe piroplasmosis en su Comarca?..... SI NO
En caso afirmativo: ¿en que municipios? _____

Material y métodos

2- ¿En qué especie zootécnica?: bovino..... SI NO
equino..... SI NO
ovino..... SI NO
caprino..... SI NO

3- ¿Se ha hecho un diagnóstico clínico?..... SI NO

4- ¿Se ha confirmado por diagnóstico de laboratorio? SI NO
¿En qué laboratorio/s? _____

5- Subraye los síntomas que encuentra en los animales infectados: fiebre, anemia, ictericia, hemoglobinuria, infarto de ganglios, esplenomegalia, postración, temblores nerviosos, otros(_____)

6- Referente al ganado bovino, ¿puede indicar el número de animales afectados por año? _____

7- ¿En qué razas bovinas observa una predominio del parasitismo?: Detállelas por orden de importancia:

8- Indique el número de animales afectados/año en su término, expresado por la frecuencia anual: nº afectados año/ nº animales censados:

Fr.anual Piroplasmosis=

¿Nota alguna diferencia en los síntomas presentados conforme a la época del año?.....SI NO

En caso afirmativo podría detallar el número de animales afectados por babesiosis: _____

theileriosis: _____

Material y métodos

9- ¿Qué dinámica estacional observa en la incidencia de casos clínicos?: primeros casos: n=_____mes_____
mayor nº casos: n=_____mes/es_____
últimos casos: n=_____mes_____

10- ¿Ha observado la correlación entre presencia de garrapatas y piroplasmosis?SI NO
¿Ha identificado la posible especie/s de garrapata/s vectora/s?:SI NO
En caso afirmativo, ¿podría describirla?: _____

11- ¿Qué terapéutica utiliza?: _____

12- ¿Cuáles son los resultados?: _____

13- ¿Sabe qué zona o zonas son endémicas a piroplasmosis?:__

Especifique lugar y nombre de las fincas que presenten periódicamente esta enfermedad: _____

14- En los animales afectados por piroplasmosis, ¿han sido éstos criados en la zona?.....SI NO
en caso negativo detalle la zona _____

15- ¿Estaría dispuesto a enviarnos muestras de sangre y suero de los posibles casos positivos que detecte?....SI NO

Fdo: _____

Ruego indique el firmante:

Domicilio: _____

Municipio: _____

Código Postal: _____

Teléfono: _____

Este cuestionario, tenía la finalidad de recoger información directa de los facultativos que se encuentran con el problema cotidianamente y que, bajo nuestro punto de vista, son los profesionales más idoneas para localizarnos geográficamente en el problema. Así, se enviaron cuestionarios a las 57 ICV que existen en las 8 provincias andaluzas, recibiendo respuesta de 27 de ellos, es decir el 47.4%.

Las 57 ICV son las siguientes:

Provincia de Almería:

- 1- Los Vélez
- 2- Alto Almanzora
- 3- Medio Andarax. Río Nacimiento
- 4- Campo de Tabernas
- 5- Costa de Levante
- 6- Alto Andarax
- 7- Bajo Andarax. Níjar
- 8- Campo de Dalías

Provincia de Cádiz:

- 9- Costa Noroeste
- 10- Campiña de Cádiz
- 11- Sierra
- 12- De la Janda
- 13- Campo de Gibraltar

Provincia de Córdoba:

- 14- Pedroches
- 15- Montoro
- 16- Sierra
- 17- Campiña
- 18- De la vega
- 19- Penibética
- 20- Baena
- 21- Montilla
- 22- Lucena

Provincia de Granada:

- 23- Huéscar
- 24- Baza
- 25- Guadix
- 26- Los Montes
- 27- Loja
- 28- De la vega
- 29- La costa
- 30- Las Alpujarras

Provincia de Huelva:

- 31- Sierra oriental
- 32- Sierra occidental
- 33- Andévalo
- 34- Costa
- 35- Condado litoral

Provincia de Jaén:

- 36- Zona occidental de Sierra Morena y campiña norte
- 37- Zona oriental de Sierra Morena y campiña norte
- 38- La Loma Condado y Sierra Mágina Norte
- 39- Sierra Segura-condado
- 40- Sierra de Cazorla
- 41- Sierra Mágina Sur

- 42- Sierra Sur
- 43- Campiña Sur y resto de provincia

Provincia de Málaga:

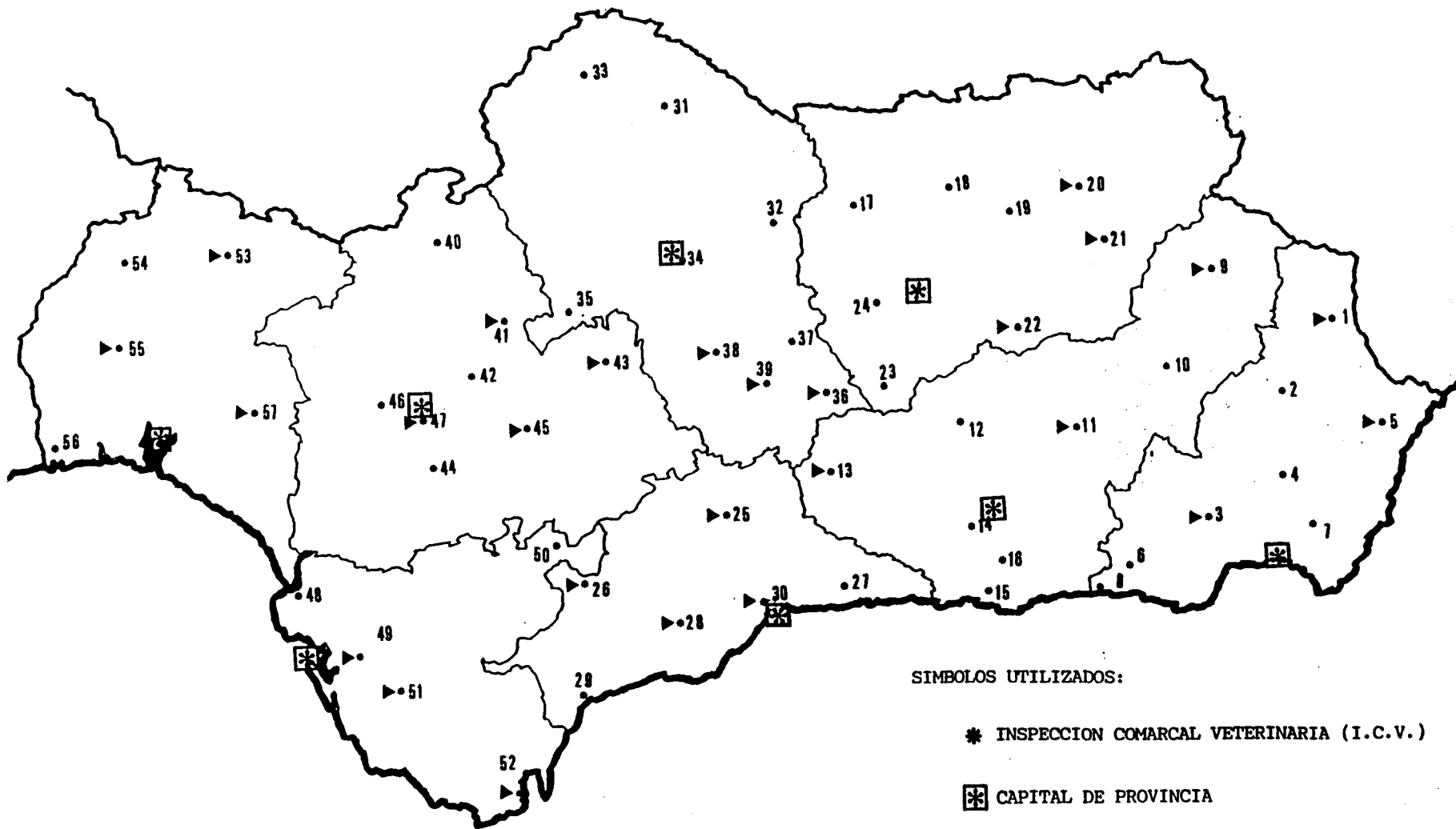
- 44- Antequera
- 45- Serranía
- 46- Axarquía
- 47- Guadalhorce
- 48- Costa de Estepona
- 49- Málaga

Provincia de Sevilla:

- 50- Sierra Norte
- 51- La vega
- 52- Carmona
- 53- Ecija
- 54- Utrera
- 55- Sierra Sur
- 56- Aljarafe
- 57- Sevilla

La distribución de las ICV, pueden observarse en el mapa nº 1, indicándose las ICV que respondieron al cuestionario.

LOCALIZACION DE LAS INSPECCIONES COMARCALES VETERINARIAS EN ANDALUCIA



SIMBOLOS UTILIZADOS:

★ INSPECCION COMARCAL VETERINARIA (I.C.V.)

☒ CAPITAL DE PROVINCIA

▶ I.C.V. QUE CONTESTAN LA ENCUESTA

MAPA n: 1..

1.2. EXPLOTACIONES PECUARIAS

Las vaca lechera de raza frisona son el tipo de vacuno que normalmente más afectado por la theileriosis tropical (cita libro medicina tropical). Se trata de un ganado selecto que, frecuentemente, se introducen nuevos ejemplares desde zonas libres de theileriosis a zonas enzoóticas en las que se quiere mejorar la cabaña en cuanto a su producción lechera. Este tipo de operaciones pueden producir graves problemas y, por consiguiente causar cuantiosas pérdidas económicas en el sector.

Con objeto de conocer el grado del contacto con el parásito que tiene este tipo de ganado situado en una zona endémica, muestreamos un total de 116 vacas de diferentes edades en granjas de la campiña de Jerez. Se tomaron tanto muestras de garrapatas, para tener un conocimiento de las especies que normalmente parasitan a las reses en la citada zona, y de sangre para conocer el nivel de anticuerpos específicos en suero frente a *T. annulata*, por el método I.F.I.

En el citado estudio serológico distribuimos los animales por edades, estableciendo un total de tres grupos:

- * 72 vacas de 3 a 4 años de edad
- * 34 novillas de aprox. 2 años de edad
- * 10 becerras de 9 meses a 1 año de edad.

2. IDENTIFICACION DEL VECTOR DE LA THEILERIOSIS MEDITERRANEA EN ANDALUCIA

Después de identificar la especie de *Theileria* que existe en un área endémica, se debe proceder a la identificación de

la garrapata vectora en ese mismo área (Young, 1981).

En todas las zonas en las que aparece *T.annulata* de una forma endémica, siempre se han implicado como vectores a especies del género *Hyalomma*, que en España no se han encontrado. Es de destacar además, que se encuentra una coincidencia en la distribución de *H. lusitanicum* y *T.annulata* en varias zonas donde se ha detectado una gran frecuencia de casos de la enfermedad (García Fernández y col. 1993).

2.1. IMPLICACION DE *H. lusitanicum* COMO VECTOR DE LA THEILERIOSIS MEDITERRANEA EN ESPAÑA

Para la demostración de que *H. lusitanicum* actúa como vector de la enfermedad en condiciones naturales en nuestra zona realizamos la siguiente experiencia:

Adquirimos un ternero de 3 meses de edad y 146 Kg de peso (res nº 99). Lo transportamos a la Granja Experimental Ganadera de la Diputación de Granada, donde quedó alojado en un compartimento en solitario, alejado del contacto con otros animales.

2.1.1 COMPROBACION DE LA NEGATIVIDAD DEL ANIMAL:

Comprobamos que el citado animal carecía de enfermedades tales como tuberculosis o brucelosis, y, por supuesto, comprobamos que era negativo a *T. annulata*, tanto por la realización de frotis sanguíneos para la búsqueda de formas eritrocíticas del parásito, como en las pruebas serológicas, por el método de I.F.I., frente a antígeno de esquizontes de *T. annulata* (Fujisaki y col., 1988).

2.1.2. ESPLENECTOMIA:

Puesto que se trataba de desarrollar una parasitosis, con objeto de facilitar la aparición de la misma, se practicó la esplenectomía del animal un mes antes de la infección experimental, siguiendo las indicaciones de Fujisaki y col. (1988). De esta operación el animal se recuperó perfectamente y sin complicaciones postoperatorias.

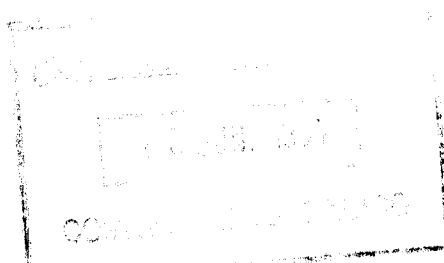
Breve descripción de la operación, en la que se ha seguido básicamente las indicaciones del Manual de la FAO (1988) y la publicación sobre cirugía del ganado bovino de García Sanz (1984):

Se trata de una operación que es más fácil de realizar en los bovinos jóvenes que en los adultos y nos sirve para eliminar una gran parte de la capacidad inmune del animal y favorecer así el desarrollo de una infección parasitaria mayor.

* Preoperatorio: El ternero debe estar en ayunas durante 24h. Para la preparación de la zona se corta el pelo raso afeitando una zona bastante amplia y se aplica un desinfectante (alcohol iodado) inmediatamente antes de la intervención en la zona donde se va a practicar la incisión.

* Anestesia: Se pueden utilizar una gran diversidad de anestésicos, queda a elección del cirujano. En nuestro caso se administró Rompum^R 2 ml y Dexabiopen^R 10 ml (tónico cardíaco) por vía intramuscular.

* Operación: Se desinfecta el material quirúrgico por inmersión en solución bactericida. Se recuesta al ternero sobre su lado derecho. Se hace una incisión de unos 20 cm posterior y paralela a la última costilla. Se diseccionan los músculos



y se procede a la localización del bazo, para ligar los vasos esplénicos. Se extrae el bazo dejando un pequeño pedículo de tejido esplénico para asegurar que la ligadura no resbale fuera de los vasos. La incisión se cierra con una hilera de suturas continuas para músculo y peritoneo, seguida por una sutura convencional de piel.

* Postoperatorio: Inyección intramuscular de penicilina y estreptomina que se repetirá a las 24 y 48 horas con observación de la evolución del animal y aplicación de violeta de genciana y topiciclina sobre la zona de sutura.

2.1.3. RECOGIDA EN EL CAMPO DEL PRESUNTO VECTOR Y SU PREPARACION:

Posteriormente, procedimos a realizar la infección experimental. Para ello seleccionamos 80 adultos de *H. lusitanicum* (72 machos y 8 hembras) parcialmente alimentados sobre una res de raza retinta (res nº 27E) que presentaba una parasitación por *T. annulata* de menos del 0,01% en sangre pero que se encontraba en una zona endémica (FAO, 1988), concretamente en la finca Cabeza de oveja del término municipal de San José del Valle (Cádiz) para esta enfermedad.

Después de ser recogidas, las garrapatas fueron lavadas con una solución antifúngica de nistatina al de 10.000 U/ml y colocadas en tubos de plástico con tapón de algodón y gasa a una temperatura de 28 °C y atmósfera saturada de humedad y en oscuridad siguiendo los trabajos de Hueli (1979; 1984) y Fujisaki y col. (1988). Se mantuvieron en estas condiciones durante 24 horas hasta, que se emplearon para la alimentación.

2.1.4. ALIMENTACION DE LAS GARRAPATAS SOBRE EL ANIMAL SUSCEPTIBLE:

Para esta operación se inmovilizó momentáneamente al ternero, sujetándolo por las fosas nasales con la ayuda de un "narigón". A continuación se sujetaron en las orejas del animal dos bolsas de lino en forma de tubo, pegando un extremo con esparadrapo impregnado con óxido de cinc sobre la piel del animal para, una vez comprobado que la sujeción era firme, se introducir por el otro extremo de la bolsa los tubos conteniendo cada uno 40 ejemplares de *H. lusitanicum* de los que se habían mantenido en el laboratorio. De esta forma se induce a los ejemplares del ixódido a que completan su alimentación de una forma controlada (Kamio y col. 19.)

Fue necesario llevar a cabo la inmovilización parcial de las patas traseras del animal durante el proceso completo de alimentación, para evitar que se retirase las bolsas.

2.1.5. SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE INFECCION:

El conocimiento de la forma en que el proceso de infección podría evolucionar, si es que éste se producía, constituía uno de los objetivos de nuestro estudio. Para hacer un seguimiento de la evolución se tomaron como referencia el control de síntomas clínicos descritos en numerosos trabajos, entre los que destacan las contribuciones de Ouhelli (1985) y Navarrete y col. (1992). Básicamente, el seguimiento fue el siguiente:

* Temperatura rectal.

* Estado de los ganglios linfáticos preescapulares y precurales y en general el grado de adenopatía.

* Punción de ganglios linfáticos cuando estos se observan hipertrofiados para la confección de extensiones en portas, para posterior tinción con solución de Giemsa al 10%. Se observan con el microscopio óptico a 1000 aumentos para la búsqueda de macroesquizontes.

* Extracción de sangre en tubos estériles con anticoagulante (EDTA-K₃), para la confección de frotis sanguíneos, que por tinción de Giemsa al 10%, nos permite la búsqueda de piroplasmas y el cálculo del índice de parasitación por cada 1000 eritrocitos. Con otra alícuota de sangre extraída medimos el hematocrito, para lo cual, se introduce en un capilar tapando posteriormente por un extremo con plastilina y se centrifuga a 7.500 r.p.m. durante 10 minutos, calculandose el porcentaje que ocupa el paquete celular con respecto al total del tubo.

* Extracción de sangre en tubos siliconados estériles sin aditivos para la obtención de suero. Se reparten distintas alícuotas en tubos eppendorf y se mantienen a -20 °C para la posterior determinación del título de anticuerpos frente a *T. annulata* por el método de I.F.I.

* Observación del síndrome hemorrágico que acompaña a la enfermedad en el 30% de los casos y que consiste en la aparición de petequias en la mucosa ocular, bucal y vaginal en las zonas de piel más fina, aunque en nuestro caso los animales de experimentación han sido machos.

* Observación del estado general del animal por la posible aparición de pérdida del apetito, decaimiento, lagrimeo, fluido nasal abundante.

* Observación de síntomas de carácter nervioso, tales como

convulsiones y parálisis, que aparecen en situaciones de extrema gravedad, como paso previo a la muerte.

3. AISLAMIENTO DE *T. annulata in vivo*.

3.1. INFECCION EXPERIMENTAL POR INOCULACION DE SANGRE DE ANIMALES INFECTADOS.

3.1.1. MATERIAL INFECTIVO

Se requiere un animal donador que presente un cuadro agudo de la enfermedad. Este se puede conseguir, bien de forma experimental, o bien mediante la localización de un caso clínico, contando con la ayuda de ganaderos y veterinarios de zonas endémicas a la theileriosis.

La sangre de los animales infectados es invariablemente infectiva para el ganado receptor, pudiendo transmitirse la infección, incluso por cantidades pequeñas de sangre (inferiores a 1 ml). Se extrae la sangre de la vena yugular del animal donador en tubos estériles con anticoagulante (EDTA-k₃) y se transporta al laboratorio, en condiciones de refrigeración, conservandose su capacidad infectiva a 4 °C entre 9 y 11 días, siendo óptima los primeros 5 días (FAO, 1988).

3.1.2. ANIMALES SUSCEPTIBLES

La experiencia de infección experimental por inoculación de sangre la realizamos en 2 fases:

En la primera inoculamos 10 ml de sangre procedente de un

animal que se encontraba en un acceso agudo de theileriosis y que presentaba un I.P. del 13 %.. Fue extraída y transportada como se indica en el apartado anterior, e inoculada 24 horas más tarde. El animal receptor (res nº 97) era un ternero de 3 meses de edad de 145 Kg de peso y que fue seleccionado siguiendo los mismos criterios que en el caso de la res nº 99 del apartado 2.

En el ternero nº 97, al igual que en el caso anterior, se realizó la esplenectomía un mes antes de inocularle la sangre infectiva.

La evolución del proceso fue controlada siguiendo el criterio mencionado en el apartado 2.1.5.

En la segunda experiencia infectamos 2 terneros previamente seleccionados (reses nº 104 y 111), que a diferencia de los anteriores no sufrieron la esplenectomía. Se les inoculó 50 ml de sangre de dos aislados diferentes de *T. annulata* extraídos de sendos animales de experimentación (res nº 99 y res nº 97). La sangre infectiva se extrajo de la yugular de los animales donadores y fué inoculada inmediatamente a los animales receptores por vía intravenosa en la yugular. Posteriormente se procedió a un seguimiento de los animales infectados igual que en el apartado 2.1.5.

Cuando se consigue que se desarrolle la enfermedad de forma que aparezcan formas del parásito en sangre, esta sangre puede servir para provocar futuras infecciones en animales susceptibles. Para disponer de este material infectivo se necesita criopreservarlo, y para ello se sigue la siguiente metodología (FAO, 1988):

- Marcar los criotubos con clave de la cepa de *Theileria* y fecha de congelación.

Material y métodos

- Introducir la barra imantada en el matraz erlenmeyer.
- Añadir 160 ml de sangre al matraz erlenmeyer y dejar el matraz dentro del vaso de un litro con hielo picado.
- Poner el vaso sobre el agitador magnético y enfriar la sangre por agitación durante 10 minutos.
- Añadir lentamente 40 ml de glicerina tamponada a la sangre en agitación. Poner la alarma del reloj a 30 minutos.
- Continuar la mezcla de agitación de la mezcla sangre/glicerina durante 5 minutos.
- Repartir en los crioenvases, cerrarlos y colocarlos a 4 °C hasta que suene la alarma del reloj.
- Para conservarlos a -70 °C, envolver los crioenvases con algodón graso e introducirlos en el congelador a -70 °C durante 3 horas, pasado este tiempo se puede eliminar el algodón.
- Para su conservación en nitrógeno líquido pasarlos en cañas rápidamente mantenidas en los vapores de nitrógeno durante 2 horas y después transferir lentamente a nitrógeno líquido.

La sangre infectada con *T. annulata* conservada a -70 °C o menos, permanece infectante para el ganado vacuno, al menos durante 5 años.

3.2. INFECCION EXPERIMENTAL POR PICADURA DE GARRAPATAS INFECTADAS.

Las garrapatas adultas parcialmente repletas, recogidas del ganado vacuno en áreas enzoóticas, transmiten frecuentemente la theileriosis cuando se deja completar su alimentación con sangre sobre ganado bovino susceptible (FAO, 1988). El método de infección experimental ha sido explicado en el apartado 2 (implicación de *H. lusitanicum* como vector de la theileriosis mediterránea en España).

4. AISLAMIENTO DE THEILERIA ANNULATA *in vitro*

El aislamiento de *T. annulata* se puede hacer por infección *in vitro* de linfoblastos bovinos con esporozoítos procedentes de garrapatas infectadas (Brown, 1987), o también, por aislamiento de linfoblastos infectados con esquizontes de *T. annulata* a partir de animales enfermos de theileriosis.

Cuando se usa como fuente de los parásitos un animal enfermo, el aislamiento puede realizarse bien a partir de sangre parasitada, o bien a partir de órganos del animal, tales como el bazo, el hígado o ganglios linfáticos (Pipano y col., 1989).

4.1. A PARTIR DE SANGRE

Para el aislamiento de *T. annulata* a partir de sangre infectada nos basamos en los trabajos realizados por Pipano y col. (1989).

Localizamos la vena yugular de la res y desinfectamos, con alcohol de 70%, la zona a punzar para extraer la sangre. El

procedimiento consiste en clavar un sistema de doble aguja y dejar que fluya la sangre hacia el exterior arrastrando la posible contaminación introducida en la aguja en el momento de la punción.

Seguidamente, se aplica un tubo tipo "vacutainer" con anticoagulante (EDTA K₃) y a vacío. De esta forma se llenan varios tubos, que son introducidos en un contenedor aislado y refrigerado y se transportan al laboratorio tan rápido como sea posible.

Una vez en el laboratorio se prepara un frotis de sangre utilizando uno de los tubos que no será empleado para el aislamiento. Con el frotis y una tinción rápida por el método DIF QUIK^R constatamos que se trataba de una infección aguda por *T. annulata*, puesto que encontramos un alto porcentaje de eritrocitos parasitados.

El método de DIF QUIK^R consiste en la inmersión del porta primero en la solución fijadora durante 5 segundos, a continuación en la solución 1 durante otros 5 segundos y por último en la solución 2 durante 5 segundos. Se lavar con agua abundante y se deja secar a temperatura ambiente. La observación se realiza con el objetivo de inmersión a 1000 aumentos.

4.1.1. METODO DE AISLAMIENTO

- Se diluye la sangre con solución de PBS en la proporción 1:1.

- Se introduce en un tubo de centrifuga de fondo cónico, una cantidad de solución de Ficoll-paque^R (Pharmacia)

suficiente para que quede en proporción 1:1 con la mezcla anterior.

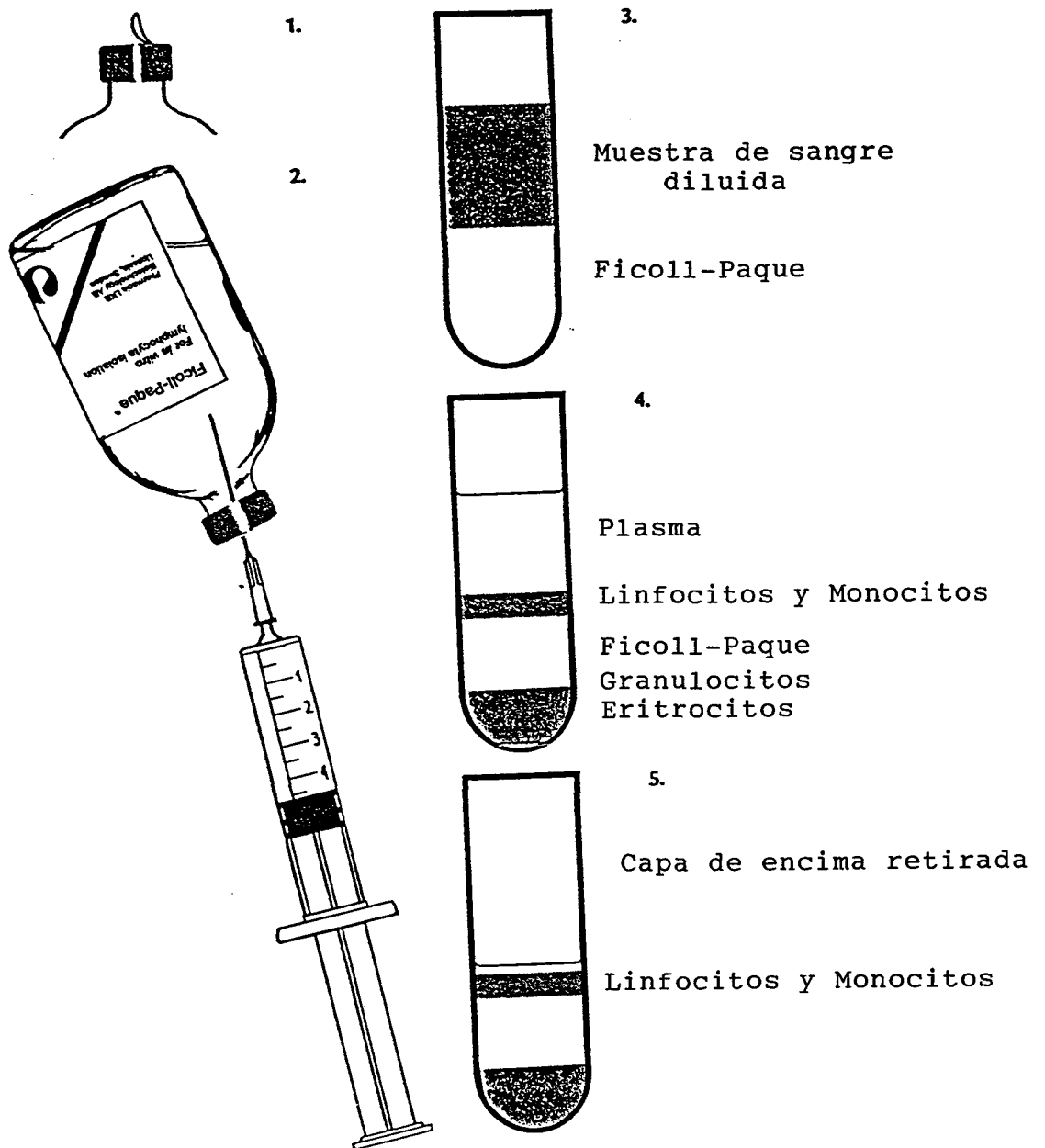
- Sobre la capa de Ficoll-Paque añadimos suavemente, gota a gota y dejando resbalar por la pared del tubo, la mezcla sangre : solución tampón.

- Centrifugamos el conjunto a 500 g durante 20 minutos obteniéndose distintas capas bien diferenciadas:

Una capa superior con plasma sanguíneo.

Una capa fina con los monocitos y linfocitos.

Una fase con los restantes leucocitos y los eritrocitos.



Esquema para la obtención de las células linfoides según el método de Boyum (1968).

- Empleando una pipeta Pasteur recogemos cuidadosamente la capa de monocitos y linfocitos y la transferimos a un nuevo tubo de centrífuga de fondo cónico.

- Añadimos 10 ml de una solución de EDTA-Na₂ al 0,025% (p/v) en PBS, para realizar un lavado por centrifugación a 300 g durante 10 minutos.

- Desechamos el sobrenadante y, seguidamente añadimos medio de cultivo RPMI 1640, para realizar otro lavado en las mismas condiciones de centrifugación que el anterior.

- Resuspendemos el botón en medio de cultivo fresco y la suspensión es transferida a un frasco de cultivo tipo Roux de 25 cm² y lo llevamos a incubar a 37 °C en atmósfera de aire con 5% de CO₂.

- Transcurridas 24 horas, los linfoblastos infectados con esquizontes se han adherido a la superficie del frasco de cultivo. Eliminamos el sobrenadante y añadimos medio de cultivo fresco.

Por observación al microscopio invertido durante los siguientes días, si en la sangre del animal enfermo hay linfoblastos bovinos infectados con esquizontes, deberán aparecer pequeñas colonias de células en zonas puntuales de la superficie de crecimiento del frasco de cultivo.

Durante los primeros días no es necesario cambiar el medio de cultivo, puesto que el número de células es muy pequeño y por lo tanto el consumo de nutrientes es bajo, con lo cual es preferible, para el establecimiento del cultivo, ir permitiendo que se alcance una densidad celular cada vez mayor.

Cuando se obtiene una monocapa semiconfluente, se puede considerar el cultivo establecido, y es conveniente subcultivar a nuevos frascos de cultivo, para obtener masa, de forma que podamos destinar algunos frascos para criopreservar y asegurar así la conservación de la cepa en caso de una posible contaminación.

4.2. A PARTIR DE GANGLIO LINFÁTICO

Para el aislamiento de *T. annulata* a partir de ganglios linfáticos nos basamos en los trabajos de Van Den Ende y Edlinger (1971).

En nuestro caso hemos partido preferentemente de ganglio precural. Para ello se comprobó, por palpación y exploración de la región, que los ganglios se encontraban inflamados. Seguidamente, procedimos a afeitar la zona de punción y a desinfectarla mediante aplicación de una torunda de algodón con tintura de yodo y con alcohol de 70%.

Con jeringa y aguja estériles tomamos 1 ml de solución salina isotónica estéril. Sustituimos la aguja usada por una nueva de 18 gauges, procediendo a inocular la solución salina en el interior del ganglio, mientras éste es sujetado firmemente con los dedos índice y pulgar de la otra mano. De inmediato succionamos con la jeringa. De esta forma conseguimos recoger parte de la solución inoculada y parte del contenido del ganglio linfático.

La aguja se encapucha de nuevo y el conjunto se transportado al laboratorio en condiciones de máxima asepsia.

Material y métodos

Una vez en el laboratorio, se trabaja en condiciones de esterilidad. La aguja usada para la punción es nuevamente retirada y sustituida por una nueva estéril. Pasamos el contenido de la jeringa a un tubo de centrifuga estéril y se añade a éste 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 adicionado de suero bovino fetal inactivado (SBFI) en un 16,66% v/v.

Para prevenir la proliferación de algún microorganismo contaminante debido al proceso de manipulación en la extracción y transporte, se añade un antibiótico de amplio espectro, como la gentamicina, a una dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$, así como anfotericina B 100 $\mu\text{g/ml}$.

Centrifugamos a 400 x g durante 10 minutos y deseamos el sobrenadante. Añadimos 5 ml del medio de cultivo y resuspendemos el pequeño botón celular. Transferimos la suspensión a un frasco de cultivo tipo Roux de 25 cm^2 .

Transcurridas 24 horas, se observa el frasco de cultivo mediante la utilización del microscopio invertido a 400 aumentos para determinar la presencia de células, si bien en este momento es difícil saber si se trata de linfoblastos infectados o de linfocitos. Para empezar a descartar otras células contaminantes del aislamiento, se retira el sobrenadante y se añade medio de cultivo fresco (Pipano y col., 1989).

Transcurridos 2 días, retiramos el sobrenadante, enjuagamos con PBS y añadimos medio de cultivo RPMI 1640 adicionado de penicilina 100 UI/ml, estreptomycinina 100 $\mu\text{g/ml}$ y anfotericina B 100 $\mu\text{g/ml}$, para evitar así posibles contaminaciones bacterianas y micóticas por manipulación en el proceso de cultivo.

En este momento del aislamiento, para estimular la división celular, se adiciona al medio un mitógeno, concanavalina A a una concentración de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (Shiels y col., 1986; Baldwin y col., 1987), ya que a pesar de estar infectadas las células con el parásito, la concentración celular es tan baja que se corre el riesgo de que el cultivo fracase, con la consiguiente pérdida del aislamiento. Por esta razón puede ser conveniente estimularlo artificialmente.

Transcurridos aproximadamente 7 días, y una vez que observamos la aparición de una colonia de linfoblastos fijada a la superficie del frasco de cultivo en la que día a día constatamos el aumento el número de células, retiramos el sobrenadante y añadimos nuevo medio de cultivo, ahora sin mitógeno.

En los días siguientes, la colonia celular va aumentando, de forma que las células empiezan a amontonarse. En este momento, con una simple agitación vigorosa del frasco de cultivo, lograremos desprender numerosas células de la colonia que no sólo dejarán huecos suficientes para que ésta siga creciendo adecuadamente, sino que al mismo tiempo se establezcan en otras zonas de la superficie del frasco, dando lugar a nuevas colonias.

Procediendo de esta forma llega un momento en que las colonias empiezan a confluir, formando una monocapa que ocupa prácticamente toda la superficie del frasco de cultivo. Posteriormente se debe subcultivar a nuevos frascos de cultivo la línea celular, que ya se puede considerar establecida.

4.3. MANTENIMIENTO EN CULTIVO DE LINFOBLASTOS BOVINOS INFECTADOS CON ESQUIZONTES DE *T. annulata*.

4.3.1. METODO DE CULTIVO

Los requerimientos de los cultivos de este tipo son fundamentalmente el de un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de células animales en monocapa. En nuestro caso se ha empleado RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal en un 16,66% (v/v). Además, se adiciona HEPES para una concentración final de 25 mM, bicarbonato sódico en una proporción de 2000 mg/litro y L-glutamina. Aunque estos dos últimos componentes son propios del medio de cultivo empleado, se suelen adicionar una vez preparado por problemas de estabilidad. También se adiciona al medio una solución de antibióticos constituida normalmente por penicilina/estreptomina en la proporción de 100 UI/ml y 100 µg/ml, respectivamente. También se puede añadir una solución de anfotericina B 100 µg/ml para prevenir la aparición de hongos.

El suero bovino fetal que se añade se inactiva al baño de maría a 56 °C durante 30 minutos.

El medio de cultivo se ajusta a pH 7,4, utilizando soluciones de ClH 1 N y NaOH 1 N.

Seguidamente se procede a la esterilización del medio por filtración a través de una membrana de 0,22 µm de tamaño de poro con ayuda de una bomba de vacío.

Una vez preparado el medio se conserva a una temperatura de 4 °C en un refrigerador convencional.

Los frascos de cultivo habitualmente empleados son frascos tipo Roux con una superficie de cultivo de 25 cm² o de 75 cm².

Las células se cultivan en un incubador de CO₂ de doble camisa, a 37 °C, en una atmósfera cuya composición es de 95% de aire y 5% de CO₂.

Una vez que se consigue una monocapa de células confluyente, debemos proceder a subcultivar. Para realizar el subcultivo seguimos la metodología de Pipano (1984) y Brown (1987).

- Se elimina el sobrenadante del medio de cultivo y se añade PBS para lavar la monocapa por enjuague suave y posterior retirada del líquido.

- Se añade una solución de citrato sódico en cantidad suficiente para cubrir la monocapa, dejándola actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- Se recoge la solución y se hace un recuento utilizando la cámara de Neubauer, para ajustar la concentración a 5×10^5 células/ml mediante la adición de medio de cultivo fresco.

- Se reparte alicuotas de 5 ml en frascos de cultivo.

En el momento del subcultivo es conveniente hacer de forma periódica un control del estado de las células. Para esto se toma una muestra se coloca sobre un porta para hacer una tinción de Giemsa una vez que se haya secado. Otra gota se introduce en un tubo eppendorf. Mediante la tinción, se comprueban las características morfológicas de las células hospedadoras y del parásito. En el tubo se añade una cantidad equivalente de azul tripán y se mezcla bien por pipeteo. Con

la suspensión conseguida, se toma una gota, la colocamos en la cámara hemocitométrica y al microscopio se hace un contaje para determinar el porcentaje de células vivas, que serán aquéllas que no se tiñan de azul.

En este tipo de cultivos el medio debe ser renovado tres veces en semana.

4.3.2. CRIOPRESERVACION DE ESQUIZONTES DE *T. annulata*

La criopreservación de esquizontes de *T. annulata* tiene un gran interés por varias razones:

- Cuando se consigue establecer una línea celular infectada por *T. annulata*, siempre se corre el riesgo de perderla por contaminación u otros factores imprevistos y, por lo tanto, es conveniente tener cuanto antes una reserva de la cepa aislada, conservada en nitrógeno líquido para estar seguros de no perderla.

- Los linfoblastos bovinos parasitados por *T. annulata* también son empleados para preparar antígeno (FAO, 1988), que posteriormente se usa en el diagnóstico inmunológico de la enfermedad. Por lo tanto es necesario disponer de una reserva de células que nos permitan ir preparando lotes de antígeno a medida que lo vamos necesitando en el trabajo del laboratorio.

- El tener una cepa de *T. annulata* en cultivo nos da la posibilidad de obtener una vacuna frente a la enfermedad por el método de mantenimiento prolongado de los esquizontes en cultivo y su consiguiente atenuación de la virulencia. Para conseguir esto, es necesario mantener un cultivo sometiéndolo a pases sucesivos, de 30 a 300 dependiendo de la cepa no

estando relacionado con la virulencia inicial de la misma (Pipano, 1981).

Este proceso no está libre del riesgo de contaminación y pérdida del cultivo en cualquier momento y con ello perder el grado de atenuación de la virulencia conseguido hasta ese momento. Para evitar tener que empezar todo el proceso desde el principio, es conveniente ir criopreservando cultivos a lo largo de todo el proceso de atenuación cada 10 pases (Pipano, 1989), con lo cual, ante cualquier eventualidad, partiríamos de un cultivo con esquizontes de virulencia ya parcialmente atenuada, con el ahorro de tiempo que ello supone.

El método empleado para la criopreservación es el siguiente:

- Se seleccionan cultivos que se encuentren en monocapa creciendo en fase logarítmica.

- Se descarta el sobrenadante de medio de cultivo, en el que hay células que ya han empezado a degenerar, seleccionando así aquéllas que se encuentran fijadas a la superficie de crecimiento del frasco.

- Se añade solución de PBS, previamente atemperada a 37 °C en baño de maría, en cantidad suficiente para cubrir sobradamente la monocapa celular. Con un enjuague suave y se elimina la solución añadida. Con esto se retiran restos celulares que hayan podido quedar adheridos, así como productos del metabolismo celular secretados al medio de cultivo durante el desarrollo de las células.

- Seguidamente se añade suficiente solución de citrato sódico para que cubra ligeramente toda la monocapa celular,

Material y métodos

dejándose actuar de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.

- Transcurrido este tiempo se somete a una ligera agitación, comprobándose que la práctica totalidad de las células de la monocapa se han desprendido, porque la solución añadida totalmente transparente, se torna muy turbia. Además se puede constatar este hecho por observación al microscopio invertido, donde se vé que todas las células se encuentran en suspensión.

- Se recoge la citada suspensión con ayuda de una pipeta Pasteur y se transfiere a un tubo universal de fondo cónico estéril.

- Se centrifuga a 400 g durante 10 minutos.

- Se desecha el sobrenadante y se resuspende el botón celular en medio de cultivo completo adicionado de un crioprotector como el dimetil sulfóxido (DMSO) al 8% a 4 °C.

- Se toma una muestra y se hace un recuento en una cámara de Neubauer. Se ajusta la concentración a 5×10^6 células/ml y se reparte la suspensión en alícuotas de 1 ml, en tubos estériles para criopreservación de 2 ml de capacidad.

- Se coloca los tubos en un refrigerador convencional a la temperatura de 4 °C durante 20 a 30 minutos.

- Después se pasa la caja con los criotubos al interior de otra caja de polispan y se guardan en un armario congelador a -70°C durante toda la noche.

- Al día siguiente se toman los criotubos y se llevan rápidamente a la cámara fría donde se encuentra el contenedor

de nitrógeno líquido.

- Se colocan los criotubos en cánulas de aluminio y éstas son introducidas en el contenedor de nitrógeno líquido.

Es muy importante anotar en los criotubos un número de referencia que nos sirva para identificar el contenido en cantidad de células, la cepa de *T. annulata* y la fecha en que se ha realizado la criopreservación.

En estas condiciones el cultivo puede almacenarse sin sufrir deterioro.

Recuperación de cultivos de *T. annulata* criopreservados:

- Se prepara un baño con agua a 37 °C.

- Se saca el cestillo donde está el criotubo correspondiente a la cepa y pase deseado y con la ayuda de pinzas y guantes se toma la cánula de aluminio y se extrae el criotubo.

- El criotubo es introducido en el baño de forma que sólo esté en contacto con el agua la base del mismo, y no la parte del tapón y la rosca para evitar riesgos de contaminación.

- Una vez que se ha descongelado el contenido, se seca el criotubo y se lleva a la cabina de flujo laminar para abrirlo.

- Se recoge el contenido con una pipeta Pasteur y se transfiere a un tubo estéril de centrífuga.

- Se toma otro volumen equivalente de medio de cultivo fresco y se introduce en el criotubo que tras varios pipeteos

es extraído de nuevo para recuperar la práctica totalidad de las células contenidas en el mismo. Este segundo volumen de medio es introducido en el tubo de centrifuga y se centrifuga todo a 400 g durante 10 minutos.

- Se retira el sobrenadante y el botón celular es resuspendido en medio fresco para volver a centrifugar bajo las condiciones anteriores.

Toda esta fase se debe realizar con la máxima celeridad ya que el DMSO es tóxico para las células a la temperatura de trabajo, lo que podría conducirnos al fracaso en el proceso de recuperación del cultivo.

- Una vez concluida la segunda centrifugación, se elimina el sobrenadante y se resuspende el botón celular en 5 ml de medio de cultivo fresco.

- Se toma una muestra con pipeta Pasteur y se mezcla, en un tubo eppendorf, con una cantidad equivalente de solución de azul tripán. se toma una gota de la mezcla y se lleva a una cámara de recuento celular para evaluar el porcentaje de células vivas en el cultivo recién iniciado. Deberemos tener un porcentaje aproximado al menos del 85% para dar por bueno el proceso.

- Las células, resuspendidas en medio de cultivo son transferidas a un frasco de cultivo tipo Roux de 25 cm², colocándose en posición horizontal en un incubador de CO₂ y a temperatura de 37 °C.

- Transcurridas 24 horas se comprueba que hay células adheridas a la superficie del frasco de cultivo mediante la observación de éste en el microscopio invertido.

- Se elimina el sobrenadante y se añade medio de cultivo fresco. A partir de este momento se seguirá el procedimiento de cultivo normal y en pocos días se obtendrá una monocapa celular que deberá ser subcultivada a nuevos frascos.

5. IDENTIFICACION DEL PARASITO AISLADO

Una vez que se ha conseguido realizar el aislamiento debe confirmarse que el cultivo es realmente de *T. annulata*, puesto que hay otros agentes infecciosos que pueden parasitar linfoblastos que permiten mantener una línea celular linfoblastoide.

5.1. MICROSCOPIA OPTICA

Para la identificación de *T. annulata* el método más empleado y más simple es la tinción de los linfoblastos bovinos con colorante de Giemsa al 10%. La metodología empleada consiste:

- Comprobar con el microscopio invertido que hay células redondas y brillantes flotando libremente.

- Recoger 4-5 ml de sobrenadante del medio de cultivo usando una pipeta Pasteur e introducir en un tubo de fondo cónico.

- Dejar sedimentar durante 24h.

- Elimina el sobrenadante por simple volcado suave del tubo.

- Añadir al tubo un volumen de 6-7 ml de solución tampón (PBS pH 7,2) y resuspender las células con un agitador de tubos.

- Verter la suspensión sobre un porta situado en las barras paralelas de la cubeta de tinción.

- Transcurridos 20 minutos, retirar el líquido que hay sobre el porta por suave volcado y dejar secar a temperatura ambiente el porta impregnado de células.

- Fijar con metanol durante 3 minutos cubriendo totalmente la preparación.

- Teñir con solución de Giemsa al 10% durante 20 minutos.

- Lavar con agua del grifo y dejar secar al aire.

- Observar con objetivo de inmersión los esquizontes teñidos de color azul violáceo, destacando sobre todo los núcleos en el interior del citoplasma de la célula linfoblastoide claramente diferenciados del núcleo del linfoblasto.

5.2. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Según Chema y Brocklesby (1981), el método de I.F.I. es el adecuado para la confirmación de las especie de *Theileria* que hay en una zona endémica a la theileriosis, incluso habiendo varias especies coexistiendo.

Para comprobar que efectivamente los esquizontes observados por tinción de Giemsa y microscopía óptica son de

Material y métodos

T. annulata, se realiza el enfrentamiento de las células que se mantienen en cultivo con un suero control positivo con anticuerpos frente a *T. annulata*, a la vez que paralelamente se sigue el mismo proceso con un cultivo celular de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *T. annulata*, amablemente cedidos por el Dr. E. Pipano del Kimron Veterinary Institute de Israel.

Se selecciona un cultivo en ambos casos como en el apartado 5.2. y se procesa de la siguiente forma:

- Se elimina el sobrenadante.
- Se añade PBS a pH 7,2 para enjuagar.
- Se añade solución de citrato durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se agita suavemente y se recoge la suspensión celular.
- Se centrifuga a 400 g durante 10 minutos.
- Se resuspende el botón celular en PBS y se ajusta la concentración celular a 5×10^5 células en 1 ml.
- Se ponen unas gotas de la suspensión sobre cada pocillo de un porta con pocillos y se dejan secar a temperatura ambiente.
- Se fija por inmersión del porta en acetona durante 10 minutos.
- Se procesa la muestra como en el apartado 6 empleando un suero control positivo para observar la fluorescencia

específica de los esquizontes dentro de la célula.

Paralelamente se somete a las mismas pruebas a la cepa procedente de Israel, ya identificada como *T. annulata*.

6. PRUEBA DE DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (I.F.I.)

La prueba se puede preparar siguiendo varios protocolos, y en nuestro caso hemos seguido básicamente con algunas modificaciones propias, el descrito en el manual de la FAO.

6.1. PREPARACION DEL ANTIGENO

Para la obtención del antígeno se mantiene un cultivo celular de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *T. annulata* cepa "Algar".

- Partiendo de un frasco de cultivo, se elimina el sobrenadante y se lava la monocapa celular con 5 a 10 ml de PBS.

- Se retira el PBS y se añade 1 ml de Versene^R (solución de EDTA al 0,025% en PBS pH 7,2) a los frascos de cultivo celular de 25 cm² y se deja en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente.

- Posteriormente se dispersan las células por agitación y se lavan dos veces con 10 ml de PBS por centrifugación a 400 g durante 10 minutos.

- El botón celular se resuspende en 10 ml de formol al

0.5% y se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos.

- Se centrifuga la suspensión a 400 g durante 10 min. y se desecha el sobrenadante. El sedimento se lava dos veces con PBS centrifugando a 400 g durante 10 min. y a continuación se resuspende en PBS.

- Se hace un recuento celular en una cámara Neubauer. La suspensión celular se ajusta a una concentración de 5×10^5 células/ml mediante adición de PBS.

- Con esta suspensión celular se preparan los portas de inmunofluorescencia (porta-antígeno) añadiendo a cada pocillo del porta 0,01 ml de la suspensión.

- Se dejan secar a temperatura ambiente, se fijan con acetona pura por inmersión del porta durante 10 minutos.

- Envueltos en papel de aluminio, se introducen en frascos con un adsorbente de la humedad (silicagel) y se conservan a -20°C hasta su utilización.

6.2. PREPARACION DE SUERO CONTROL POSITIVO

Para la obtención de suero control positivo frente a *T. annulata* se necesita un animal recobrado de una infección pura. Para ello, se mantienen animales infectados por pases sucesivos mediante inoculación de sangre parasitada, inyección de un homogeneizado de glándulas salivales de *H. lusitanicum* infectadas, o bien mediante inoculación de cultivos celulares infectados con esquizontes de *T. annulata*. Para la obtención de tales cultivos, se inocula un becerro de 6 meses de edad vía intramuscular, con linfoblastos infectados con esquizontes, de

virulencia parcialmente atenuada, de la línea celular que empleamos como antígeno. Estos dan lugar a un pequeño acceso de la enfermedad en el animal, con la consiguiente inflamación de los ganglios linfáticos superficiales próximos a la zona de inoculación. Siguiendo la metodología de Van den Ende y Edlinger (1971), por punción ganglionar podemos aislar y llegar a establecer una nueva línea celular en la que tendremos esquizontes de la misma cepa que empleamos como antígeno. Inoculando esta nueva línea celular a un nuevo ternero, en un período aproximado de 40 días podemos obtener suero control positivo frente a la cepa que empleamos como antígeno. Con este procedimiento se aminora la fluorescencia inespecífica propia de la célula hospedadora (linfoblasto) y se gana en especificidad frente a los antígenos propios del esquizonte.

6.3. PREPARACION DE SUERO CONTROL NEGATIVO

Para el suero control negativo, se utiliza suero bovino de terneros mantenidos en ambientes exentos de garrapatas que resulten negativos en los análisis serológicos específicos frente a *T. annulata*, y que procedan de madres carentes de anticuerpos contra el parásito. Preferentemente deben de ser de zona no endémica a la theileriosis bovina.

6.4. EJECUCION DE LA PRUEBA DE DIAGNOSTICO

- Sacar los porta-antígeno del congelador y dejar atemperar.

- Hacer dobles diluciones de los sueros problemas con PBS pH 7,2 partiendo de la dilución 20, así como de los sueros control positivo y negativo.

Material y métodos

- Colocar las diluciones de los sueros problemas de manera progresiva y creciente en los pocillos del porta, reservando la primera fila de pocillos para los sueros control.

- Incubar el porta en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.

- Realizar tres lavados con PBS pH 7.2 de 5 minutos cada uno con agitación a temperatura ambiente.

- Dejar secar los portas al aire con ayuda de un ventilador.

- Colocar en cada pocillo una gota de conjugado fluorescente (inmunoglobulina antibovina marcada con isotiocianato de fluoresceína), previamente diluido 1/100 en PBS pH 7,2. Opcionalmente añadir al conjugado fluorescente diluido Azul de Evans al 0,01% como tinción de contraste.

- Colocar el porta en incubación en cámara húmeda y obscuridad a 37°C durante 30 minutos.

- Realizar tres lavados con PBS pH 7.2 de 5 minutos cada uno con agitación a temperatura ambiente.

- Secar el portaobjetos al aire con ayuda de un ventilador.

- Montar el porta con glicerina tamponada (glicerina: PBS, 9:1 pH 7,2) y colocar un cubre objetos.

- Observar con microscopio de fluorescencia a 400 aumentos en cuarto oscuro.

- La prueba debe leerse en el momento o antes de 24 horas si se conservan las preparaciones a 4 °C y en obscuridad.

- Los sueros de los animales infectados por *T. annulata* así como los sueros controles positivos dan lugar a una reacción que emite fluorescencia amarilla al ser estimulados con luz ultravioleta.

- Por el contrario, los sueros control negativos, así como los sueros procedentes de animales no infectados con *T. annulata* no emiten fluorescencia.

7. CARACTERIZACION DE LA CEPA AISLADA

En nuestro caso pretendemos comparar un aislado de *T. annulata* de España, con el que nos proponemos obtener una vacuna frente a la theileriosis tropical en nuestro país, con un aislado procedente de otra zona endémica alejada y en la que se ha desarrollado la vacuna con anterioridad. El objetivo de esta comparación es comprobar simplemente que el aislado español es diferente al exótico.

Según las investigaciones de otros autores, en el estudio del polimorfismo isoenzimático, aplicado a la caracterización de cepas de *Theileria*, se ha demostrado que sólo un enzima, la glucosa fosfato isomerasa (GPI), tiene valor taxonómico (Melrose y col., 1980; Van den Meer y col., 1981; Melrose y col., 1984).

Para este trabajo hemos empleado tres líneas celulares:

- La línea celular 28E constituida por linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *T. annulata* autóctonos

y que por tanto son el objeto de nuestro estudio.

- La línea celular P-179, que es también una línea linfoblastoide parasitada por *T. annulata*, procedente de Israel y amablemente cedida por el Dr. E. Pipano del Kimron Veterinary Institute (Israel).

- La línea celular establecida a partir de un linfosarcoma bovino, denominada BL-20 (amablemente cedida por el Dr. B.R. Shiels del Departamento de Parasitología Veterinaria de la Universidad de Glasgow, Escocia). Esta línea celular no parasitada, nos servirá como control para diferenciar los enzimas de la célula hospedadora de los del parásito.

7.1. ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

7.1.1. PREPARACION DE LA MUESTRA:

Para esta operación se necesita tener masa suficiente de cultivos. Se seleccionan aquellos que están en fase exponencial de crecimiento y se procede de la siguiente manera:

1.- Retirar el sobrenadante de los frascos de cultivo, lavar con solución de PBS de pH 7.2 y tratar con solución de citrato para recoger la suspensión celular.

2.- Hacer un recuento en cámara de Neubauer para calcular el número de células que hay en la suspensión.

3.- Transferir la suspensión a un tubo universal de fondo cónico previamente pesado y centrifugar a 400 x g durante 10 minutos.

4.- Retirar el sobrenadante y resuspender el botón celular en PBS para lavar en las mismas condiciones de centrifugación. Se realiza esta operación dos veces.

5.- Una vez eliminado el sobrenadante volver a pesar el tubo de centrífuga para saber, por diferencia con la pesada anterior, el peso del botón celular utilizado.

6.- Para el lisado de las células se tratan durante 5 minutos con una solución de tritón X-100 al 5% en agua destilada, resuspendiendo el botón celular en una cantidad equivalente en volumen de esta solución.

7.- Las muestras se conservan en forma de "perlas". Para la formación de éstas, tomar alícuotas de 50 μ l del lisado celular con una micropipeta calibrada y dejarlas caer sobre nitrógeno líquido, produciéndose la brusca congelación de las gotas, lo que permite la ruptura de las células que pudieran haber quedado indemnes del anterior tratamiento con el tensioactivo, quedando como bolitas blancas y sólidas ("perlas").

8.- Con ayuda de unas pinzas, transferir las "perlas" a criotubos debidamente etiquetados con el código de la cepa y la fecha de preparación de los extractos, y conservar a -70°C si nos encontramos en la víspera de la realización de la electroforesis, o bien, en nitrógeno líquido si se van a conservar durante más tiempo.

LOS ENZIMAS:

La nomenclatura oficial de los enzimas está controlada por el NOMENCLATURE COMMITTEE FOR THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY, que se reúne regularmente y establece para cada

enzima un nombre recomendado seguido de un código de identificación que comprende las letras E.C. (de "Enzyme Comission") seguidas de cuatro números separados por puntos; cada número hace referencia a una división o subdivisión basada en el modo de acción de los enzimas. El nombre dado para los mismos es muy largo y normalmente se utilizan abreviaturas que no se basan en reglas precisas y siempre deban referirse al número E.C. para evitar confusiones.

En nuestro caso, el análisis electroforético se basa en las diferencias mostradas en la movilidad de la GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA (GPI), cuyo código de identificación es E.C. 5.3.1.9, en las diferentes cepas de *T. annulata* (UILENBERG, 1981).

7.1.2. METODOS Y TECNICAS DE ESTUDIO. ELECTROFORESIS EN GEL DE ALMIDON

7.1.2.1. ETAPAS EN LA REALIZACION DE LA ELECTROFORESIS

La realización de la electroforesis en geles de almidón comprende 5 etapas (N.Pasteur y cols.1987):

- a.-Preparación de los extractos proteicos.
- b.-Preparación de las soluciones tampón y de los geles de almidón.
- c.-Introducción de los extractos en los geles y puesta bajo tensión de estos últimos o electroforesis propiamente dicha.
- d.-Revelado de las proteínas a estudiar.

e.-Interpretación de los zimogramas.

7.1.2.2. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS

Los extractos proteicos son preparados a partir de cultivos celulares según la técnica de Melrose y col. (1984) y de Maazoun y col. (1981), y conservados en nitrógeno líquido.

La víspera a la realización de la electroforesis proceder a transferir las "perlas" que se necesiten a tubos eppendorf rotulados con el número de referencia de la cepa a estudiar y introducirlos en el congelador.

Al día siguiente, transportar los tubos eppendorf sobre batea con hielo picado y proceder a realizar una centrifugación a 4.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.

7.1.2.3. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES TAMPON Y DE LOS GELES

Soluciones tampón.

Un sistema de tampones de electroforesis comprende dos soluciones, una que sirve para confeccionar el gel, de ahí su nombre de "tampón de gel", y otra que baña los electrodos y que sirve para establecer la unión entre éstos y el gel; es el "tampón de electrodos".

La electroforesis se realizada "en sistema continuo" si los tampones sólo difieren en su concentración (la solución más concentrada será el tampón de electrodos), y en "sistema

discontinuo" si los tampones tienen composición diferente. En nuestro caso la electroforesis se lleva a cabo en "sistema continuo".

Para designar los sistemas tampón se utilizan una serie de siglas, que comprenden la primera letra de los productos químicos que los componen, y una cifra, que corresponde al pH de los mismos; hay muchos sistemas tampón diferentes y la elección de uno u otro viene dictada por la mejor separación electroforética de las enzimas estudiadas y por el revelado de bandas netas y bien separadas (Pasteur y col., 1987). En nuestro caso hemos utilizado la solución TME 7,4 (tris-maleato-EDTA, pH = 7,4). La "solución tampón del gel" se compone de TME 7,4 y NAD⁺, que se incorpora con objeto de intensificar la coloración de las bandas.

Preparación de los geles de almidón.

La utilización del almidón como soporte para la electroforesis y su preferencia, en general, con respecto a otros, como la poliacrilamida, se basa en una serie de consideraciones:

- Es el medio menos caro, pues de cada gel se pueden obtener numerosas láminas, en cada una de las cuales se pueden emplear unas condiciones de revelado.

- No exige un aparataje complejo.

- No es tóxico.

- Por último, y muy importante, los resultados que el almidón permite obtener son excelentes, tan buenos como los

obtenidos con la poliacrilamida (Pasteur y col., 1987).

Los geles de almidón se preparan con la fécula de patata hidrolizada y la solución tampón del gel escogida; el almidón se puede adquirir a través de casas comerciales, o bien se lo puede fabricar uno mismo a partir del producto bruto.

Los geles son preparados al 10%, mezclando en un erlermeyer el almidón y el tampón del gel; esta mezcla es calentada sobre el mechero de gas, agitando constantemente. A partir de que la mezcla cambia de consistencia, se continúa el calentamiento durante 30 segundos, agitando muy frecuentemente. Después se desgasifica, utilizando la trompa de agua, y se vierte en el molde horizontal, previamente desengrasado con alcohol de 70%, sobre el cual colocamos la placa de vidrio. Dejamos enfriar a temperatura ambiente; el almidón polimeriza y se forma el gel, que será recubierto de una película de plástico para evitar su desecación (que podría producir distorsiones en la migración de las proteínas).

Los geles de almidón se preparan la víspera de su utilización.

7.1.2.4. ELECTROFORESIS PROPIAMENTE DICHA

Cada manipulación debe ser registrada sobre una ficha o formulario, que permite anotar las características del sistema de tampones, la lista de cepas en el orden en el que se han introducido en el gel de izquierda a derecha, los revelados que serán realizados, el voltaje, el amperaje, la potencia, y la hora a la que comenzó la migración electroforética, así como aquella a la que se dió por terminada.

7.1.2.4.1. INTRODUCCION DE LOS EXTRACTOS EN LOS GELES

Los geles preparados el día anterior, son inicialmente introducidos en el frigorífico, a 4°C, durante una media hora, con el fin de conservar la integridad de las isoenzimas durante la manipulación.

Los tubos eppendorf conteniendo las perlas son colocados en una gradilla e introducidos en el hielo picado; se procede seguidamente, como ya se ha indicado, a una centrifugación de los mismos, a 4.000 rpm durante 5 minutos. Tras la centrifugación, los tubos eppendorf son colocados de nuevo en el hielo picado, en el orden indicado en el ficha de electroforesis.

Ayudándonos con la "regla" procederemos a excavar en el gel, con el "peine", 12 frentes verticales. Los dientes del peine habrán sido humedecidos previamente con azul de bromofenol; éste, por la movilidad electroforética que lo caracteriza, constituye el indicador del frente de migración.

Los rectángulos de papel Whatman, embebidos en el extracto proteico, se introducen con ayuda de unas pinzas en las rendijas realizadas con el peine en el gel.

Finalmente, cada molde se etiqueta con el número de gel inscrito en la ficha de electroforesis.

7.1.2.4.2. MIGRACION ELECTROFORETICA

El molde, conteniendo el gel, es situado en la cubeta de electroforesis, en la que previamente se ha introducido el tampón de electrodos; la muestra deberá quedar junto al cátodo.

El contacto entre el tampón de electrodos y el gel es asegurado por las esponjas, que actuarán de puente de unión. Sobre el conjunto se coloca la placa de cristal y sobre ella el acumulador de frío. La cubeta es introducida en el frigorífico para asegurar la refrigeración del sistema. Los electrodos son entonces conectados a los bornes del generador; el producto del voltaje (V) por la intensidad (mA) no debe superar 10.000 (10W).

La migración electroforética debe ser detenida cuando el azul de bromofenol haya migrado unos 7 cm.

En nuestro caso, para unos valores óptimos de 70-75 V, 90-70 mA y 5-7 W, la migración dura entre 6 y 7 horas.

7.1.2.4.3. REVELADO ENZIMATICO

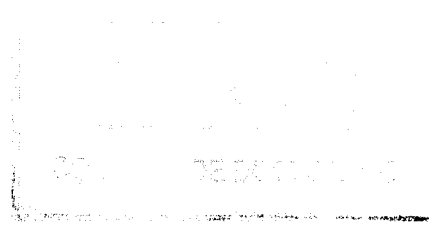
En el mismo lugar en el que han sido depositadas tras la migración electroforética, en presencia de su substrato y de diversos compuestos necesarios para su actividad (coenzimas, iones, etc.), las enzimas catalizan la siguiente reacción general:

SUBSTRATO <-----> PRODUCTO

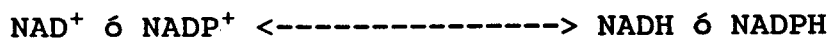
COENZIMA

COENZIMA MODIFICADO

Es suficiente que uno de los compuestos de la reacción sea coloreado, o bien se pueda colorear, para poder poner en evidencia el lugar donde ha migrado el enzima. En nuestro caso, para revelar la actividad enzimática hemos utilizado "el sistema tetrazolio": NBT (Nitroazul de tetrazolio) o MTT (Metil-Tiazolil tetrazolium), y PMS (metasulfato de Fenacina).

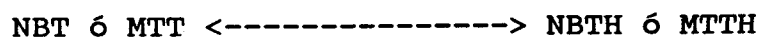


El esquema de las reacciones que tienen lugar es el siguiente:



PMSH

PMS



(Formazán => precipitado azul)

Esta reacción podrá ser usada si el enzima utiliza el NAD^+ o el NADP^+ como aceptor de un átomo de hidrógeno (H) del substrato; en caso contrario, es posible deshidrogenar el producto de la reacción usando un segundo enzima que sí utilice esos coenzimas, como sucede en el caso de la GPI.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE REVELADO

Tanto las soluciones tampón como la solución madre pueden ser preparadas y conservadas durante varias semanas, a temperatura ambiente las primeras y en el frigorífico, a 4°C, la segunda.

El "protocolo de revelado" comprende dos etapas: la primera corresponde a la elaboración de mezclas que puedan ser conservadas en el frigorífico durante algunas horas; la segunda comprende la adición de los productos que es indispensable añadir en el último momento, justo antes de verter la solución de revelado sobre el gel.

PREPARACION DE LOS GELES PARA EL REVELADO ENZIMATICO

Cuando se considere que la migración electroforética es suficiente, se procede a desconectar el alimentador de corriente continua y a sacar el gel; éste es extraído del molde, cortando el borde anódico a nivel del frente de migración (azul de bromofenol), y el catódico a nivel del contacto con el puente (aproximadamente 2 cm por debajo del lugar donde se colocaron las muestras). Cortar el ángulo superior derecho del gel, de forma que luego se pueda conocer la orientación correcta del mismo y en consecuencia el orden en que han sido colocados los extractos proteicos. Quitar los rectángulos de papel Whatman y transfer el gel sobre una "placa para cortar geles". Con la ayuda del "cortageles" separar una lámina de 2 mm de espesor; la parte superior es transferida sobre otra "placa para cortar geles" y la lámina que se ha separado será colocada a su vez en un "recipiente de revelado". Esta operación es repetida tres veces, lo que permite obtener cuatro láminas.

Cada "recipiente de revelado" irá debidamente etiquetado, indicando el número de gel.

Una vez preparada la solución de revelado proceder a mezclarla con la solución de agar, mantenida al Baño maría, depositando rápidamente dicha mezcla sobre la superficie de la lámina de gel contenida en la cubeta.

La cubeta de revelado se introduce en el frigorífico a 4°C. Detener la reacción enzimática con la solución de fijación. El gel permanecerá en contacto con el fijador durante toda la noche, a 4°C. Al día siguiente, los geles son lavados con agua del grifo y secados. A continuación se pasa a interpretar los resultados de movilidad electroforética

obtenidos. Tras esto, los geles serán debidamente etiquetados, envueltos individualmente en plástico y sellados. Podrán así ser conservados, bien en frigorífico a 4 °C, o bien congelados, durante meses o incluso años.

8. DESARROLLO DE UNA VACUNA FRENTE A *T. annulata*

8.1. AISLAMIENTO DEL PARASITO

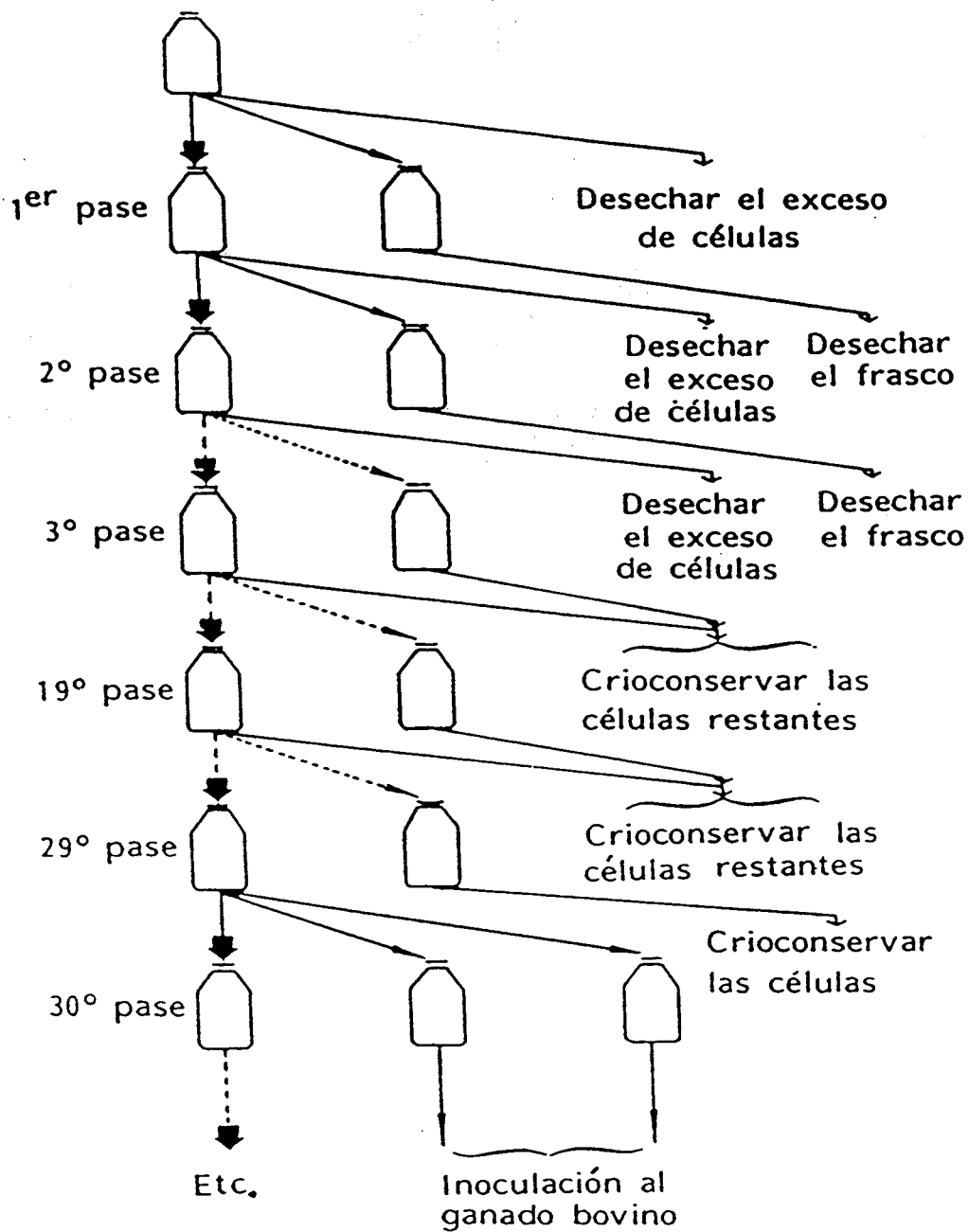
En nuestro caso el aislamiento de *T. annulata* lo realizamos a partir de sangre de un animal enfermo de theileriosis procedente de una zona enzoótica de Andalucía y que se encontraba en un estado agudo de la enfermedad.

Una vez extraída la sangre, en condiciones estériles y en tubo con anticoagulante, se separaron los linfocitos por la técnica de Ficoll-paque (Byum, 1968) estableciéndose en cultivo *in vitro*, en frascos Roux, siguiendo la metodología de Pipano y col. (1989).

8.2. ATENUACION DE LA VIRULENCIA

Para la atenuación de la virulencia de los esquizontes de *T. annulata* hay que hacerlos crecer en cultivo *in vitro* e ir subcultivando los linfoblastos bovinos infectados con esquizontes por pases sucesivos cada 3-4 días siguiendo la metodología de Brown (1987).

Se debe tener la precaución de criopreservar parte de los cultivos cada 10 pases para evitar la pérdida del cultivo por contaminación y con ésto el grado de atenuación conseguido hasta ese momento, lo que nos obligaría a empezar de nuevo todo



Esquema propuesto para la atenuación de esquizontes de *T. annulata* en cultivo celular (Pipano, 1989)

el proceso.

El número de pases necesario para conseguir la atenuación de la virulencia puede ir desde 30 a 300 dependiendo de la cepa y no está relacionado con la virulencia inicial de la misma. Nosotros decidimos comprobar si se había conseguido una vez alcanzados los 35 pases.

8.2.1. CONTROL DEL GRADO DE ATENUACION

El grado de atenuación se valora por inoculación de 2 a 3 terneros susceptibles con los esquizontes que mantenemos en cultivo cada 20-30 pases. Durante el primer período de cultivo, cuando la virulencia de los esquizontes aún es alta, es suficiente inocular un solo animal para cada prueba.

Para que se considere conseguida la atenuación completa de la virulencia de los esquizontes, al ser éstos inoculados en las condiciones descritas anteriormente, no deben dar lugar:

- * a una alteración ostensible de la temperatura del animal,
- * a la aparición de esquizontes en ganglios linfáticos
- * ni a formas eritrocíticas del parásito en sangre.

Se seleccionaron dos terneros de raza frisona a los que se hizo un control para comprobar que no habían tenido contacto previo con el parásito mediante frotis sanguíneos y pruebas serológicas por I.F.I.

Los terneros fueron marcados con los números 50 y 51 y posteriormente inoculados por vía subcutánea con un número de células infectadas que es el equivalente a una dosis de vacuna

fresca (5 millones de células) (Singh y col. 1993) y que fue preparada y ajustada 1 hora antes de la inoculación y mantenida a 4 °C.

8.3. COMPROBACION DE LA SEGURIDAD Y POTENCIA

Una vez inoculados los terneros se hace una monitorización de los animales en la que se controla:

- la temperatura rectal por la mañana
- parasitemia
- hematocrito
- estado de los ganglios linfáticos (inflamación) (Singh y col. 1993).

Al mismo tiempo, si la cepa está atenuada, se puede considerar que se ha obtenido la vacuna y por lo tanto, al inocularla a un ternero susceptible, dará lugar al desarrollo de títulos de anticuerpos frente a *T. annulata* detectables por técnicas inmunológicas. Por todo ello, en la monitorización incluimos el control de la evolución del título de anticuerpos específicos por el método de I.F.I.

8.3.1. EFECTIVIDAD DE LA VACUNA FRENTE AL "CHALLENGE"

Una vez visto que el grado de atenuación de la virulencia del parásito es suficiente y que la inmunización se ha producido de una forma normal, detectable mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (I.F.I.), se debe comprobar que los terneros sean resistentes al agente causal de la enfermedad. Para ello se inocula con esquizontes de virulencia parcialmente atenuada (challenge) a uno de los

terneros vacunados (nº50) y a un ternero susceptible (nº 107).

Seguidamente se procede a hacer la monitorización de los terneros inoculados ya descrita anteriormente.

8.4. PREPARACION DE LA VACUNA Y ALMACENAMIENTO

8.4.1. VACUNA LIQUIDA

Para preparar las dosis usadas de vacuna fresca seleccionar cultivos creciendo en monocapa confluyente.

- Descartar el sobrenadante de medio de cultivo.
- Enjuagar la monocapa con PBS suficiente para cubrirla generosamente.
- Añadir solución de citrato suficiente para cubrir la monocapa. Transcurridos 5 minutos la mayoría de las células se han desprendido y tras agitar suavemente lo hacen la práctica totalidad de las células.
- Recoger la suspensión celular en un tubo universal de fondo cónico.
- Enjuagar los frascos con PBS para recoger el mayor número de células posible y llevar a un tubo de centrifuga.
- Centrifugar a 400 g durante 10 minutos.
- Desechar el sobrenadante.

- Resuspender las células en medio de cultivo completo a excepción del suero bovino fetal.

- Unir todas las suspensiones celulares procedentes de la centrifugación y hacer un recuento en cámara hemocitométrica.

- Ajustar a una concentración celular del 10^6 /ml.

- Disponer en viales estériles alícuotas de 5 ml de la suspensión, de forma que administrar 5×10^6 células a cada animal vacunado.

- Cerrar los viales con tapón de goma y con arandela de aluminio.

- Etiquetar convenientemente los viales con el contenido, nº de lote, condiciones de conservación y modo de administración.

- Guardar refrigerado a 4°C.

8.4.2. VACUNA CRIOPRESERVADA

Para la preparación de la vacuna criopreservada, es necesario nuevamente disponer de cultivos sanos creciendo en monocapa.

La obtención de las células en suspensión a partir de los frascos de cultivo en los que están creciendo en monocapa se realiza como en el caso de la vacuna para uso inmediato (apartado anterior).

Una vez que se tiene la suspensión celular, se procede a

hacer un conteo utilizando una cámara de recuento de células hemáticas.

- Posteriormente se centrifuga a 400 g durante 10 minutos.

- Descartar el sobrenadante.

- Resuspender el botón celular en medio de cultivo adicionado de dimetil sulfóxido (DMSO) al 8%, como sustancia crioprotectora.

- El volumen de medio añadido es tal que queda una suspensión celular de 10^7 células/ml. En este caso es conveniente hacer el recuento antes de tener la suspensión en el medio para la criopreservación para evitar en lo posible el contacto prolongado de las células con el DMSO en condiciones de descongelación, ya que puede resultar tóxico.

- Repartir la cantidad de 1ml en criotubos de 2 ml de capacidad y llevar a 4°C durante 30 minutos.

- Conservar dentro de una caja de polispán durante toda la noche a -70 °C.

- Al día siguiente se pasan los tubos rápidamente a un contenedor de nitrógeno líquido.

8.4.4. ENSAYO DE VIABILIDAD

Una vez preparadas las dosis de vacuna fresca se almacenan a 4 °C y al abrigo de la luz. Nos pareció imprescindible tener un control del tiempo que podíamos tener la vacuna refrigerada manteniendo las características iniciales.

Para que la vacuna sea efectiva, las células inoculadas tienen que estar vivas y mantener su capacidad de establecerse en el animal receptor y ser capaces de transferir los esquizontes que las parasitan a nuevas células de hospedador (Tait y Hall, 1990).

La metodología empleada para comprobar la viabilidad de la vacuna fue:

- Seleccionar varios viales de vacuna recién preparados y conservarlos a 4 °C.

- Tomar muestras para realizar una tinción con azul tripán con objeto de calcular el porcentaje de células vivas.

- Tomar 1 ml de la suspensión celular del vial y sembrar en un frasco Roux de 25 cm² al que añadimos 4 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con un 20% de SBF inactivado, para observar la capacidad de establecerse en cultivo de nuevo y crecer en monocapa.

- Repetir el proceso cada 24 horas hasta observar que las células han perdido la capacidad de establecerse en cultivo.

9. EXPERIENCIA DE VACUNACION EN EL CAMPO

9.1. SELECCION DE LA GRANJA

Se seleccionó una explotación pecuaria de ganado vacuno lechero cuyo número aproximado de reses era de 100, ubicada en una zona endémica para la Theileriosis Mediterránea. La citada vaquería había presentado, en años anteriores, una morbilidad próxima al 25% y una mortalidad del 12.5% causada por theileriosis.

Se realizó un control serológico de todas las reses de la explotación para tener una referencia del grado de exposición al parásito que existe en la misma (Ozock y Pipano, 1981).

Tratándose de una zona endémica podría haber reses, sobre todo las de mayor edad, que podían haber sufrido theileriosis severas de las que se hubiesen recuperado y presentar una inmunización de forma natural. Estas reses no nos servirían para ensayar la efectividad de la vacuna en la misma medida que aquellas que habían tenido bajo o ningún contacto con el parásito.

9.2. SELECCION DE LAS RESES Y ESTABLECIMIENTO DE LOTES

Por un lado teníamos vacas en producción lechera de 4 a 5 años de edad de raza frisona de ganado selecto lechero, procedentes de zonas no endémicas, normalmente estas reses presentaban una mayor susceptibilidad a la Theileriosis. Estas vacas mostraban en su mayor parte serología positiva frente a *T. annulata*.

Para este ensayo fueron seleccionadas las reses que presentaron títulos comprendidos entre 0 y 160 , por considerar que eran las que habían estado menos en contacto, o en un tiempo más lejano, con el agente etiológico de la enfermedad.

Otro grupo de novillas, de 2 años de edad, fue muestreado de la misma forma y en este caso la mayoría presentaban serología negativa o títulos bajos frente al antígeno de *T. annulata* empleado, a pesar de tratarse de reses procedentes de la zona de estudio.

Confección de los lotes de animales para el ensayo:

Reses	Edad	Estado de la vacuna	Dosis	n° reses
Vacas	4-5 años	Líquida	x 1	6
Vacas	4-5 años	Criopreservada	x 1	16
Novillas	2 años	Criopreservada	x 1	8
			x 2	8
Lote control: 6 Novillas de 2 años 10 Becerras de menos de un año				
Total reses vacunadas.....				38

Las reses que en el día de la vacunación presentaron títulos mayores o iguales a 320, aunque hubiesen presentado en el muestreo inicial títulos bajos, fueron excluidas de la experiencia, a pesar de haber sido vacunadas, ante la imposibilidad de conocer esta circunstancia en el momento de la vacunación.

9.3. VACUNACION DE LOS ANIMALES

La vacuna consistió en un cultivo de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *T. annulata* de virulencia atenuada, tratándose por tanto de una vacuna viva.

Las dosis de vacuna son recuperadas del contenedor de nitrógeno líquido que tenemos en la cámara fría del laboratorio y son pasados rápidamente a un contenedor de menores

dimensiones y utilizado para el transporte al campo. Dicho contenedor se llenará de nitrógeno líquido hasta completar toda su capacidad.

Además, debemos llevar al campo una bandeja de acero inoxidable que permita ser calentada con llama, una fuente de calor y un termómetro.

Calentamos el agua a 37-40 °C manteniendo la temperatura durante todo el tiempo. Justo antes de inocular las dosis, sacaremos estas del contenedor de nitrógeno y las pondremos en la batea con agua caliente para que la descongelación sea rápida. Cada dosis con un volumen inicial de 1 ml será diluida con 4 ml de PBS estéril en la misma jeringa que usaremos para inoculación. El PBS en este caso actúa como vehículo y diluyente. La dosis preparada se administrará vía parenteral subcutánea en un tiempo que no deberá exceder de 30 minutos desde la descongelación de cada dosis.

En este caso nos fue útil ir descongelando dosis paulatinamente conforme íbamos colocando el ganado seleccionado en las sujeciones para la vacunación.

9.4. SEGUIMIENTO DE LA RESPUESTA A LA INMUNIZACION

Para controlar cuál ha sido la reacción de las reses a la inmunización hemos realizado un seguimiento que ha consistido en la observación de la evolución del título de anticuerpos frente a *T. annulata*, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (I.F.I.), así como otros parámetros hematológicos y clínicos.

Material y métodos

Previa a la vacunación realizamos extracción de sangre con y sin anticoagulante para la preparación de extensiones y obtención de suero con objeto de conocer el estado del animal en el momento de la vacunación que sería lo que denominaríamos día 0 y así mismo en los días 30, 60, 90, y 120.

Durante el período que duró esta experiencia se realizó un seguimiento clínico de todos los animales de la explotación, anotándose todas las incidencias que se presentaron, tales como el número de casos clínicos, muertes, etc...

RESULTADOS

1. EPIDEMIOLOGIA

1.1. CUESTIONARIOS

Los resultados obtenidos, referentes a la presencia de piroplasmosis en las distintas especies zootécnicas así como su localización geográfica en Andalucía, se expresan en el cuadro 1 y en el mapa 2.

Se detecta la presencia de piroplasmosis bovina, equina o ovina en 5 de las 8 provincias andaluzas: Cádiz, Córdoba, Málaga, Sevilla y Huelva.

En las provincias de Cádiz y Huelva todos los cuestionarios recibidos fueron positivos en cuanto a la presencia de piroplasmosis apareciendo esta diseminada por toda la provincia en diversos municipios.

En la provincia de Sevilla hay piroplasmosis tanto bovinas como equinas, distribuyéndose en la zona del Valle del Guadalquivir.

En las provincias de Málaga y Córdoba, el parasitismo se localiza en comarcas muy concretas. Estas son Valle del Guadalhorce, Antequera y Serranía de Ronda en el caso de Málaga, mientras que en Córdoba sólo se ha detectado una respuesta positiva de piroplasmosis equina y otra de bovina (comarcas de Lucena y Montilla, respectivamente).

En las provincias de Granada, Jaén y Almería, contestan negativamente, desconociéndose la existencia de estos parasitismos por parte de los facultativos que han respondido a la encuesta.

Con respecto a la incidencia de piroplasmosis en las diferentes especies zootécnicas de nuestra región, destacan las bovinas y equinas sobre las ovinas, como se puede ver en el cuadro 1.

La dinámica estacional de las piroplasmosis nos indica que durante los meses de mayo a septiembre es cuando se presenta la mayor parte de los casos clínicos. No obstante, en Sevilla y Cádiz hay datos de aparición de casos clínicos a lo largo de todo el año.

En relación a las razas, sólo se especifican en ganado vacuno, siendo la más afectada la frisona (ganado lechero), seguida de la retinta (ganado cárnico).

En cuanto a la terapéutica utilizada por los facultativos, es muy usual la aplicación de Imizol (Berenil^R) y Acaprina^R, asociada a veces con tetraciclinas y reconstituyentes hepáticos.

Así mismo, los facultativos siempre asocian el parasitismo a la presencia de garrapatas.

1.2. SEROPREVALENCIA EN EXPLOTACIONES PECUARIAS DE ZONA ENDEMICA

El estudio de los datos epidemiológicos que se disponen (García Fernández, 1978; García Fernández y col., 1985; 1987), junto con el de los recopilados en la encuesta del apartado 1.1, nos permiten deducir que en la provincia de Cádiz existen zonas donde parece tener bastante incidencia la enfermedad objeto de nuestro estudio.

Para confirmar específicamente este hecho, se realizó un muestreo serológico de vacas de raza frisona en zona de alta positividad a la theileriosis. Las garrapatas recogidas sobre las reses muestreadas (50 ejemplares) resultaron ser en su totalidad de la especie *H. lusitanicum*.

El número total de reses muestreadas fue de 116. En ellas, el análisis de los sueros por el método de I.F.I. frente a antígeno de *T. annulata* dió como resultado que el 66,3 % eran positivas y el 33,7 % restante negativas (figura 1).

Si se observan los resultados en los tres grupos (vacas, novillas y becerras) separadamente (figura 2), hay diferencias importantes en función de la edad, siendo positivas el 79,2 % de las vacas, el 47,1 % de las novillas, y tan sólo el 40,0 % de las becerras.

Desglosando la distribución de los títulos de anticuerpos en función del porcentaje de reses que los alcanzan, las diferencias entre los tres grupos son aún mayores, como se puede observar en las figuras 3, 4 y 5, alcanzándose títulos más altos y en mayor % de reses para las vacas, seguido de las novillas y éstas de las becerras, en las que la positividad se concentra en la mayoría de los casos en títulos cercanos a la negatividad, siendo 160 el mayor título alcanzado.

2. CONTRIBUCION A LA IDENTIFICACION DEL VECTOR DE LA THEILERIOSIS TROPICAL EN ANDALUCIA

Para este trabajo recogimos 80 adultos de *H. lusitanicum* parcialmente alimentados previamente sobre un animal de zona endémica (27E) con una parasitación del 0.1%.

Resultados

Los ixódidos permanecieron en las bolsas de las orejas alimentándose sobre el ternero nº 99 durante 5 días.

Del total de las garrapatas introducidas (80) tan sólo se alimentaron 19 ejemplares (2 hembras y 17 machos) y el resto permanecieron sin fijarse y murieron.

En este ternero se consiguió desarrollar una parasitosis leve de evolución lenta en la que la parasitación en sangre fue aumentando con el tiempo, no llegando a observarse esquizontes ni en ganglio ni en sangre, y tan sólo se encontraron formas intraeritrocíticas de *T. annulata* (figura 6).

Los anticuerpos específicos frente a *T. annulata* mostraron concentraciones muy variables a lo largo de todo el proceso de seguimiento (figura 7), alcanzándose títulos máximos de 2560.

La evolución sufrida durante los 12 meses de seguimiento en cuanto a parasitemia, título de anticuerpos, temperatura rectal y hematocrito se refleja en las figuras 6, 7, 8 y 9, respectivamente. Con esta experiencia hemos comprobado que un animal susceptible puede adquirir una parasitosis producida por *T. annulata* con la alimentación sobre el mismo de la especie *H. lusitanicum* en condiciones similares a las naturales, a la vez que se ha conseguido aislar experimentalmente *in vivo* *T. annulata* procedente de una zona endémica de Andalucía. No se aisló *in vitro* el parásito a partir de muestras de este animal.

Una vez que se alcanzó una parasitemia del 12%, se le extrajeron 50 ml de sangre y fueron inoculados a un nuevo ternero susceptible (res 111), con objeto de mantener la cepa aislada *in vivo* e intentar de nuevo el aislamiento *in vitro*.

3. INFECCION EXPERIMENTAL DE TERNEROS SUSCEPTIBLES POR INOCULACION DE SANGRE

Se han conseguido infectar 3 terneros por este método.

3.1. AISLAMIENTO EN EL TERNERO Nº 97

En el caso del ternero nº 97 la inoculación de 15 ml de sangre con una parasitemia del 13 % dió lugar al desarrollo de una parasitosis cuyo seguimiento y evolución puede observarse en las figuras 10, 11, 12 y 13.

De este ternero, no se consiguió aislarse esquizontes de ganglio linfático ni de sangre, observándose los parásitos en forma intraeritrocítica. Con lo cual se ha conseguido aislar *in vivo* *T. annulata* de un caso clínico localizado en una zona endémica de Andalucía. Cuando se alcanzó una parasitemia del 14%, se extrajeron 50 ml de sangre y se inocularon a un ternero susceptible (res nº 104) para mantener el aislamiento *in vivo* e intentar aislar el parásito *in vitro*, si fuese posible a partir de esta nueva res de experimentación.

3.2. AISLAMIENTO EN LOS TERNEROS Nº 104 Y Nº 111

Los terneros nº 104 y nº 111 han sido infectados experimentalmente ambos en las mismas condiciones, por inoculación de 50 ml de sangre procedente de las 2 reses de experimentación anteriores (97, 99 respectivamente) y en ambos casos se ha desarrollado una parasitemia, aunque ésta ha sido muy baja y la enfermedad cursa sin grandes alteraciones de los datos clínicos registrados. Ver las figuras 14 a 19 para la res nº 104 y las figuras 20 a 25 para la res nº 111.

Tras siete meses de seguimiento, y observando que la parasitemia se encontraba estabilizada, se extrajeron 250 ml de sangre a cada una de las reses con el fin de criopreservarla, con objeto de inocularla en el futuro a nuevos terneros de experimentación, si fuese necesario.

4. AISLAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO EN CULTIVO *in vitro* DE LINEAS CELULARES INFECTADAS CON *T. annulata*.

En el transcurso de este trabajo hemos conseguido aislar en cultivo cuatro líneas celulares linfoblastoides bovinas infectadas con esquizontes de *T. annulata*. A pesar de haber empleado diversos tipos de material como órganos y sangre procedente de animales infectados, tan solo hemos obtenido éxito partiendo de sangre o de biopsia de ganglios linfáticos.

4.1. A PARTIR DE SANGRE

La línea celular 28E ha sido aislada a partir de sangre de una vaca que se encontraba en un acceso agudo de theileriosis tropical, de la que finalmente murió tres días más tarde.

La sangre conseguida que nos sirvió como fuente de parásitos presentaba un hematocrito muy bajo y un alto número de los eritrocitos con piroplasmas, si bien no fueron observados esquizontes en las preparaciones (fotografía 1).

En este aislamiento, los linfoblastos fueron observados como células redondas brillantes adheridas a la superficie del frasco de cultivo y también algunas en el sobrenadante (fotografía 2), transcurridos 4 días desde que fueron puestas en cultivo.

4.2. A PARTIR DE GANGLIOS LINFATICOS

Por este método, y basándonos en los trabajos de Van den Ende y Edlinger (1971), hemos conseguido aislar y establecer en cultivo linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *T. annulata*.

Así, a partir de los terneros 104 y 111, inoculados con sangre procedente de las reses de experimentación 97 y 99 respectivamente, y a partir del ternero 107, inoculado con cultivos de esquizontes con 15 pases en cultivo, se ha conseguido aislar las líneas celulares que denominamos con los mismos nombres, es decir, 104, 107 y 111.

5. IDENTIFICACION DE LOS PARASITOS AISLADOS

5.1. POR TINCIÓN DE GIEMSA

Las líneas celulares establecidas en cultivo han sido teñidas para la observación de los macroesquizontes que las parasitan que aparecen dentro del citoplasma celular como un grupo de núcleos que se tiñen de azul (fotografías 3 y 4).

5.2. POR PRUEBA SEROLOGICA

Los esquizontes observados por tinción, son característicos de *Theileria*, pero para estar más seguros, se sometieron las células en cultivo al enfrentamiento con un suero control positivo con anticuerpos frente a *T. annulata* y se observó su reacción por inmunofluorescencia indirecta al tiempo que se comparó con la cepa de *T. annulata* patrón

amablemente cedida por el Dr. E. Pipano del Kimron Veterinary Institute (Israel). Fotografías 5, 6, 7 y 8, en las que el esquizonte aparece en el interior de la célula situado en la zona marginal mostrando un color amarillo intenso.

6. DESARROLLO DE LA TECNICA DE DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO I.F.I. EMPLEANDO REACTIVOS PROCEDENTES DE CEPAS ESPAÑOLAS DE *T. annulata*.

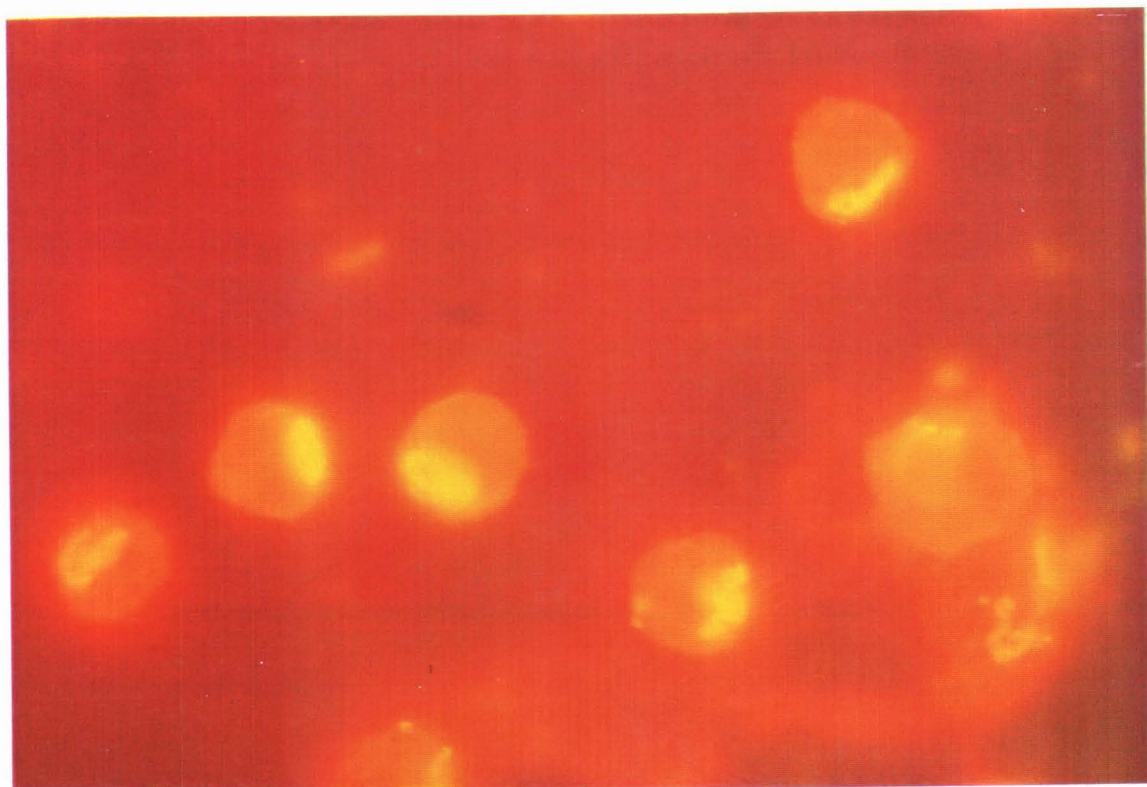
En este sentido, se ha conseguido obtener los tres elementos básicos necesarios para montar la técnica de diagnóstico por I.F.I., como son:

- El antígeno, constituido por esquizontes de *T. annulata* que se encuentra infectando a las células de la línea linfoblastoide bovina 28E, pertenecen a una estirpe de *T. annulata* que por su lugar de aislamiento denominamos estirpe o stock "Algar".

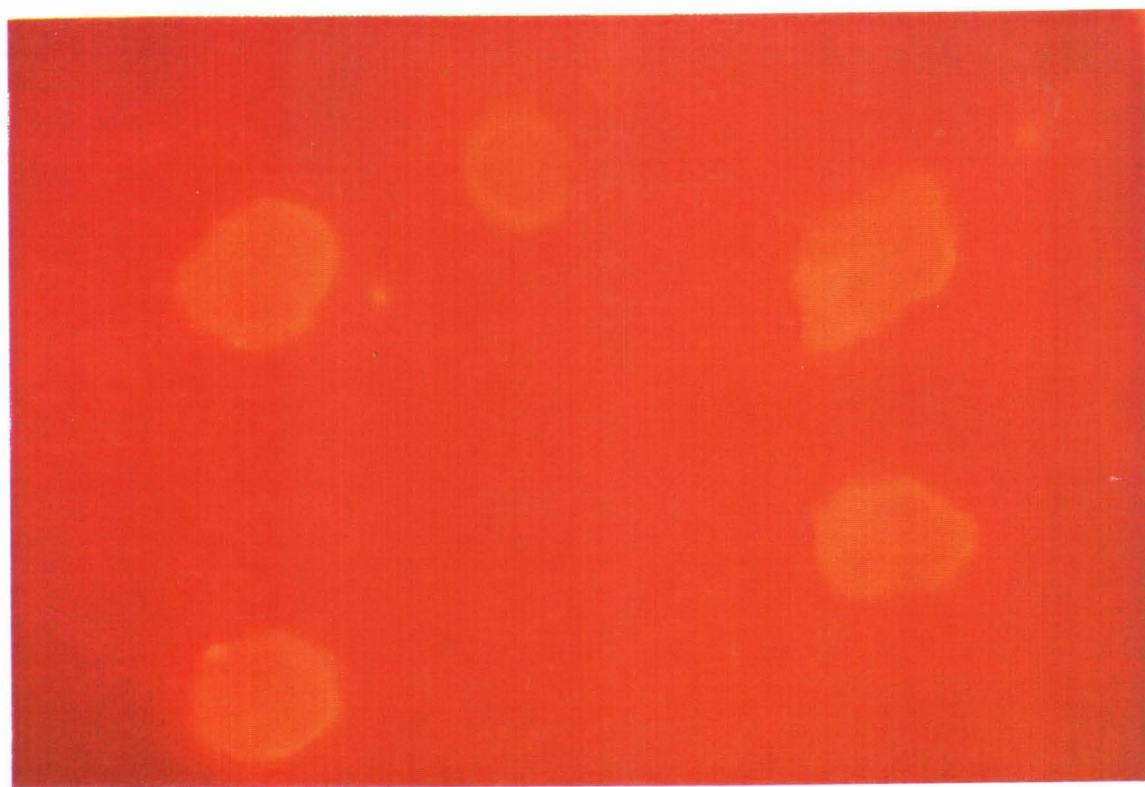
- El suero control positivo frente al stock "Algar", obtenido por inoculación de la línea celular 107 a un ternero sano.

- El suero control negativo por extracción de sangre a un ternero sano procedente de una zona no endémica y libre de anticuerpos frente a *T. annulata*, ensayado tanto frente al stock "Algar" como frente a uno exótico procedente de Israel.

Con los citados elementos se dispone de lo necesario para el diagnóstico inmunológico de la theileriosis mediterránea empleando reactivos biológicos derivados una cepa procedente de zonas endémicas de España.



Antígeno preparado con la línea celular 28E de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes. Reacción con suero control positivo frente a Theileria annulata.



Antígeno preparado con la línea celular 28E. Reacción con suero control negativo frente a T. annulata.

7. CARACTERIZACION ISOENZIMATICA DE NUESTRO AISLADO DE *T. ANNULATA*

Como se ha indicado anteriormente sólo el polimorfismo enzimático de la glucosa fosfato isomerasa (GPI) tiene interés para diferenciar aislados de *T. annulata* (Melrose y col., 1980; Van der Meer y col., 1981; Melrose y col., 1984). Mediante la técnica de electroforesis de isoenzimas en gel de almidón, comprobamos que el patrón isoenzimático de nuestro stock es diferente en cuanto a la GPI se refiere (como se observa en la fotografía 9), al stock procedente de Israel, país en el que la theileriosis mediterránea también es endémica y que han sido desarrolladas con anterioridad tanto vacuna como campañas de inmunización del ganado.

Los resultados de otras isoenzimas estudiadas por el mismo método nos han revelado que no existen diferencias en su patrón isoenzimático entre el stock autóctono y el exótico, como se puede comprobar en las fotografías 10, 11 y 12.

8. OBTENCION DE VACUNA FRENTE A *T. ANNULATA* PROCEDENTE DE ESPAÑA.

La vacunación contra la theileriosis tropical se puede conseguir por el método de inoculación de células linfoides infectadas con esquizontes de virulencia atenuada, o bien, por infección y tratamiento quimioterápico (Pipano, 1981), en cualquier caso, el ganado inmunizado, invariablemente permanece sensible a la infección por parásitos heterólogos, particularmente cuando la inmunización se hace con esquizontes, que es el método indicado en la vacunación contra la theileriosis producida por *T. annulata*, más que cuando se realiza con esporozoítos (Gautam, 1981).

8.1. OBTENCION DEL CULTIVO

El primer paso para la obtención de una vacuna es el aislamiento y establecimiento en cultivo de linfoblastos bovinos infectados con macroesquistosomas de *T. annulata*.

El aislamiento se consiguió realizar, como se explica en el apartado 4 de resultados, a partir de un animal enfermo que se encontraba en un acceso agudo de theileriosis mediterránea. Partiendo de sangre de este animal, por el método de Ficoll-Paque^R, conseguimos separar las células mononucleares y con éstas las células linfoblastoides infectadas con macroesquistosomas y establecer una línea celular que denominamos 28E.

8.2. CONSECUENCIA DE LA ATENUACION

Con esta línea celular, por mantenimiento en cultivo *in vitro* realizando entre 2 y 3 pases por semana, se ha ido atenuando la virulencia de los esquistosomas según metodología de Pipano (1981), hasta conseguir la atenuación total.

Para conocer el grado de atenuación de la virulencia inoculamos a los terneros nº 50 y 51. Realizamos el seguimiento de los animales en cuanto a su reacción como resultado de la inoculación de 5×10^6 células de la línea 28E con 35 pases en cultivo:

Las curvas en las que se expresa la temperatura, título de anticuerpos y hematocrito de ambas reses podemos observarlas en las figuras 26 a 31.

Resultados

La observación clínica de los terneros (Ouhelli, 1985; Navarrete y col, 1992) condujo a los siguientes resultados:

- No se pudieron detectar parásitos en sangre ni en biopsia de ganglios linfáticos.

- No se produjo ningún incremento destacable de la temperatura.

- El hematocrito se mantuvo en los valores normales que presentaba para los terneros antes de la inoculación.

- No hubo inflamación de ganglios linfáticos.

- No hubo en los terneros ningún síntoma clínico específico que hiciera sospechar el desarrollo de una theileriosis tropical, según se describe la clínica de esta enfermedad en la literatura.

Paralelamente, como se observa en las figuras 28 y 29, ambos animales desarrollaron anticuerpos específicos frente al antígeno de esquizontes de *T. annulata*, que alcanzaron sus valores máximos a los 40 días postinoculación.

Así mismo en las figuras 30 y 31 se observa que los valores de hematocrito no se han alterado como consecuencia de la inoculación de los cultivos celulares.

8.3. PRUEBA DE LA POTENCIA DE LA VACUNA

Para comprobar si la vacuna protege frente a la enfermedad en condiciones experimentales se inoculó 4×10^7 células linfoblastoides infectadas con esquizontes de 15 pases en

cultivo a dos animales de experimentación:

- Res nº 50, que debemos considerar inmunizada una vez que se le inculó el equivalente a una dosis de vacuna y que desarrolló una curva de anticuerpos específicos. Esto indica que el proceso de inmunización ha transcurrido con normalidad, y la inoculación del "challenge" homólogo se realizó cuando habían transcurrido 8 meses desde la vacunación.

- Res nº 107, animal susceptible no vacunado como control para observar la infectividad del challenge inoculado y comparar su reacción con la del ternero nº 50. En este caso, como se observa en la figura nº 32, se produce una reacción a la inoculación del material infectivo que clasificaríamos según Irvin y col. (1983) como nula en el caso del ternero nº 50, mientras que el en ternero 107 se produce una respuesta que se consideraría moderada, según la clasificación de estos mismos autores. La reacción desarrollada por el ternero 107, básicamente consistió en:

- Un incremento de la temperatura corporal, como se observa en la figura 32.

- No se produjeron alteraciones en los valores de hematocrito.

- Inflamación de los ganglios linfáticos próximos a la zona de inoculación, que se mantuvo palpable durante más de dos meses.

- Aparición de formas intraeritrocíticas del parásito, detectadas por primera vez a los 25 días postinoculación.

- Aparición de esquizontes en células linfoides de los ganglios linfáticos inflamados.

- Lagrimeo, fluido nasal intenso y petequias en la mucosa ocular del animal durante varios días. Estos síntomas comenzaron transcurrida una semana desde la inoculación.

8.4. PRUEBA DE VIABILIDAD DE LA VACUNA

8.4.1. VACUNA FRESCA

El ensayo de viabilidad de la vacuna preparada y conservada en condiciones de refrigeración a 4° C ha dado los siguientes resultados.

El porcentaje de células que están vivas desde el momento de la preparación de las dosis hasta una semana después queda reflejado en la figura 33.

Se partió de un porcentaje medio de células vivas por vial del 92%. Este porcentaje se mantuvo durante 24, 48 y 72 horas desde el momento de la preparación. A las 96 horas (4 días) observamos que comienza un ligero descenso en el porcentaje de células vivas (89%). A partir de los 5 días de la preparación de la vacuna el descenso del porcentaje de células vivas comienza a ser más importante con un 79%, y un 59% y 49% para los 6 y 7 días respectivamente. Además de calcular el porcentaje de células vivas también se ha controlado la capacidad de éstas células para establecerse en cultivo. Para valorar esta capacidad, al tratarse de un parámetro subjetivo, consideramos las siguientes categorías:

- Buena capacidad de crecimiento para garantizar el establecimiento del cultivo: +++

Resultados

- Aceptable capacidad de crecimiento: ++-
- Insuficiente capacidad de crecimiento para garantizar el establecimiento del cultivo: +--
- De esta forma clasificamos la capacidad encontrada en los días sucesivos a la preparación como sigue:

0 horas (momento de la preparación):	+++
24 horas (1 día):	+++
48 horas (2 días):	+++
72 horas (3 días):	+++
96 horas (4 días):	+++
120 horas (5 días):	++-
144 horas (6 días):	+--
168 horas (7 días):	+--

8.4.2. VACUNA CONGELADA

La vacuna, criopreservada al tratarse de una vacuna viva, necesitamos conocer cuanto tiempo permanece viable desde su preparación. Una vez criopreservada puede mantenerse viva durante años y, el que sea efectiva, sólo depende de haber realizado una adecuada criopreservación y una manipulación correcta en el momento de su aplicación en el campo (apartado 8.5.2. y 9.3 del material y métodos).

Como control de la bondad de la criopreservación recuperaron viales de vacuna congelada. Al reconstituirlos, se comprueba el porcentaje de células vivas por el método de la tinción con azul tripán, así como su capacidad para dar lugar a un cultivo celular sano que se establezca con normalidad.

En las pruebas realizadas, encontramos un valor medio de células vivas del 86% así como una capacidad de las mismas para establecerse en cultivo en todos los casos que clasificamos como +++.

9. ENSAYO DE INMUNIZACION EN CONDICIONES DE CAMPO

Una vez finalizado el seguimiento del proceso de inmunización así como el periodo de aparición de casos clínicos de la enfermedad, se pudo tener los resultados completos para evaluar la eficacia de la vacuna en condiciones de campo.

Para tener un control del proceso se hicieron extracciones de sangre y suero el día de la vacunación, que denominamos día cero, y así mismo los días 30, 60, 90 y 120. De esta forma se siguió la evolución de cómo evolucionaron los títulos de anticuerpos frente *T. annulata*, de cada lote de animales en la (figura 34).

9.1. MODO DE CONSERVACION DE LA VACUNA

En el lote inmunizado con vacuna fresca, el día 0 teníamos unos valores medios de título de anticuerpos próximos a 80. Transcurridos 30 días post-vacunación, se alcanzaron valores inferiores a 320 pero próximos a este valor. A los 60 días, se alcanzaron los valores máximos superando claramente el título 320.

A los 90 días se mantienen títulos superiores a 320 habiéndose producido un ligero descenso. Finalmente, a los 120 días, comenzó un suave y continuado descenso en los títulos aunque se mantienen en valores medios superiores a 160.

El lote de vacas inmunizadas paralelamente con vacuna criopreservada tuvo un comportamiento muy similar. Antes de la vacunación presentaban valores medios de título próximos a 80 o algo superiores. A los 30 días se alcanzaron valores próximos a 320, pero algo inferiores, y a los 60 días se alcanzaron los títulos máximos superiores a 320. A los 90 días se detecta un suave descenso para terminar con valores próximos a 160 a los 120 días (figura 35).

9.2. EFECTO DE LA DOSIS

En lo que se refiere al grupo de las novillas (2 años de edad), como ya se ha comentado, todas fueron inmunizadas con una vacuna criopreservada, pero se establecieron dos lotes. Uno de ellos fue inmunizado con una vacuna a dosis normal y otro con una vacuna a dosis doble, con objeto de estudiar si había diferencias en cuanto a la evolución del título de anticuerpos así como de la protección ejercida por la vacuna en función de la dosis, manteniéndose constantes todas las demás condiciones.

Los 2 lotes de novillas inmunizadas presentaban un título medio inferior a 40, en el día de la inoculación. El día 30, las novillas vacunadas a dosis simple mostraban un título ligeramente superior de 80, y a los 60 días alcanzaron su título máximo, que sobrepasando holgadamente el título 160. A los 90 días comienza el descenso de los niveles de anticuerpos volviendo a valores próximos a 80, que incluso estarán por debajo de este título al llegar a 120 días .

Las novillas inmunizadas con dosis doble, transcurridos 30 días presentaba alcanzan valores medios superiores a 160, alcanzando el máximo a los 60 días, con valores próximos a 640. Seguidamente se inicia el descenso de los títulos. Hacia los

90 días mostraba valores superiores a 320 y a los 120 días muy próximos a 160 (figura 36).

9.3. INFLUENCIA DE LA EDAD

Si comparamos la diferencia de evolución en los títulos de anticuerpos entre vacas y novillas, refiriéndonos a las que han sido inmunizadas con vacuna criopreservada a dosis normal (10^7 células/animal), se observa que se ha producido una evolución, representada en la figura 37, que se puede considerar muy similar en los dos grupos de animales de diferente edad, teniendo en cuenta que en el grupo de animales jóvenes partía de un título medio próximo a la negatividad, con lo cual la vacuna constituía un primer contacto con el parásito para la mayoría de ellas lo que hace que tengan una amplitud menor en la respuesta, mientras que el grupo de las vacas, edad 3 a 4 años, que son mayores, el título medio en el día 0 era superior a 80, lo que indica probablemente, que para muchos de esas reses no era su primer contacto, por lo que hay una respuesta paralela a la de las novillas pero con títulos superiores. Ambos grupos alcanzan su máximo a los 60 días para empezar seguidamente a declinar.

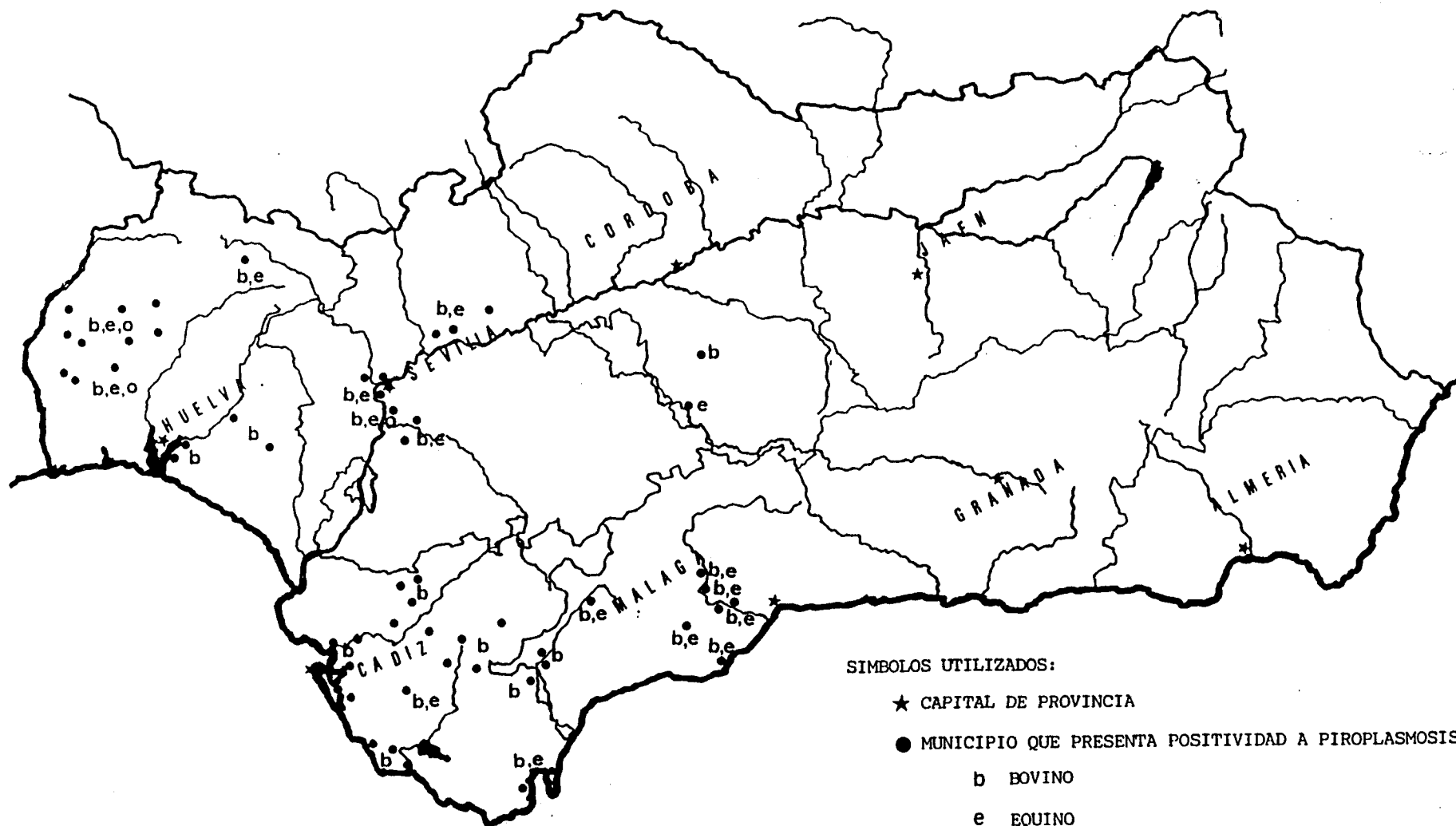
El método de inmunofluorescencia indirecta nos ha permitido detectar cuál ha sido la respuesta de las vacas a la inmunización, sin embargo, no ha sido establecida una correlación entre el título de anticuerpos y el nivel de protección.

Para controlar la efectividad de la vacuna como referencia la incidencia de casos clínicos de la enfermedad en la misma explotación pecuaria en años anteriores. De esta forma, en 1991 y 1992 se presentó una morbilidad 25% y una mortalidad del

Resultados

12,5%. En 1993 en el grupo control de 16 animales se produjeron a lo largo de la época de aparición de la enfermedad un total de 8 casos clínicos, de los cuales 2 fueron mortales; mientras tanto, en los grupos seleccionados por nosotros para la vacunación así como aquellos descartados para el ensayo por tener títulos altos, no se produjeron casos clínicos ninguno.

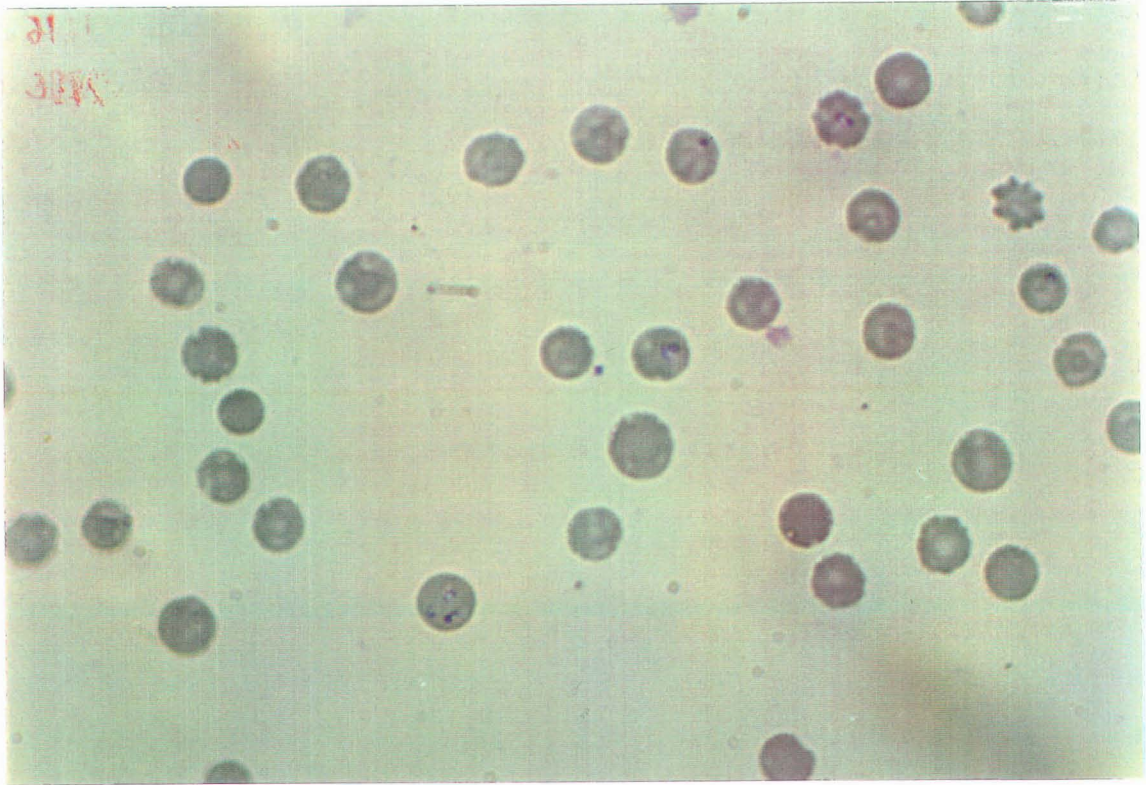
LOCALIZACION GEOGRAFICA DE CASOS POSITIVOS A PIROPLASMOSIS



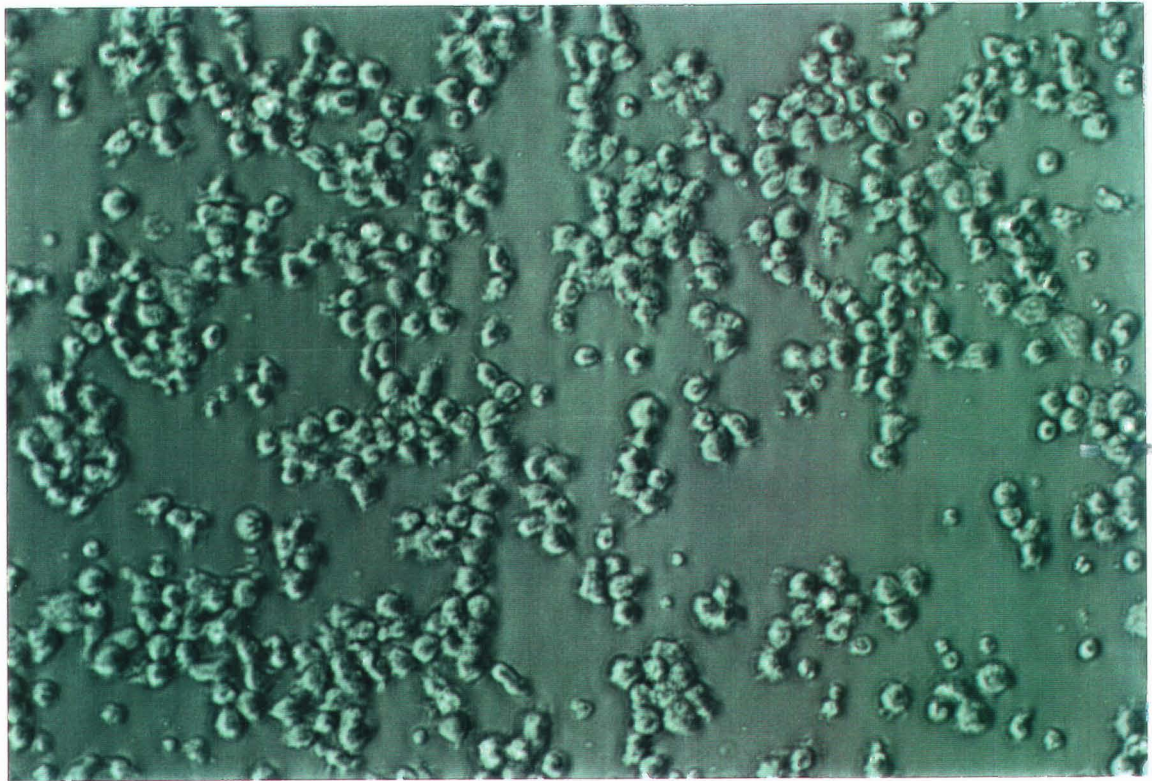
MAPA n° 2..

Provincia	Comarca	bovina	equina	ovina
CADIZ	Campaña	X		
	La Janda	X	X	
	Gibraltar	X	X	
	Sierra	X	X	
CORDOBA	Montilla		X	
	Lucena		X	
MALAGA	Malaga	X	X	X
	Serranía	X	X	
	Guadalhorce	X	X	
	Antequera	X	X	
SEVILLA	Sevilla	X	X	
	La Vega	X	X	
HUELVA	Andévalo	X	X	X
	Condado Lit.	X		
	Sierra Or.	X	X	

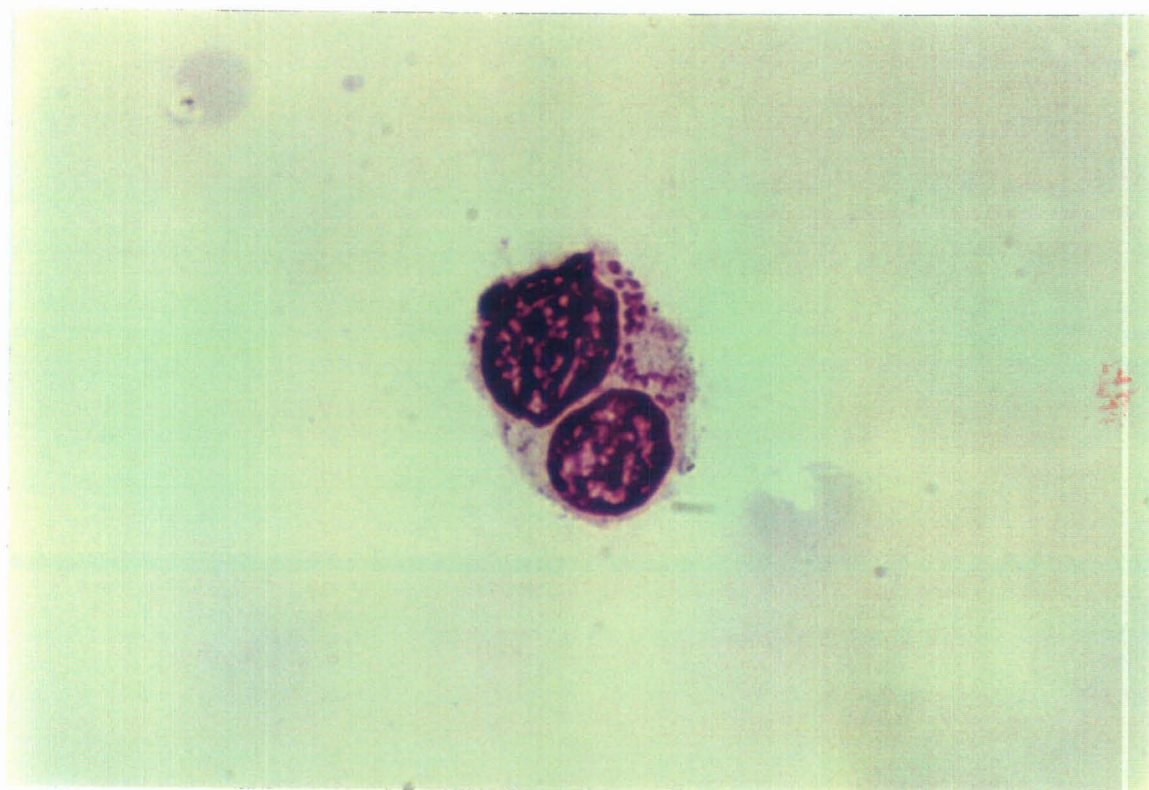
Cuadro nº 1: comarcas que presentan piroplasmosis.



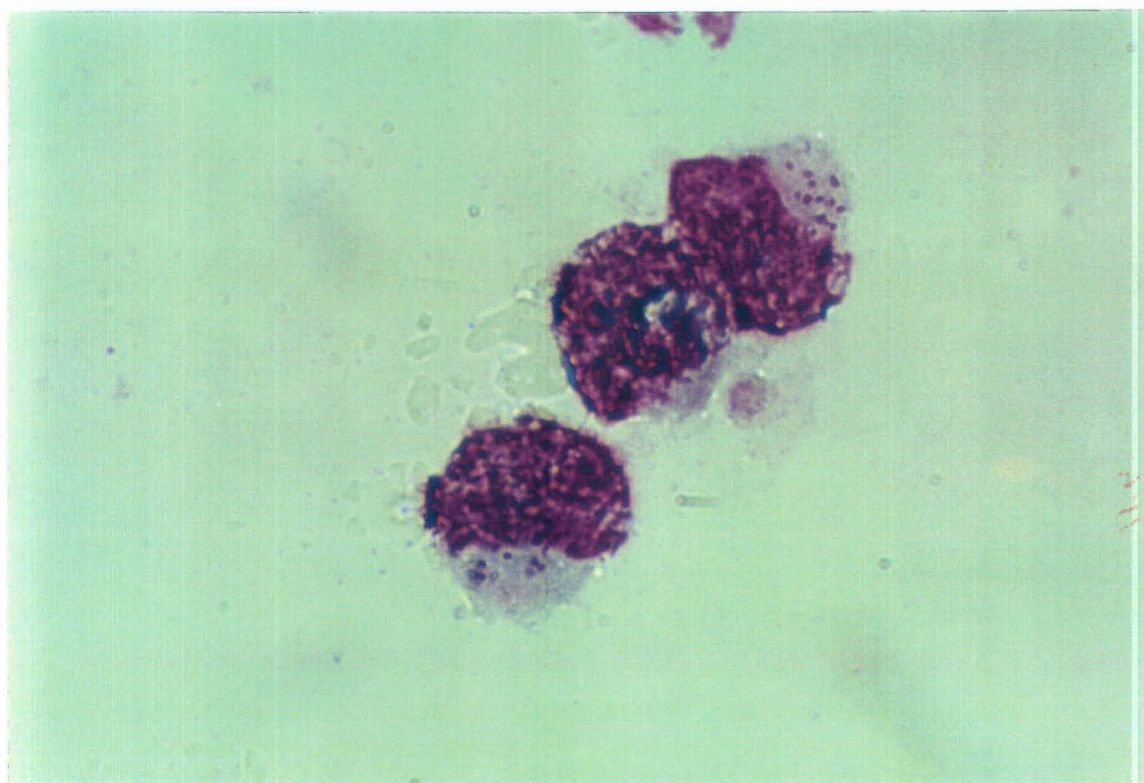
Fotografía 1: Sangre de la res 28E de la que se partió para realizar el aislamiento de linfoblastos infectados. Tinción de Giemsa al 10%.

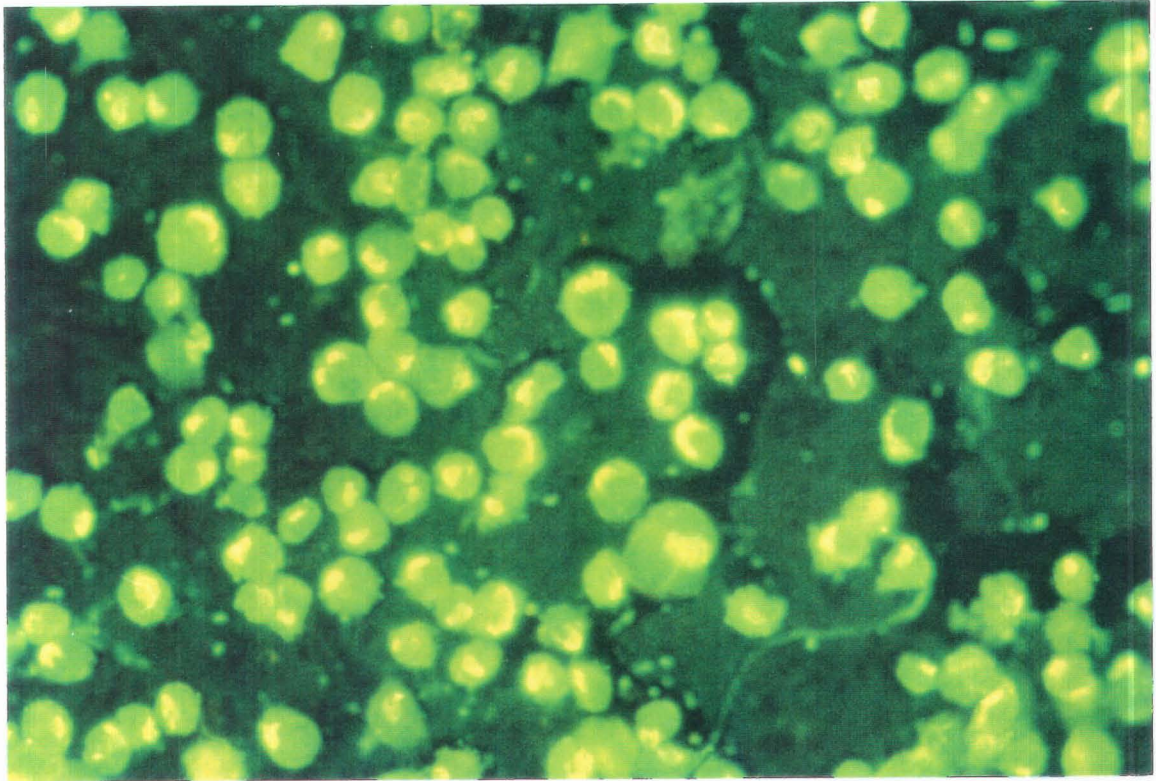


Fotografía 2: Linfoblastos bovinos aislados y establecidos en cultivo in vitro. Observación en fresco. Magnificación x 200.

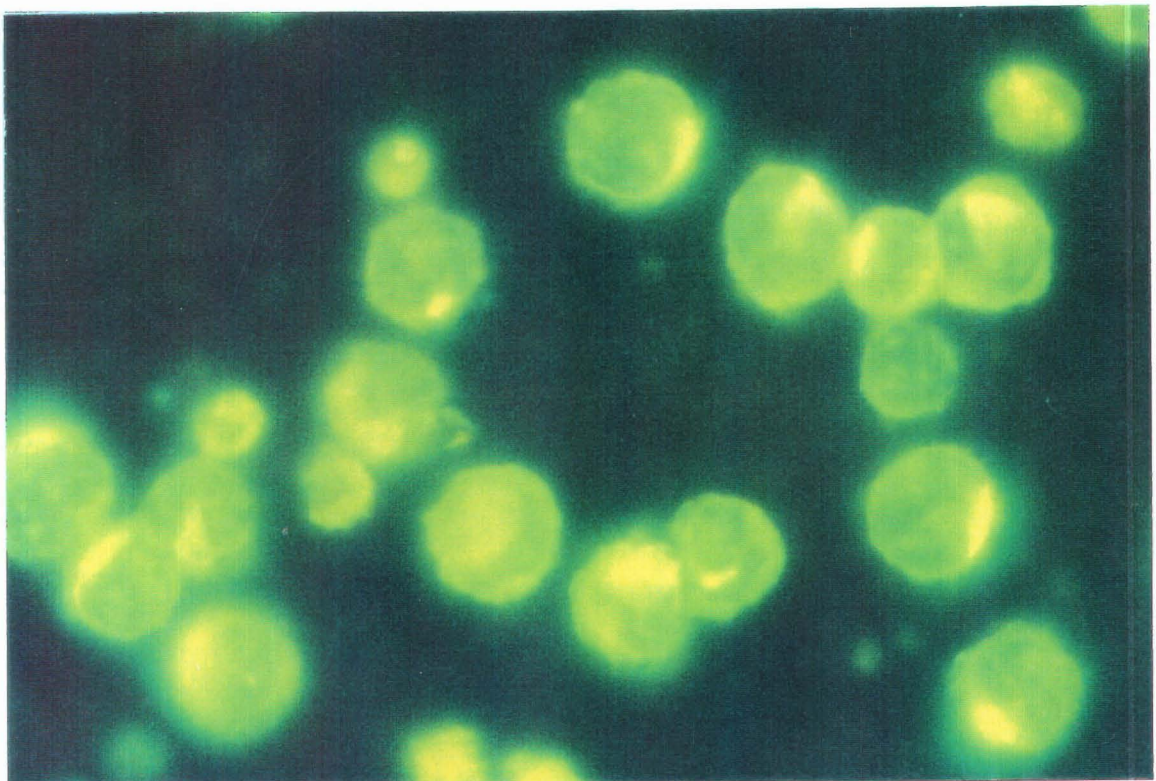


Fotografías 3 y 4: Linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de Theileria annulata. Línea 28E. Tinción de Giemsa. Magnificación x 1000.

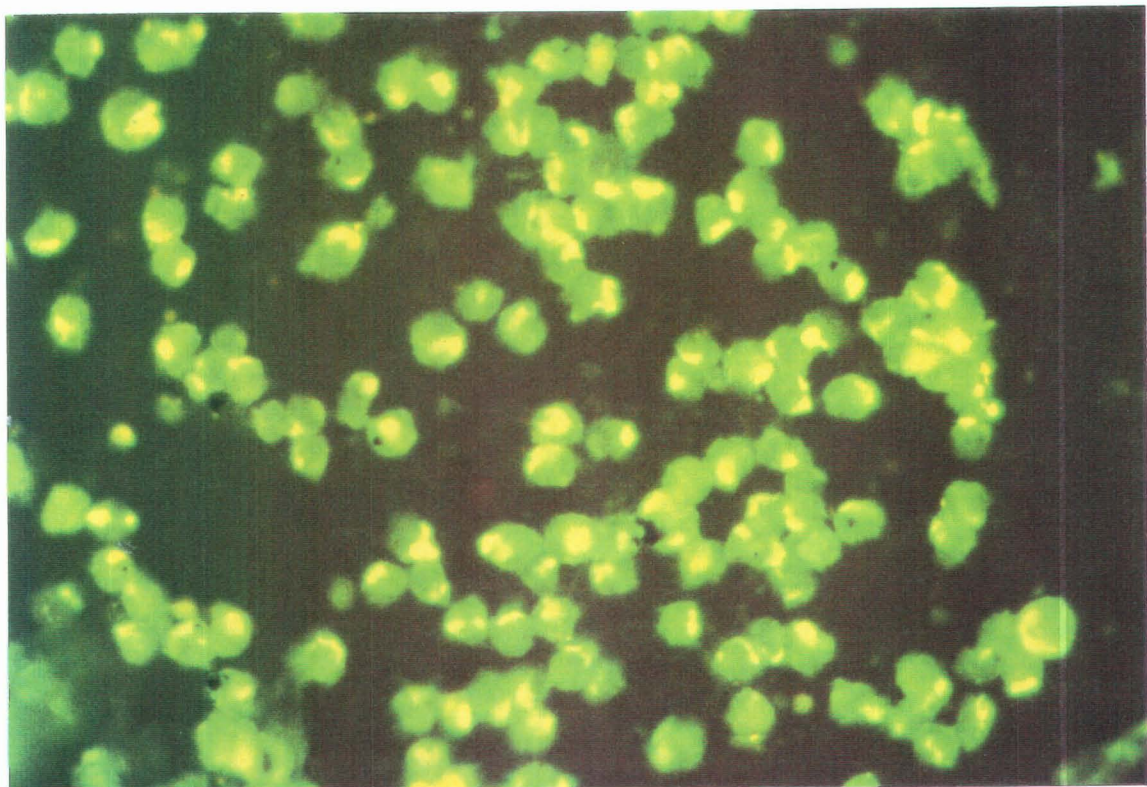




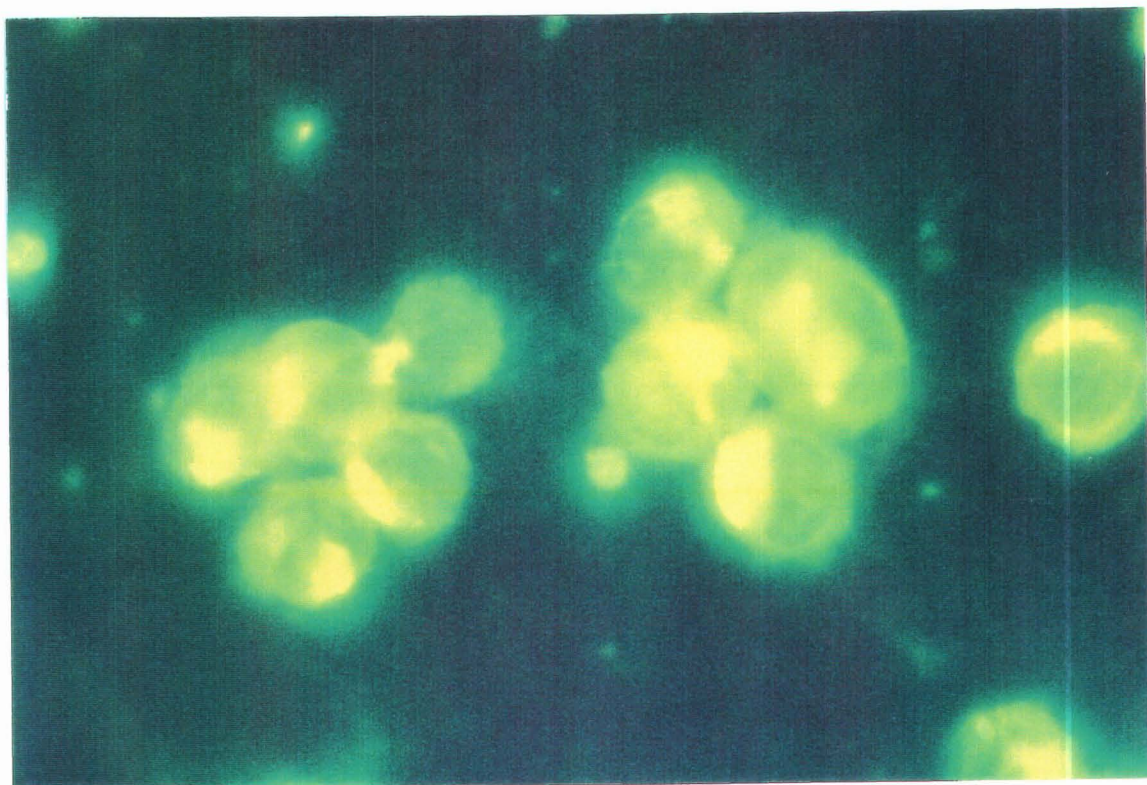
Fotografía 5: Línea celular 28E. Tinción por I.I.F.
Magnificación x 400.



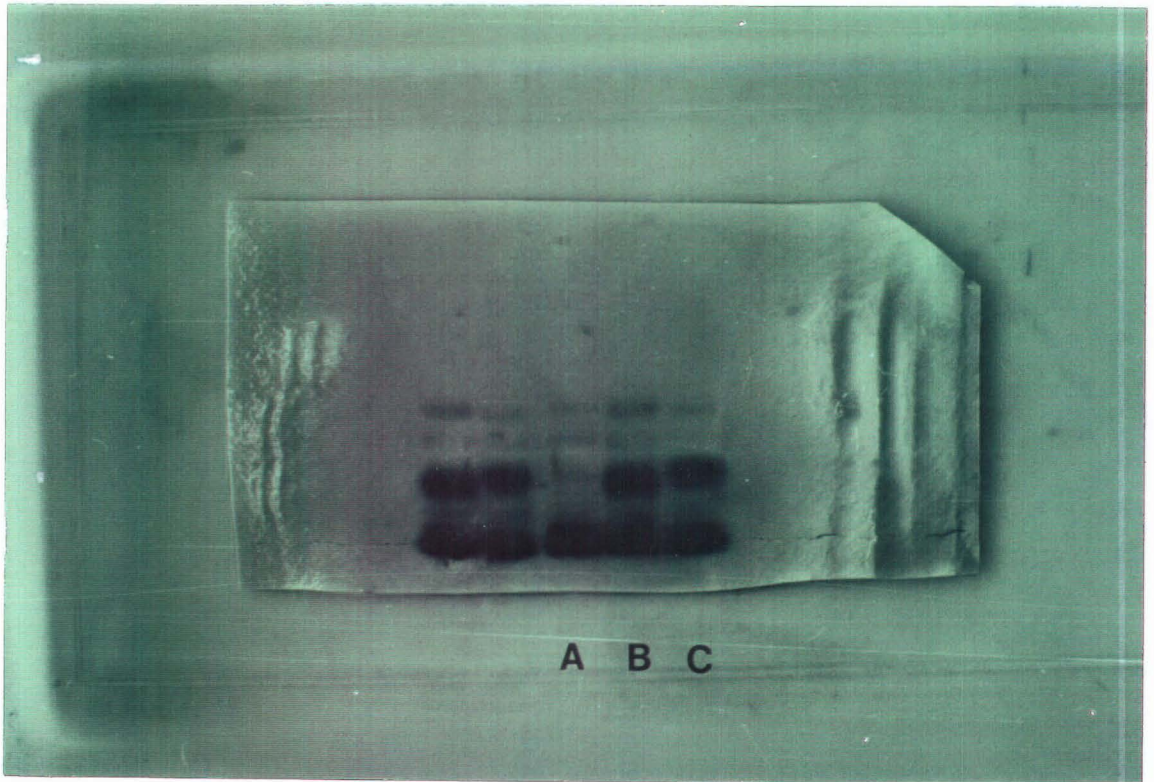
Fotografía 6: Línea celular 104. Tinción por I.F.I.
Magnificación x 1000.



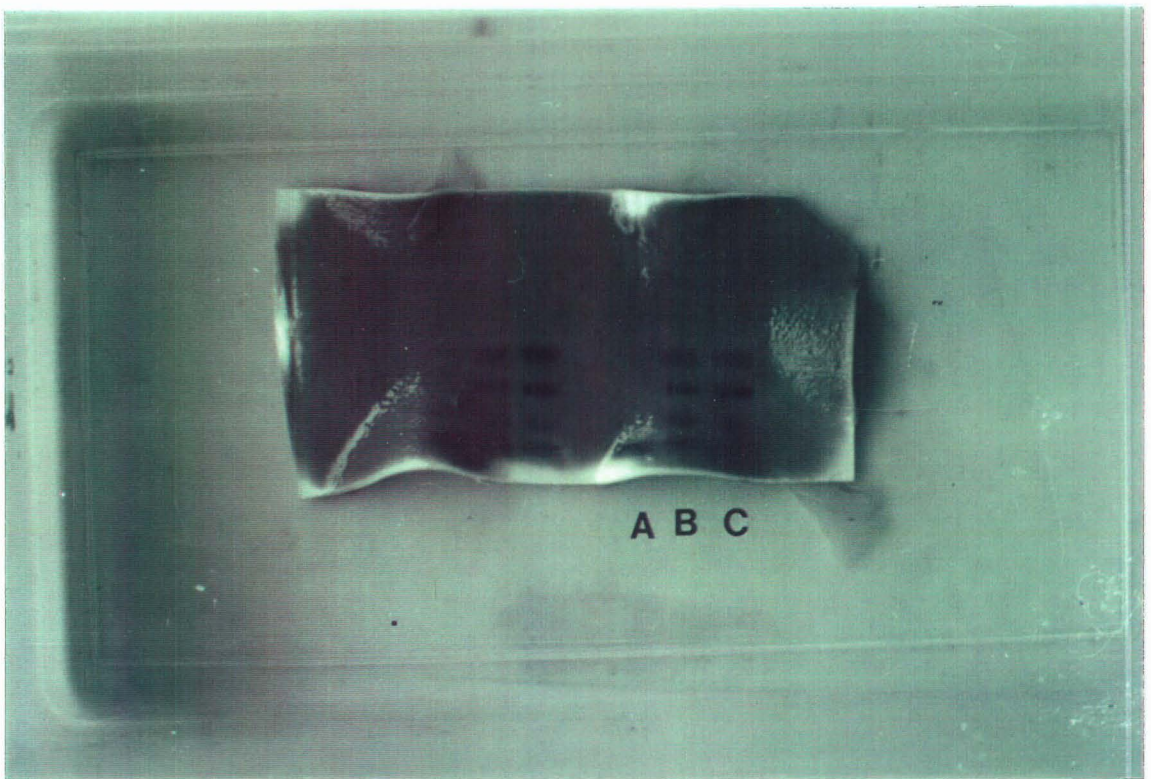
Fotografía 7: Línea celular 107. Tinción por I.F.I., magnificación x 400.



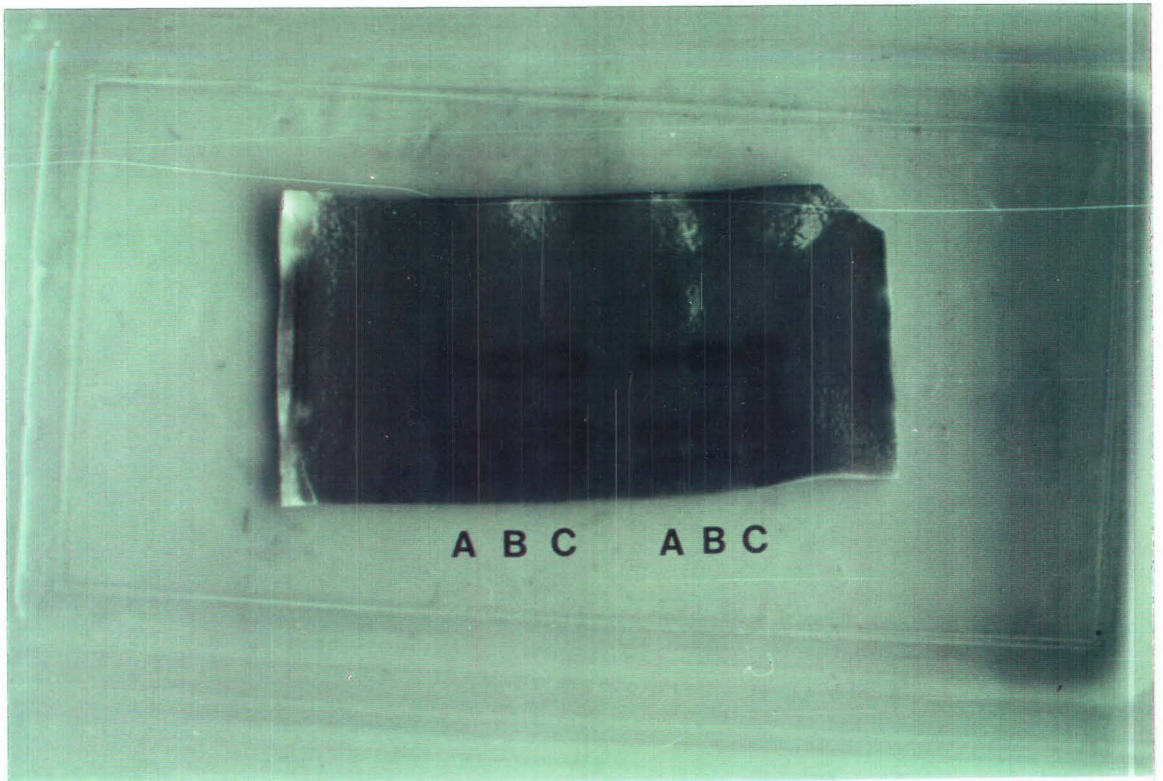
Fotografía 8: Línea celular 111. Tinción por I.F.I., magnificación x 1000.



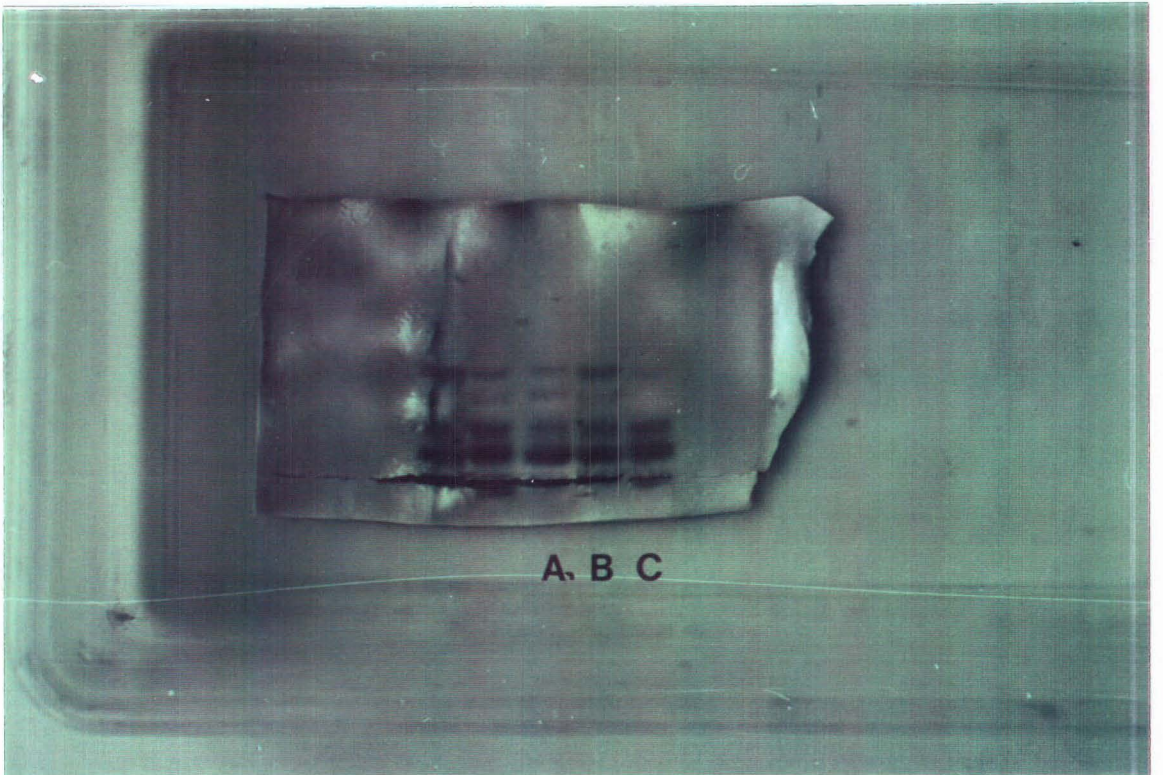
Fotografía 9: Isoenzima GPI. A(BL-20), B(28E), C(P-179).



Fotografía 10: Isoenzima ME. A(BL-20), B(28E), C(P-179).



Fotografía 11: Isoenzima MDH. A(BL-20), B(28E), C(P-179)



Fotografía 12: Isoenzima PGM. A(28E), B(P-179), C(BL-20)

SEROPREVALENCIA EN RESES DE ZONA ENDEMICA

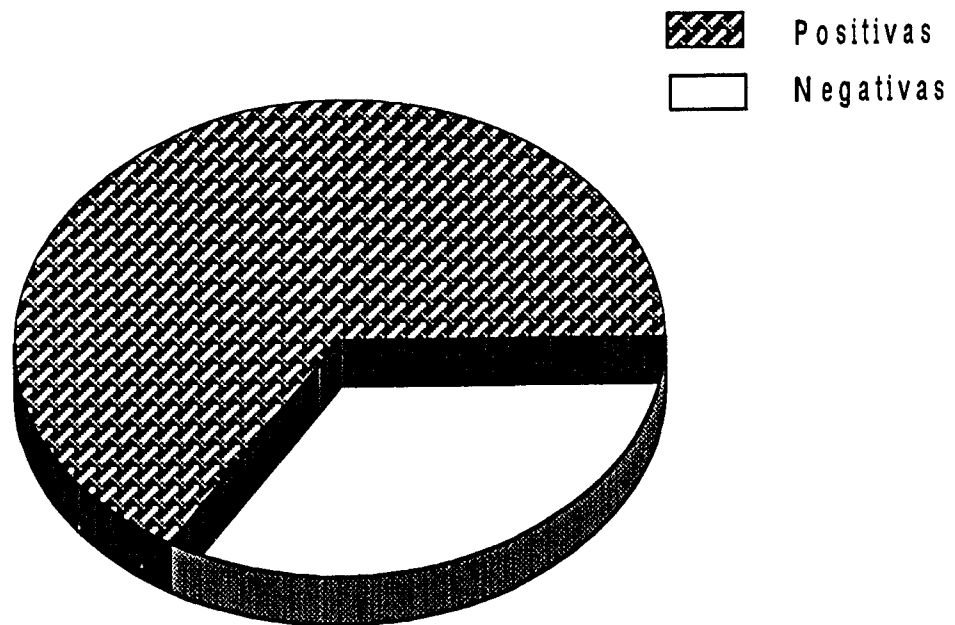


Figura nº 1: total de las reses muestreadas

SEROPREVALENCIA EN RESES DE ZONA ENDEMIICA

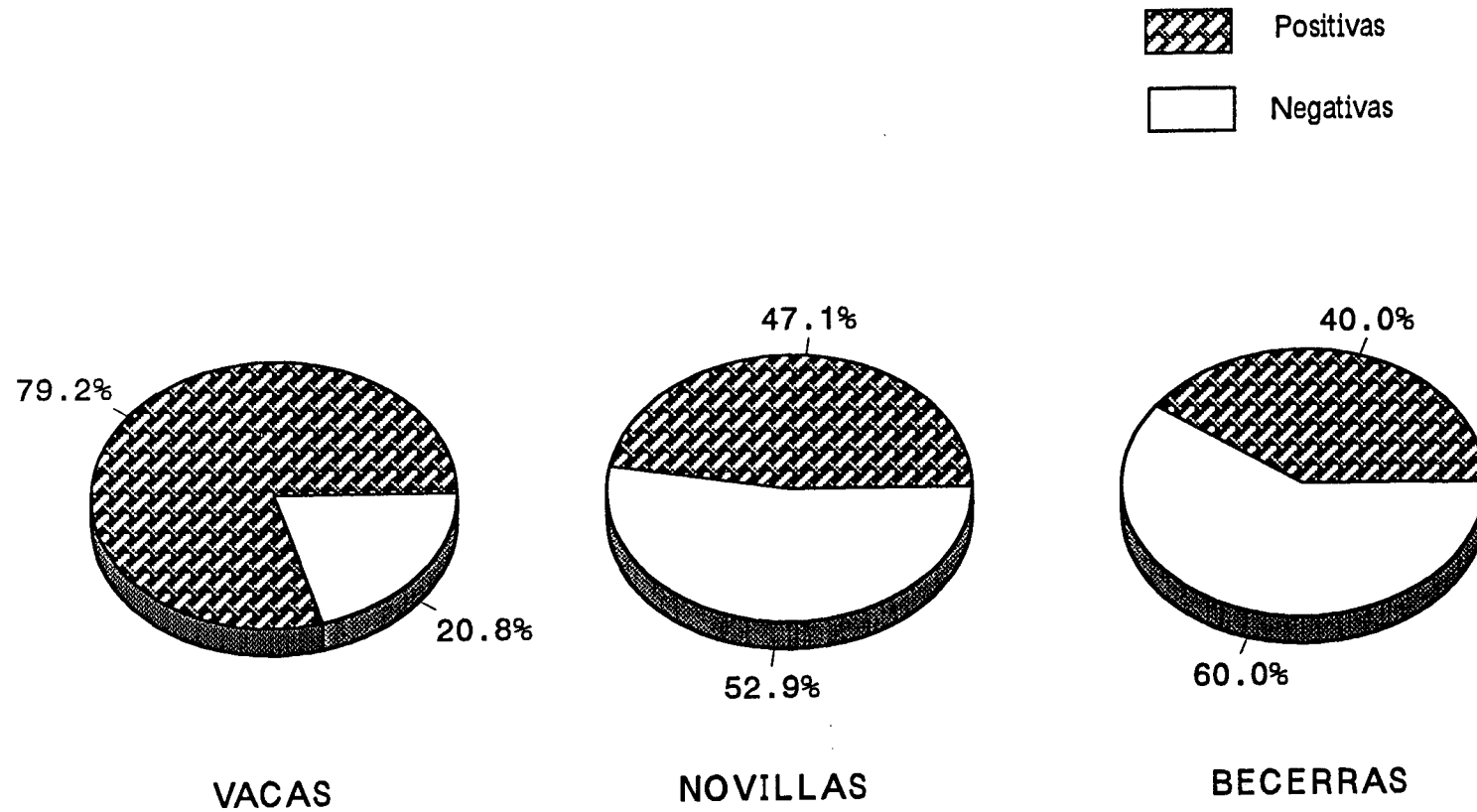


Figura n^o 2: Distribucion de la seroprevalencia en funcion de la edad de las reses.

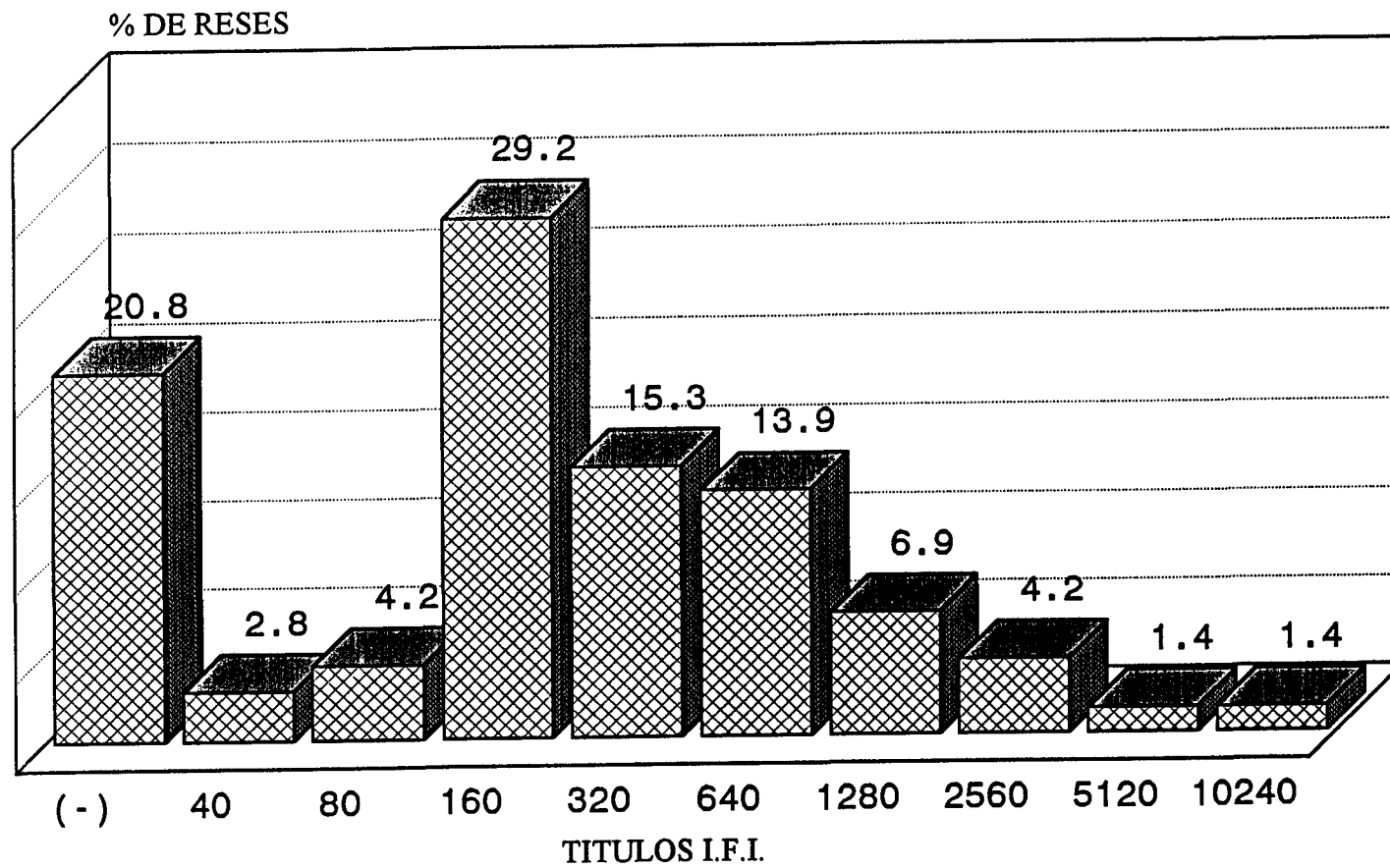


Figura nº 3 : Distribución de los títulos de anticuerpos en el grupo de las vacas

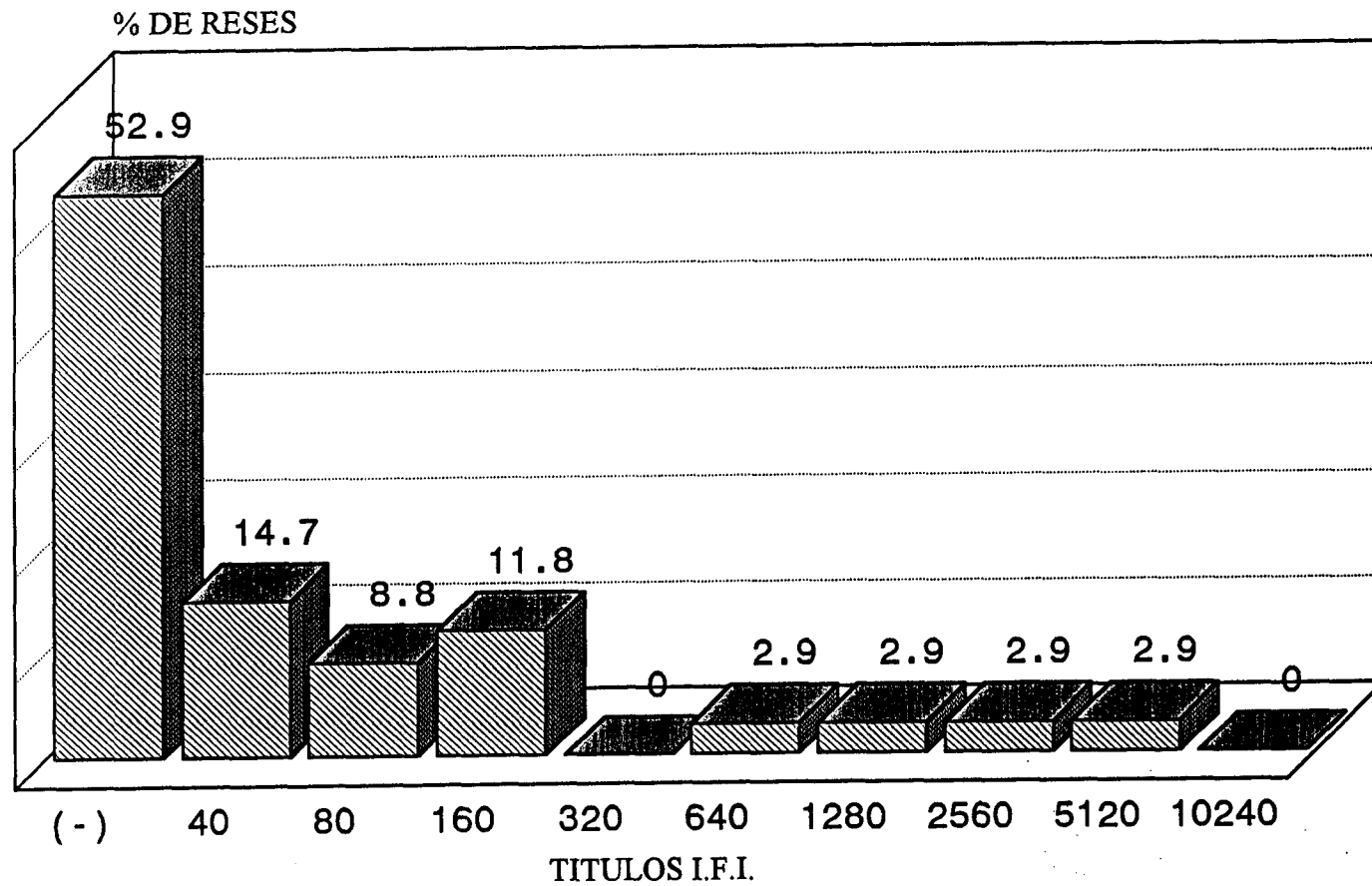


Figura n° 4: Distribución de los títulos de anticuerpos en el grupo de las novillas

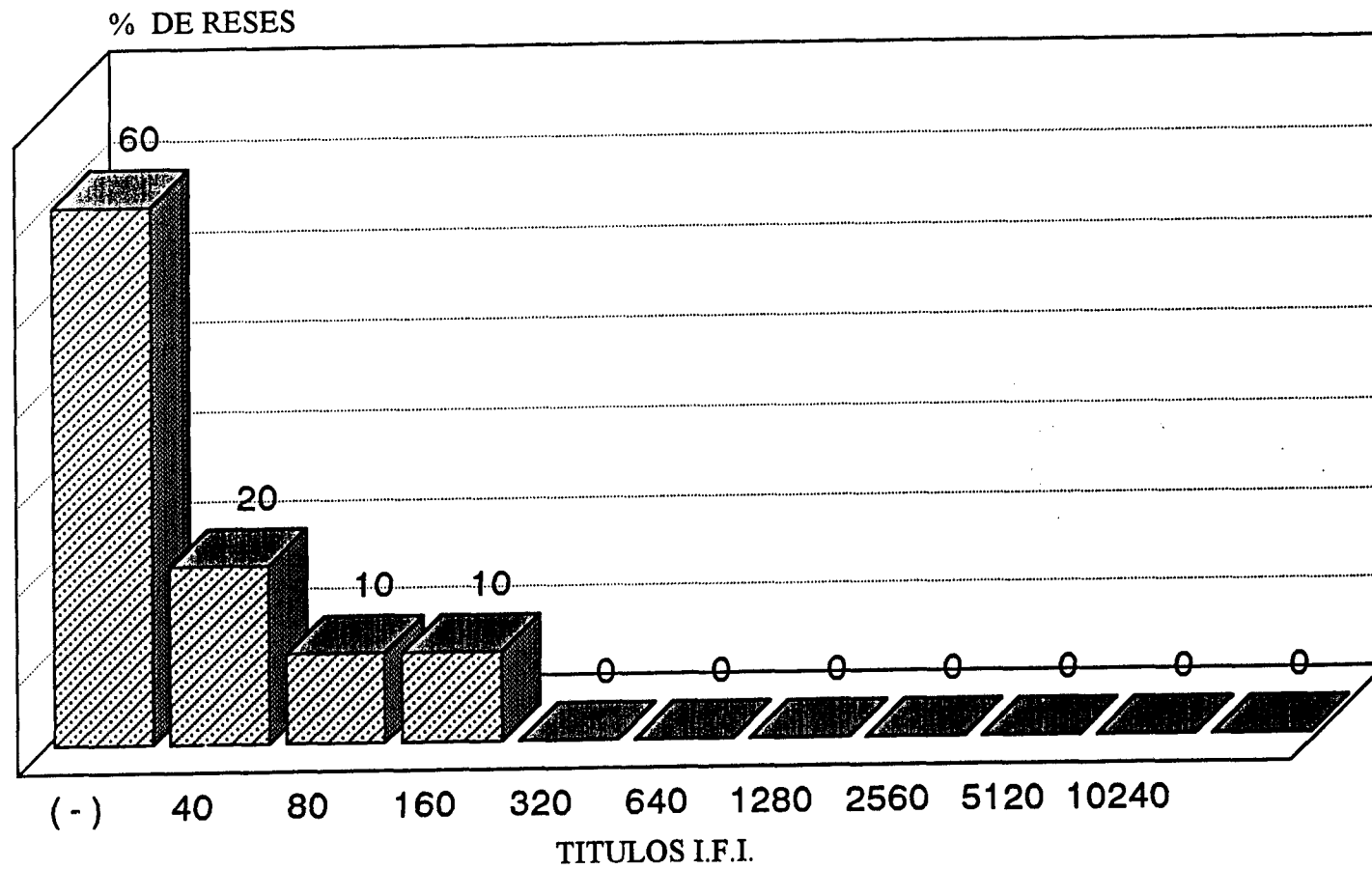


Figura n° 5: Distribución de los títulos de anticuerpos en el grupo de las becerras.

INFECCION EXPERIMENTAL RES N°99

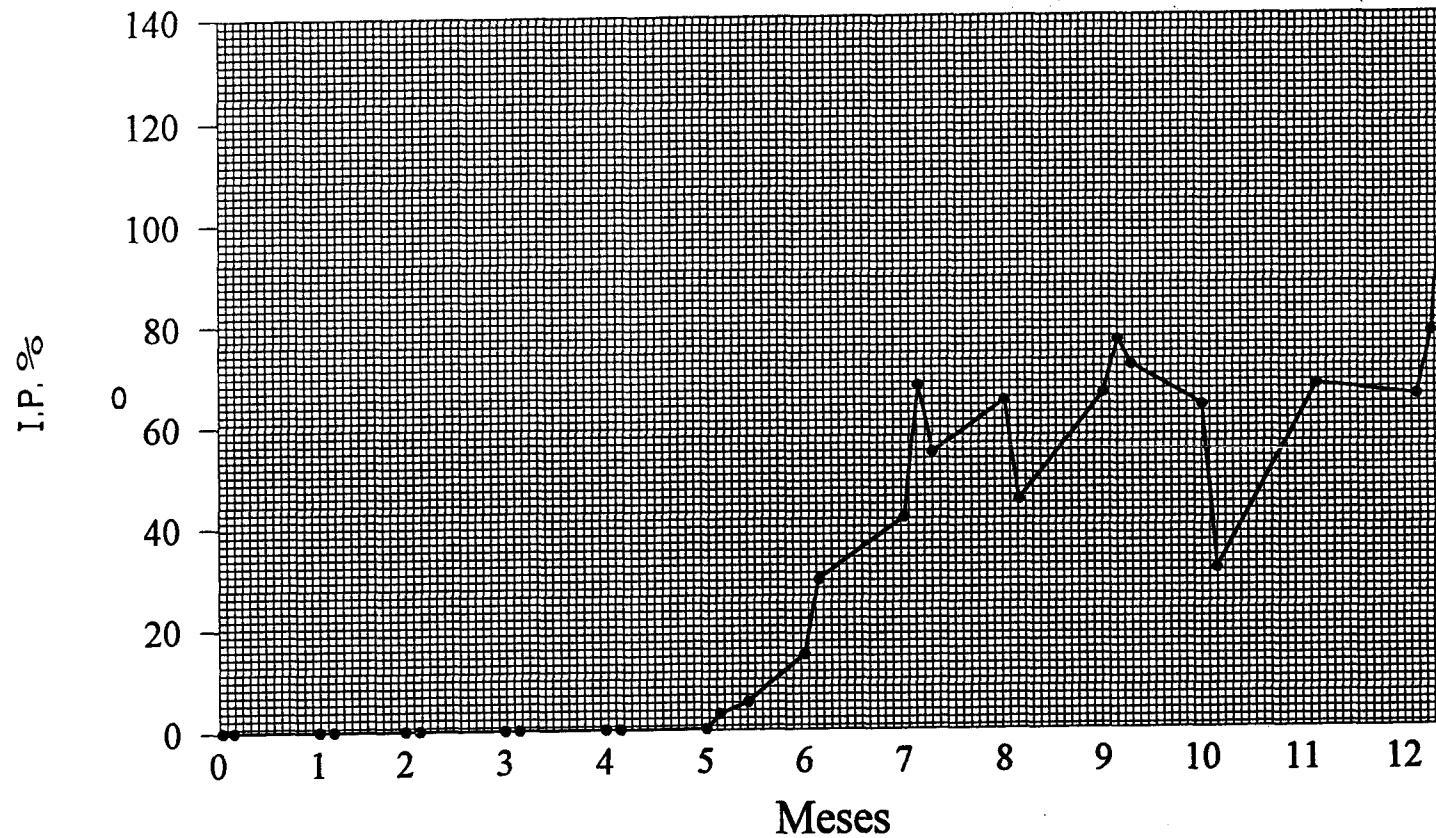


Figura n° 6: Índice de parasitacion alcanzado a lo largo del proceso.

INFECCION EXPERIMENTAL RES N°99

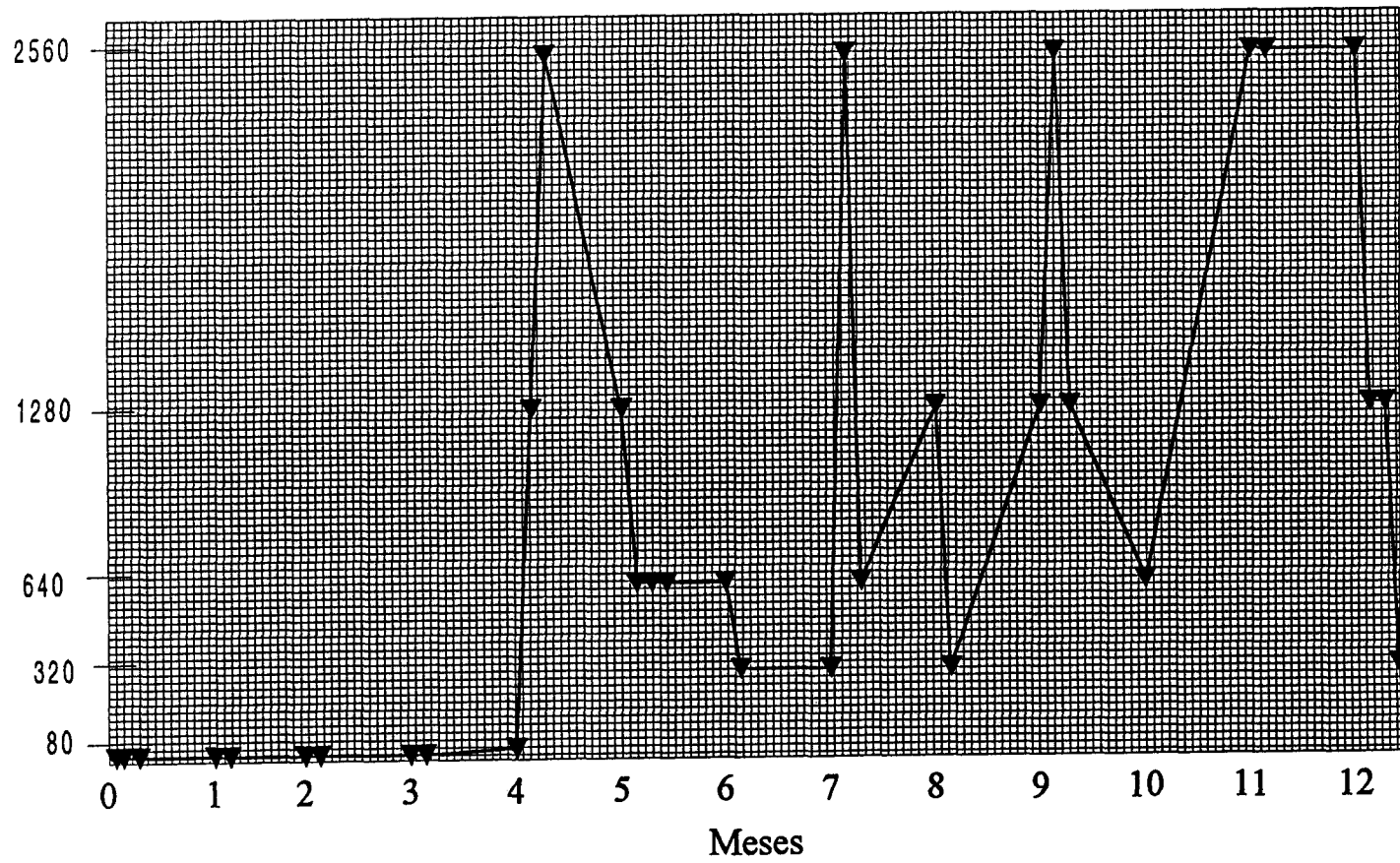


Figura n° 7: Títulos de anticuerpos alcanzados durante el proceso.

INFECCION EXPERIMENTAL RES N°99

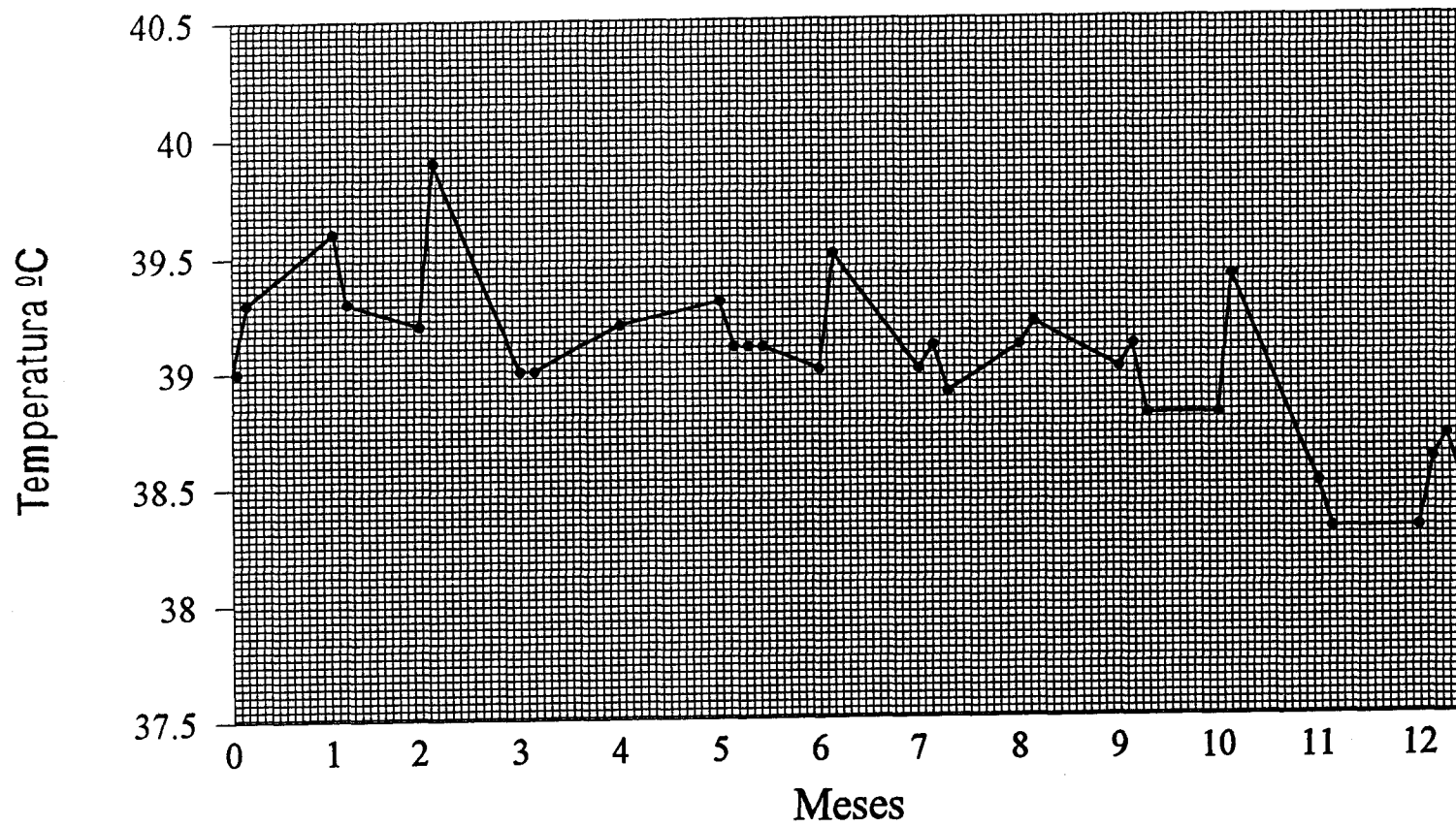


Figura n° 8: Temperaturas rectales registradas en la res durante el proceso.

INFECCION EXPERIMENTAL RES N°99

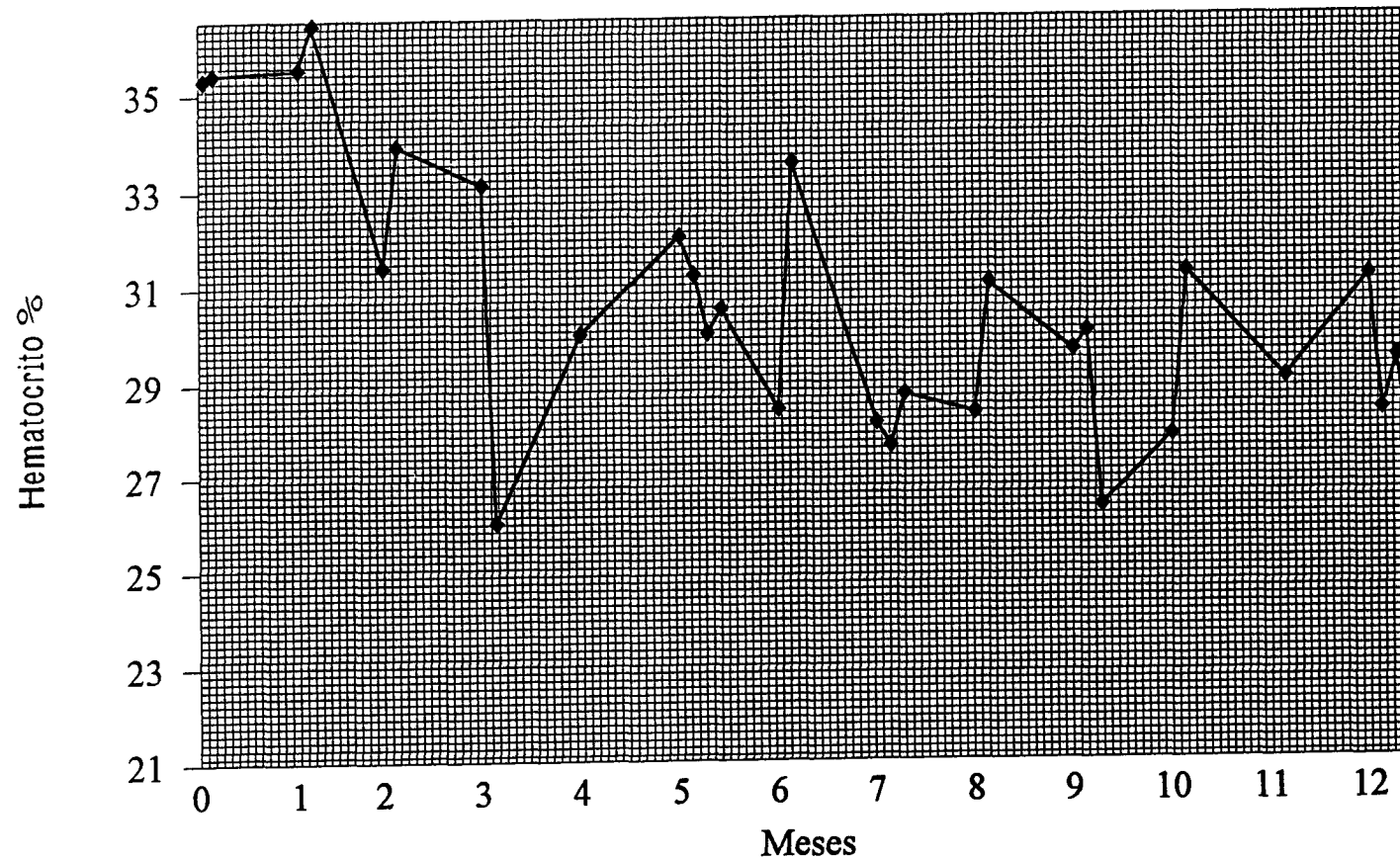


Figura n° 9: Hematocrito calculado en la sangre de la res durante el proceso..

AISLAMIENTO EN LA RES N° 97

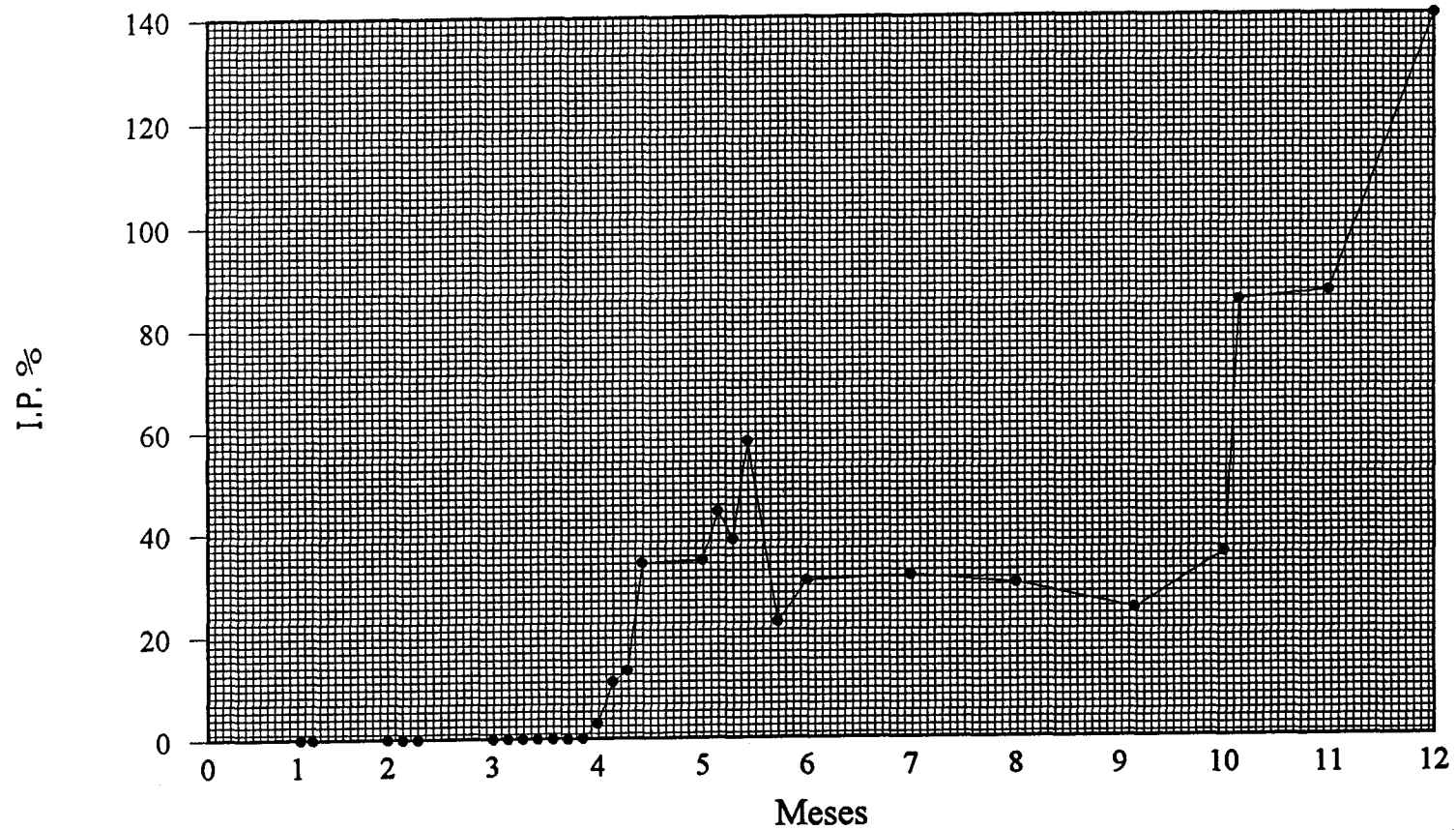


Figura n° 10: Índice de parasitación alcanzado a lo largo del proceso

AISLAMIENTO EN LA RES N° 97

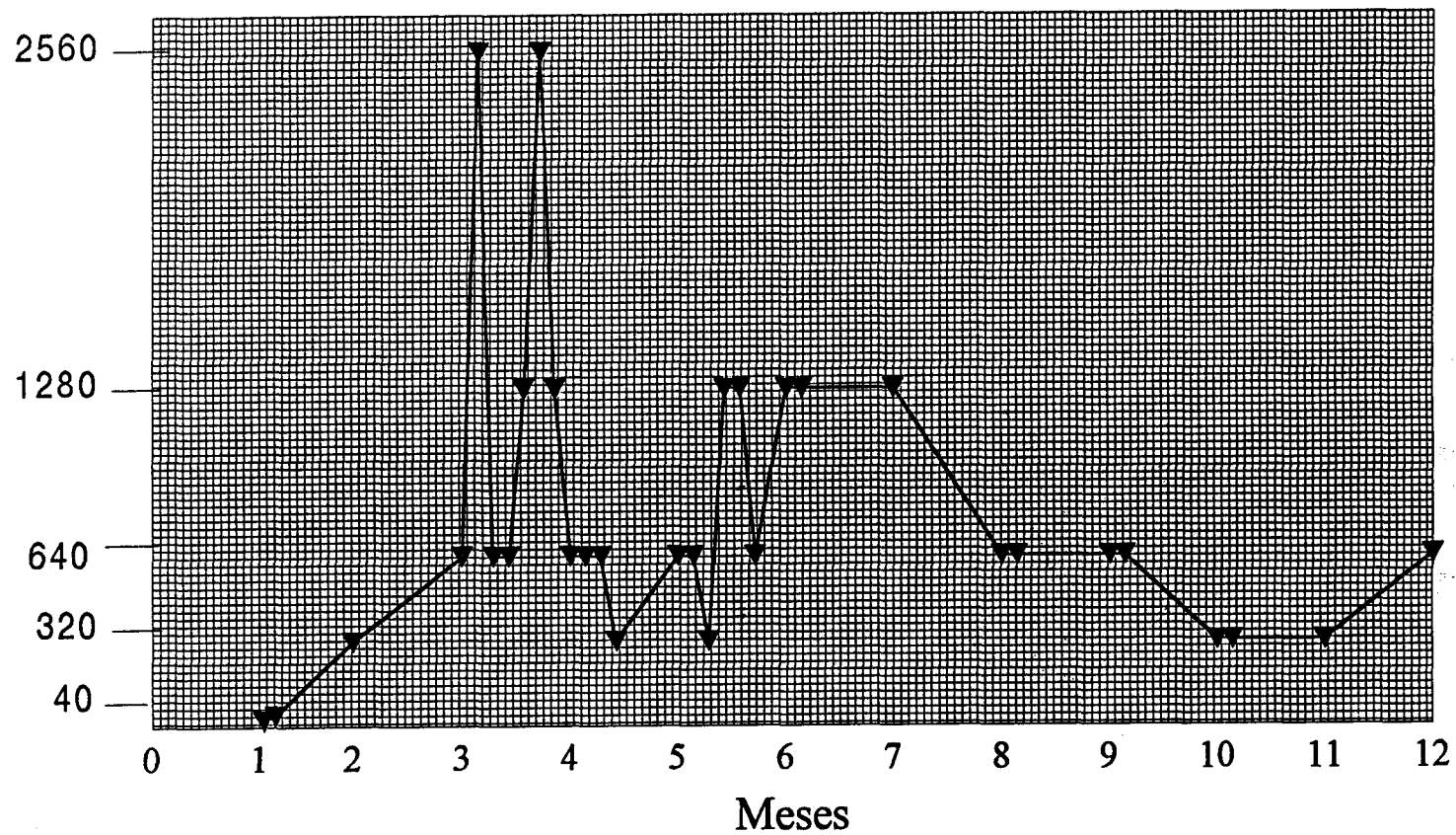


Figura n° 11: Título de anticuerpos alcanzado durante el proceso.

AISLAMIENTO EN LA RES N° 97

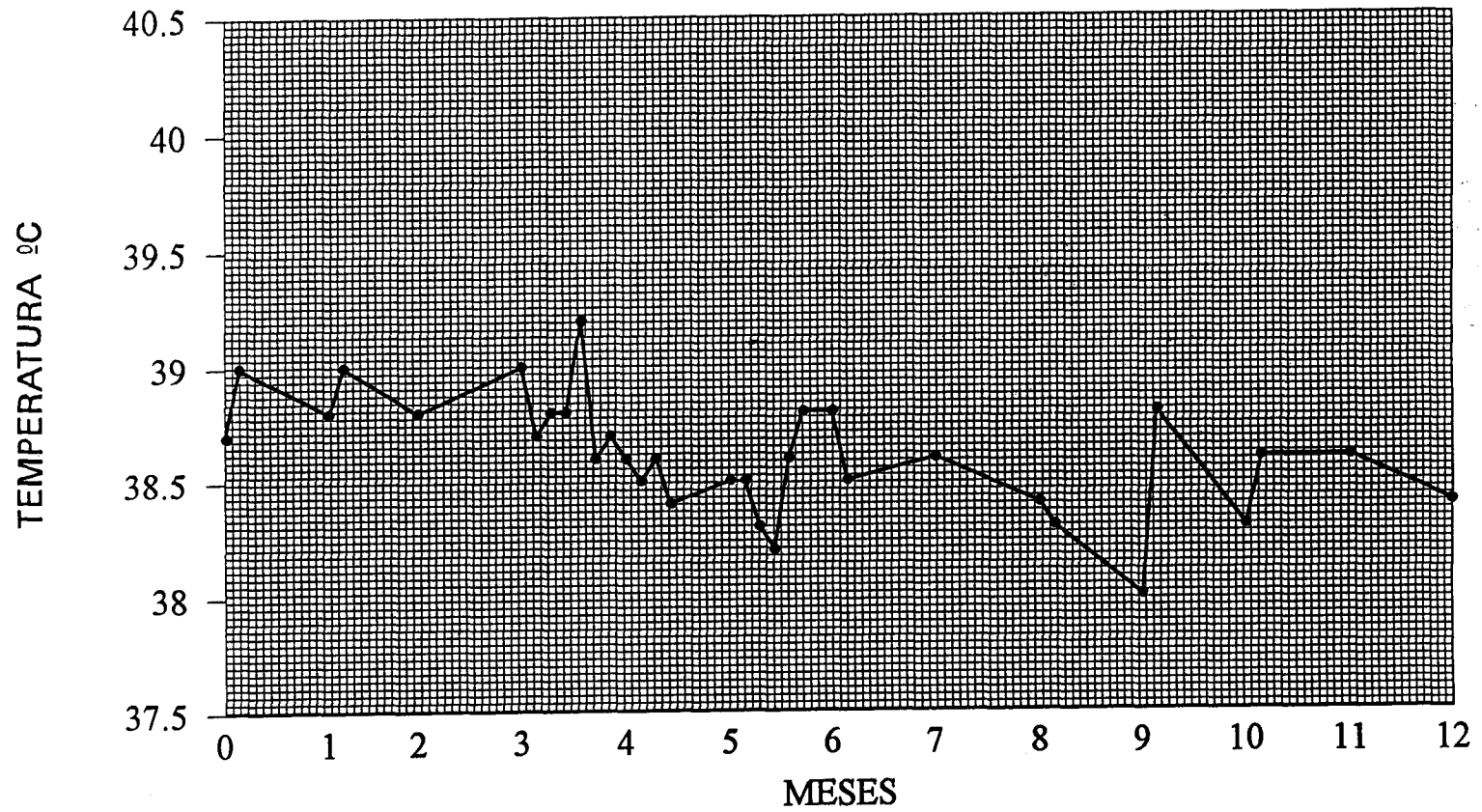


Figura n° 12: Temperaturas rectales alcanzadas por la res durante el proceso.

AISLAMIENTO EN LA RES N° 97

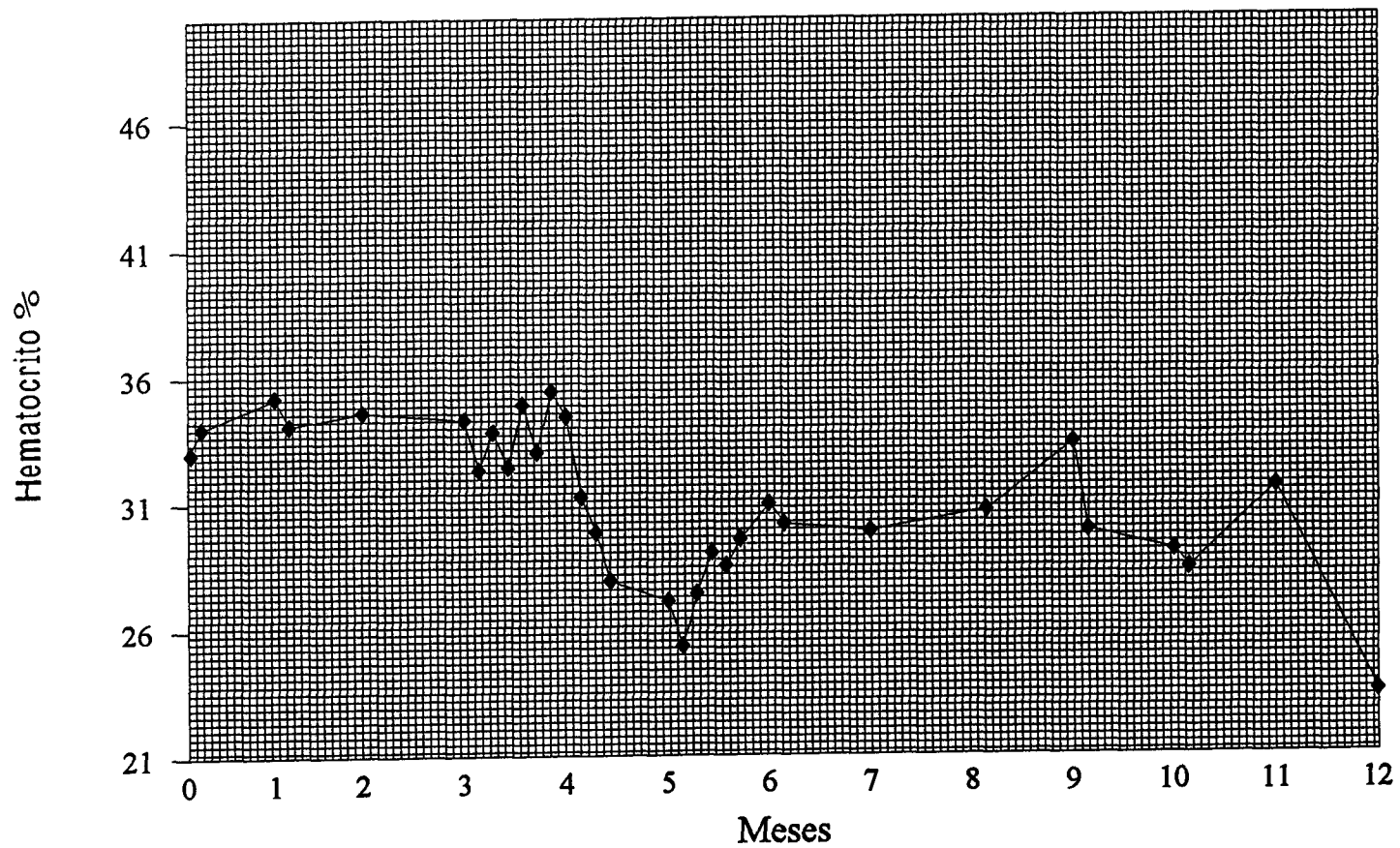


Figura n° 13: Hematocrito calculado en la sangre de la res durante el seguimiento

AISLAMIENTO EN LA RES N° 104

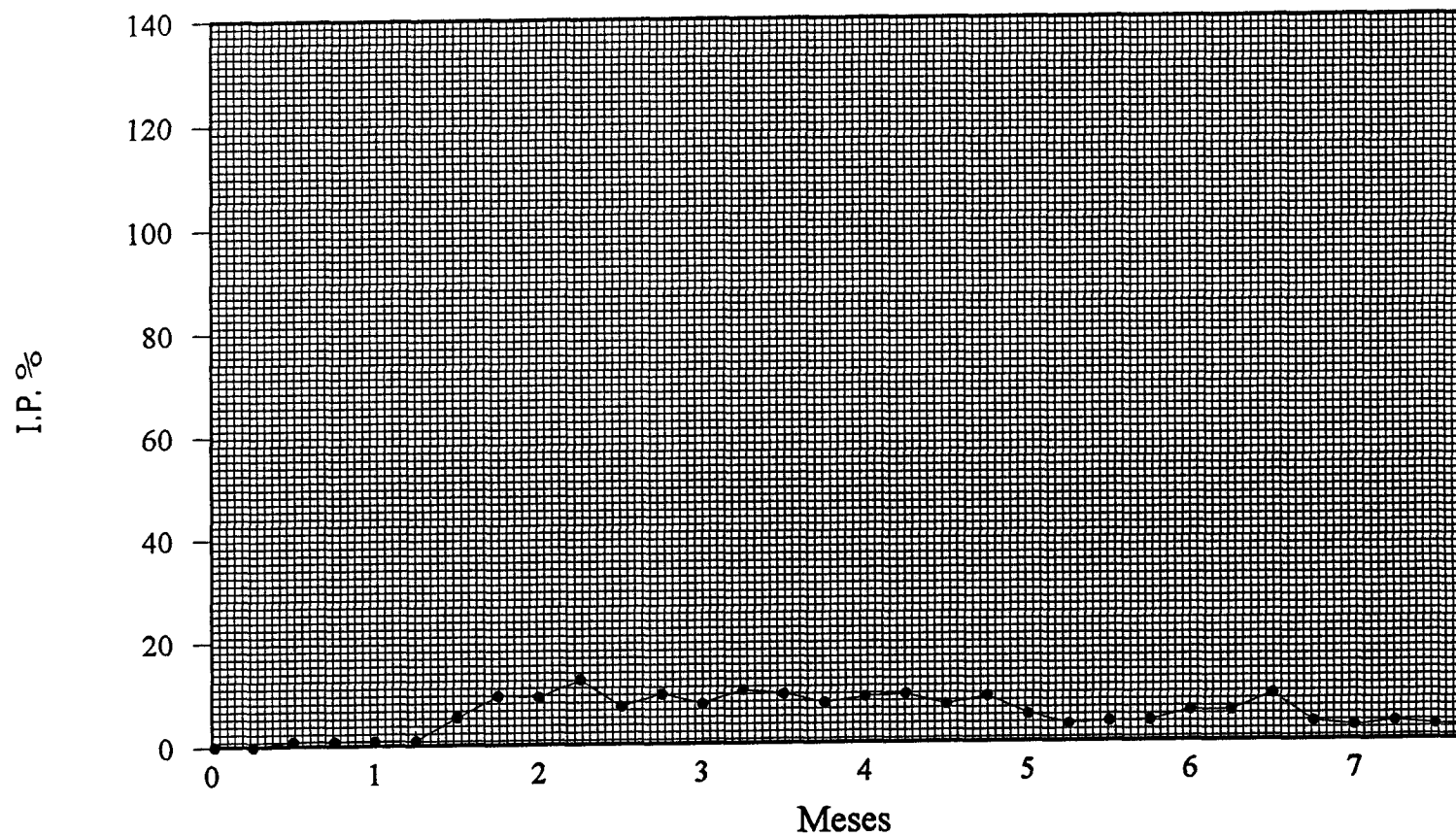


Figura n° 14: Índice de parasitación alcanzado a lo largo del proceso

AISLAMIENTO EN LA RES N° 104

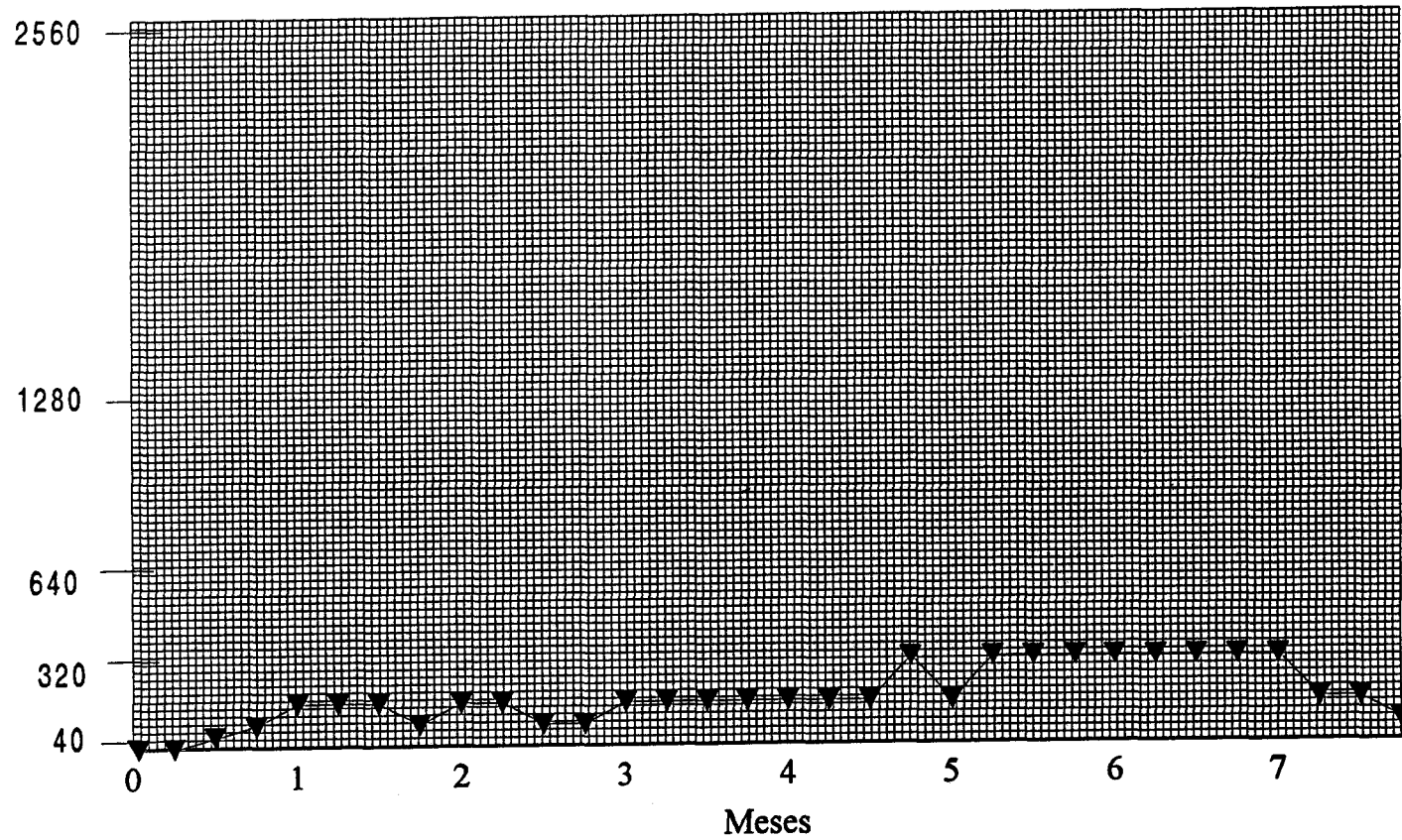


Figura n° 15: Titulo de anticuerpos alcanzado durante el proceso.

AISLAMIENTO EN LA RES N° 104

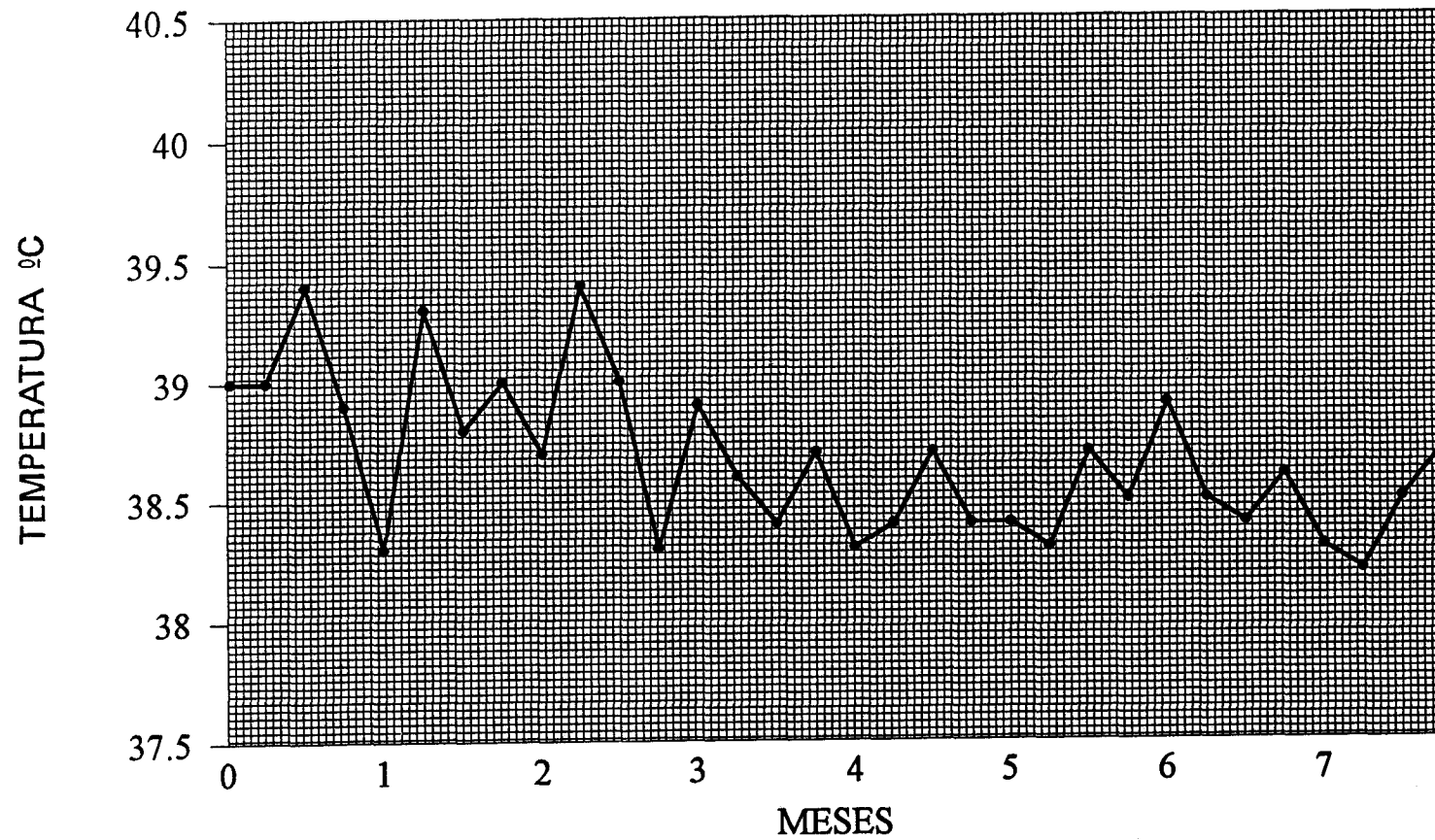


Figura n° 16: Temperaturas rectales alcanzadas por la res durante el proceso.

AISLAMIENTO EN LA RES N° 104

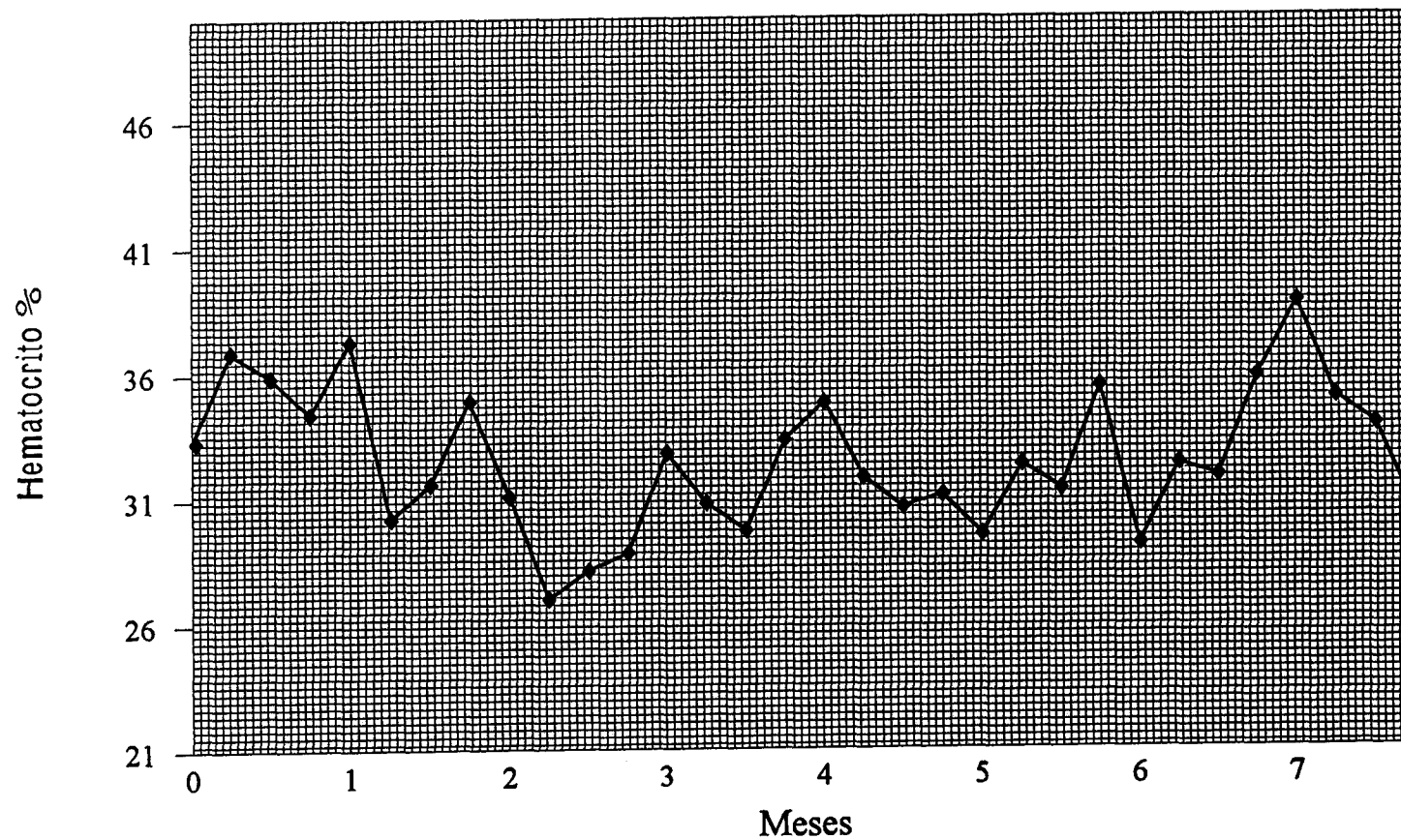


Figura n° 17: Hematocrito calculado en la sangre de la res durante el seguimiento

AISLAMIENTO EN LA RES N° 104

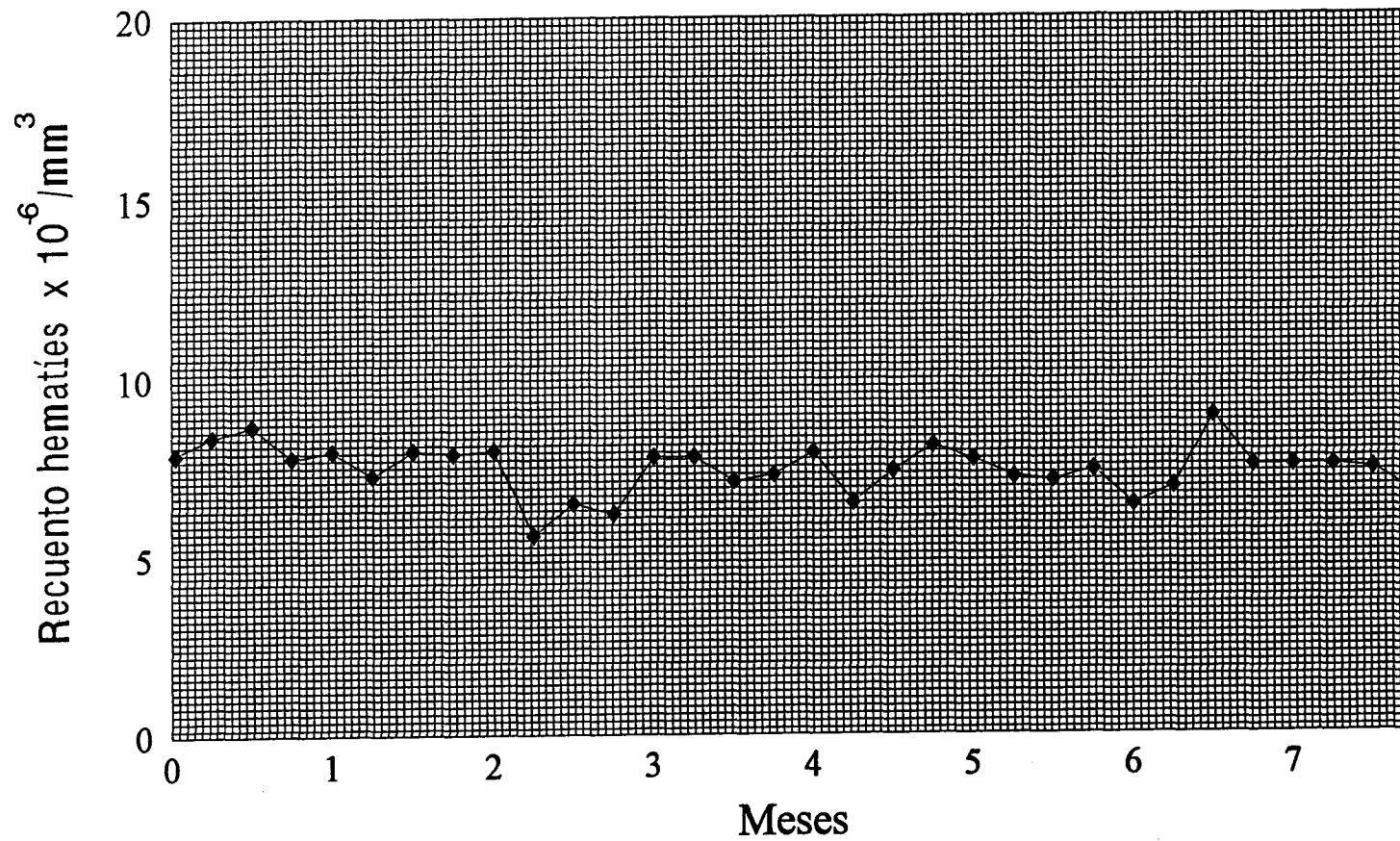


Figura n° 18: Recuento de glóbulos rojos en la sangre de la res durante el seguimiento

AISLAMIENTO EN LA RES N° 104

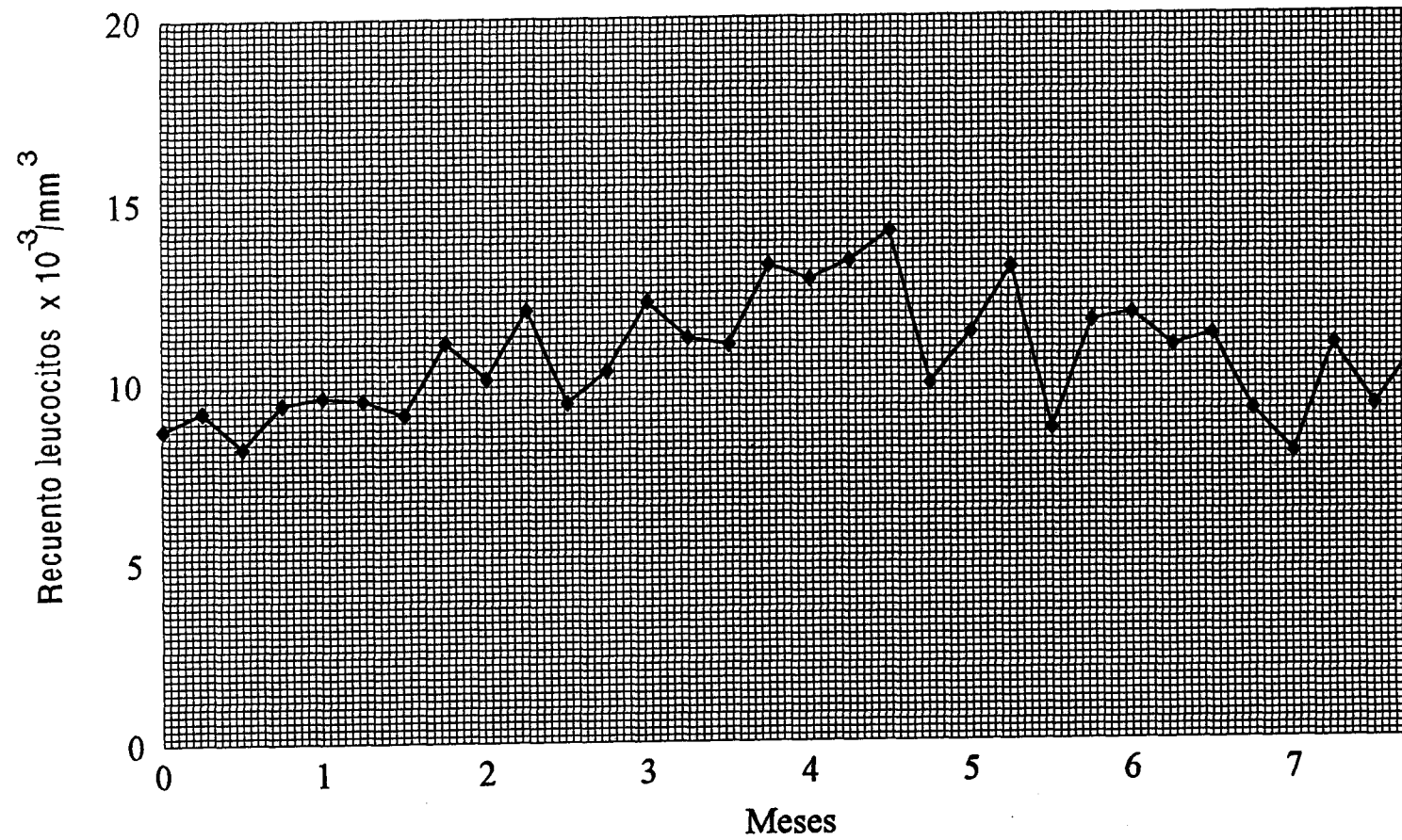


Figura n° 19: Recuento de glóbulos blancos en la sangre de la res durante el seguimiento.

AISLAMIENTO EN LA RES N° 111

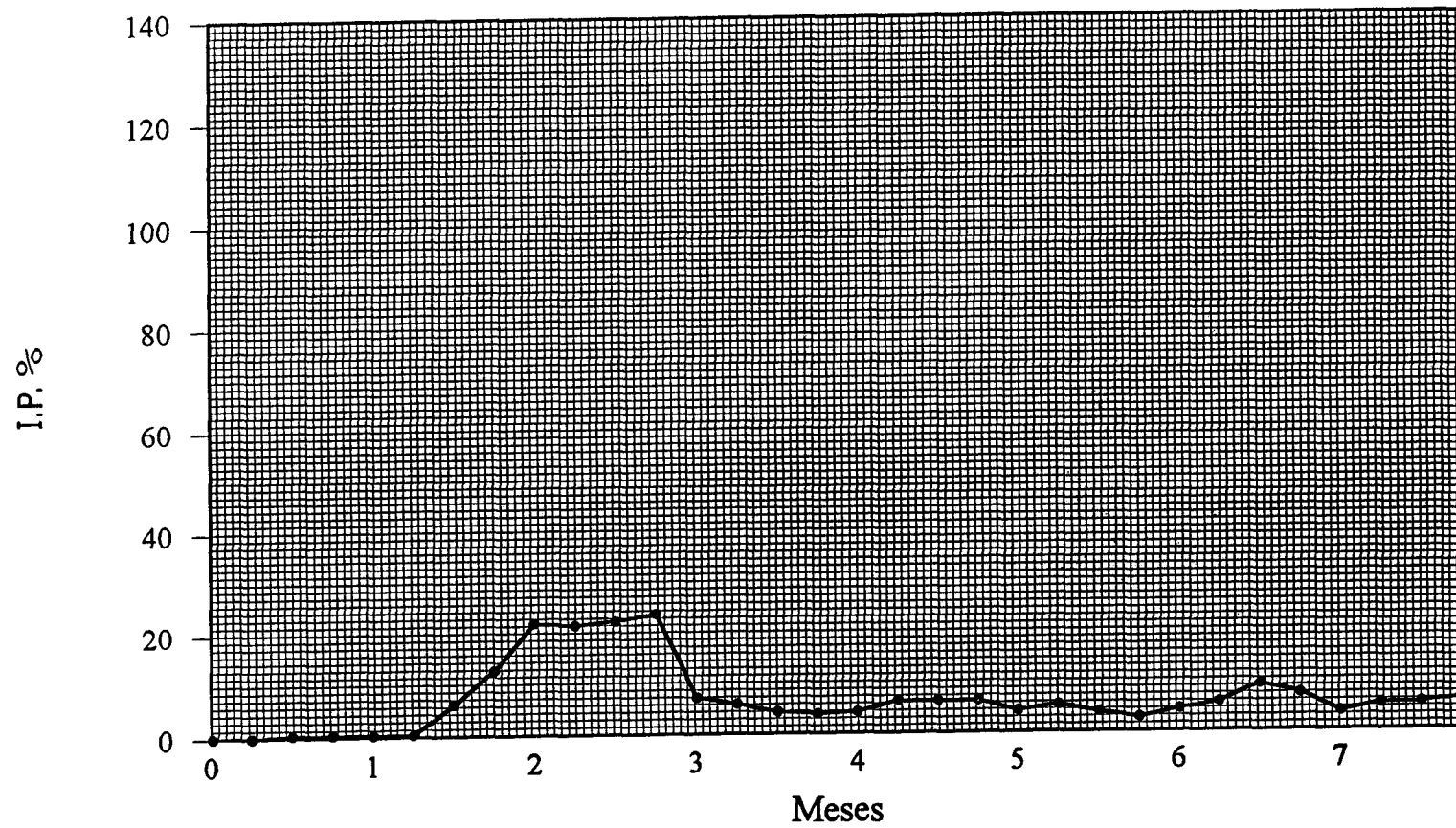


Figura n° 20: Índice de parasitación alcanzado a lo largo del proceso

AISLAMIENTO EN LA RES N° 111

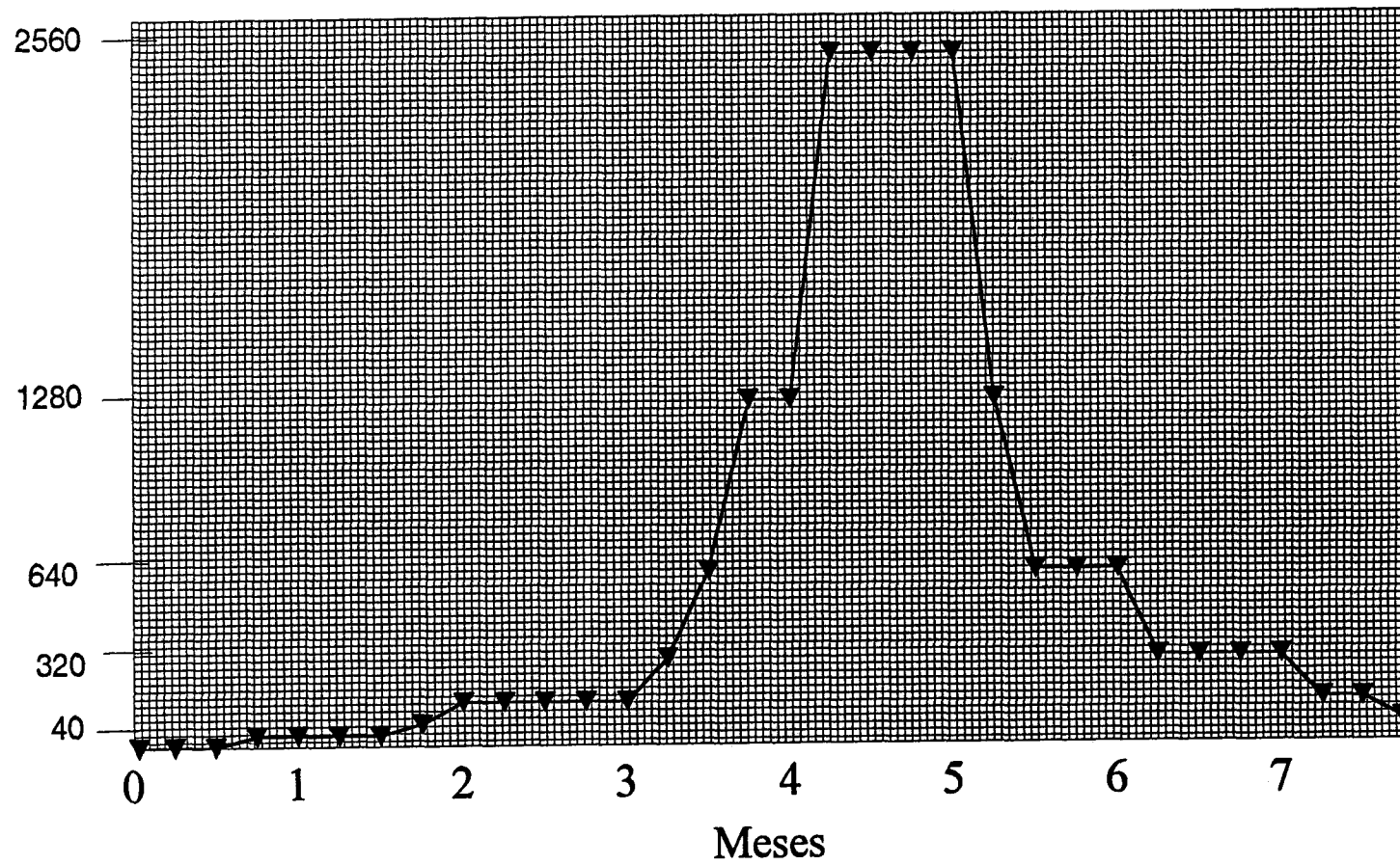


Figura n° 21: Titulo de anticuerpos alcanzado durante el proceso.

AISLAMIENTO EN LA RES N° 111

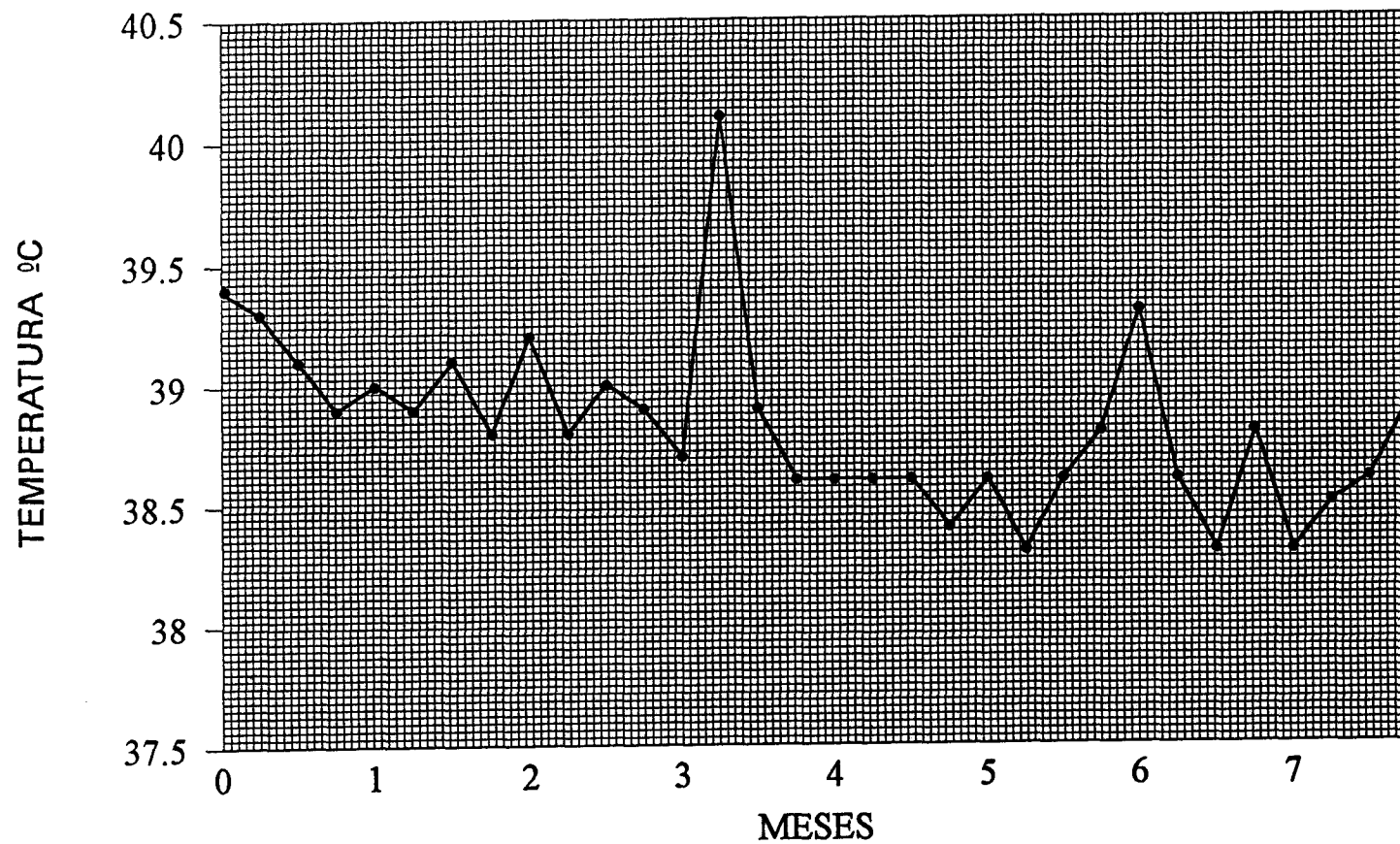


Figura n° 22: Temperaturas rectales alcanzadas por la res durante el proceso.

AISLAMIENTO EN LA RES N° 111

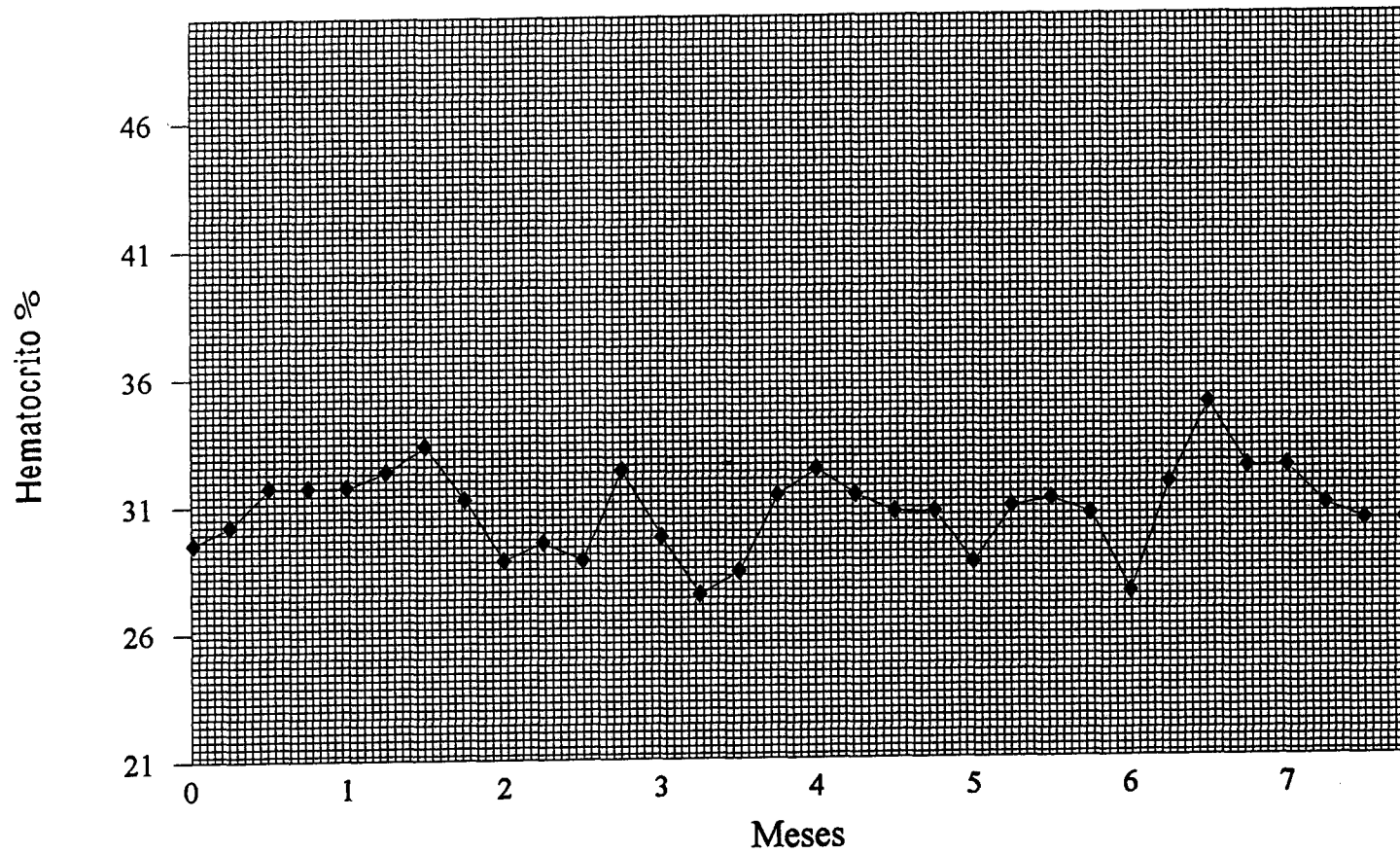


Figura n° 23: Hematocrito calculado en la sangre de la res durante el seguimiento

AISLAMIENTO EN LA RES N° 111

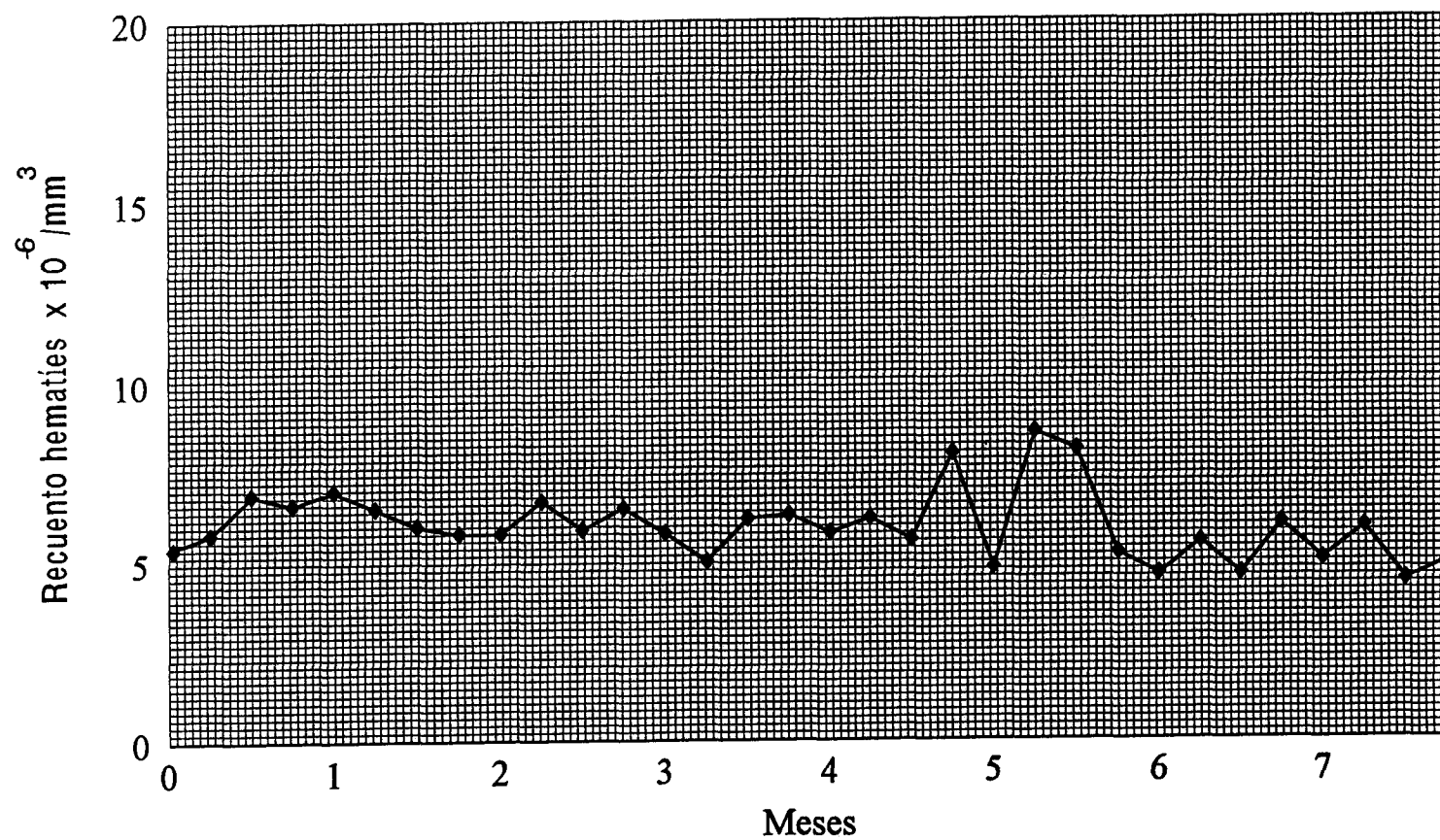


Figura n° 24: Recuento de glóbulos rojos en la sangre de la res durante el seguimiento.

AISLAMIENTO EN LA RES N° 111

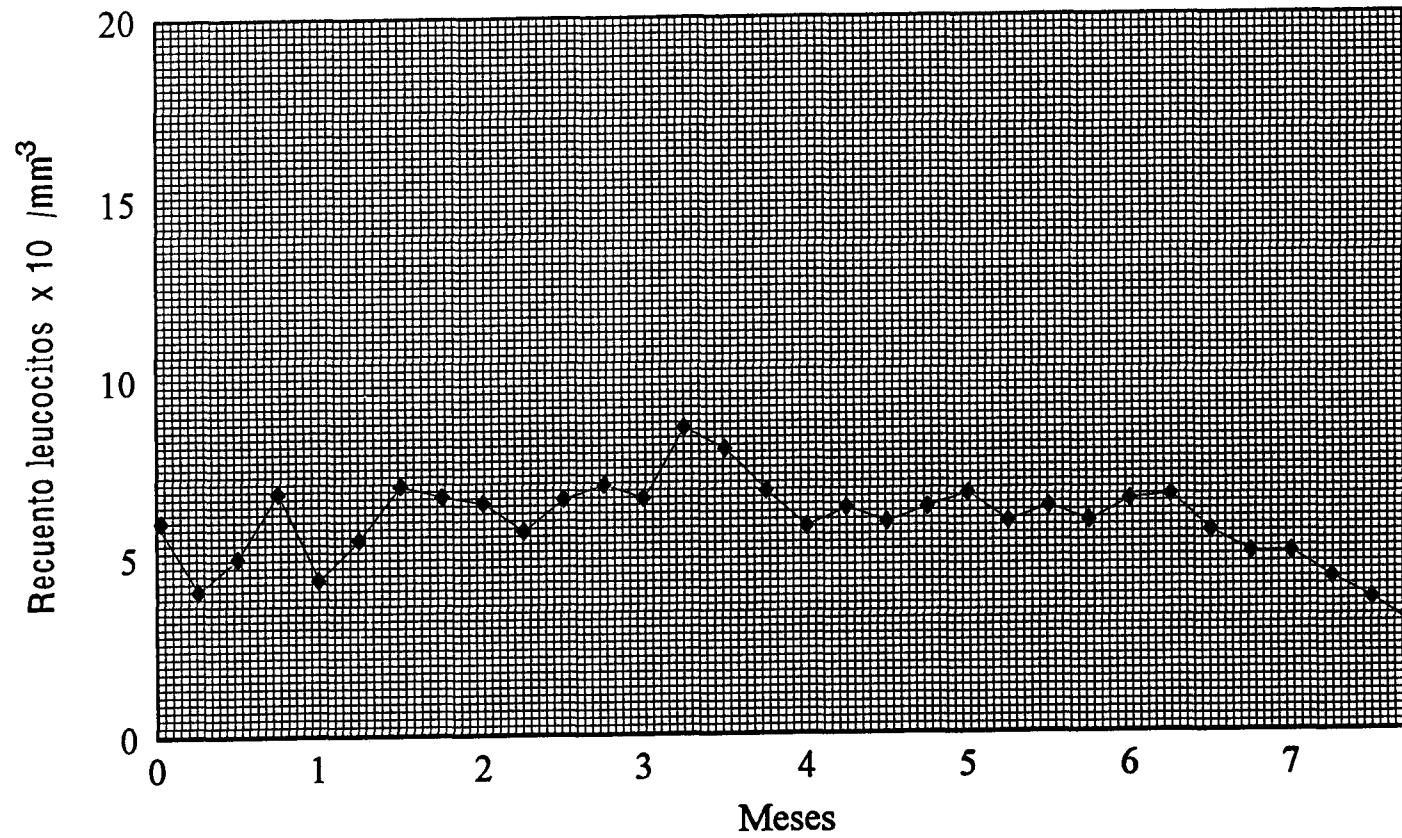


Figura n° 25: Recuento de glóbulos blancos en la sangre de la res durante el seguimiento.

SEGUIMIENTO DE LA RES N° 50

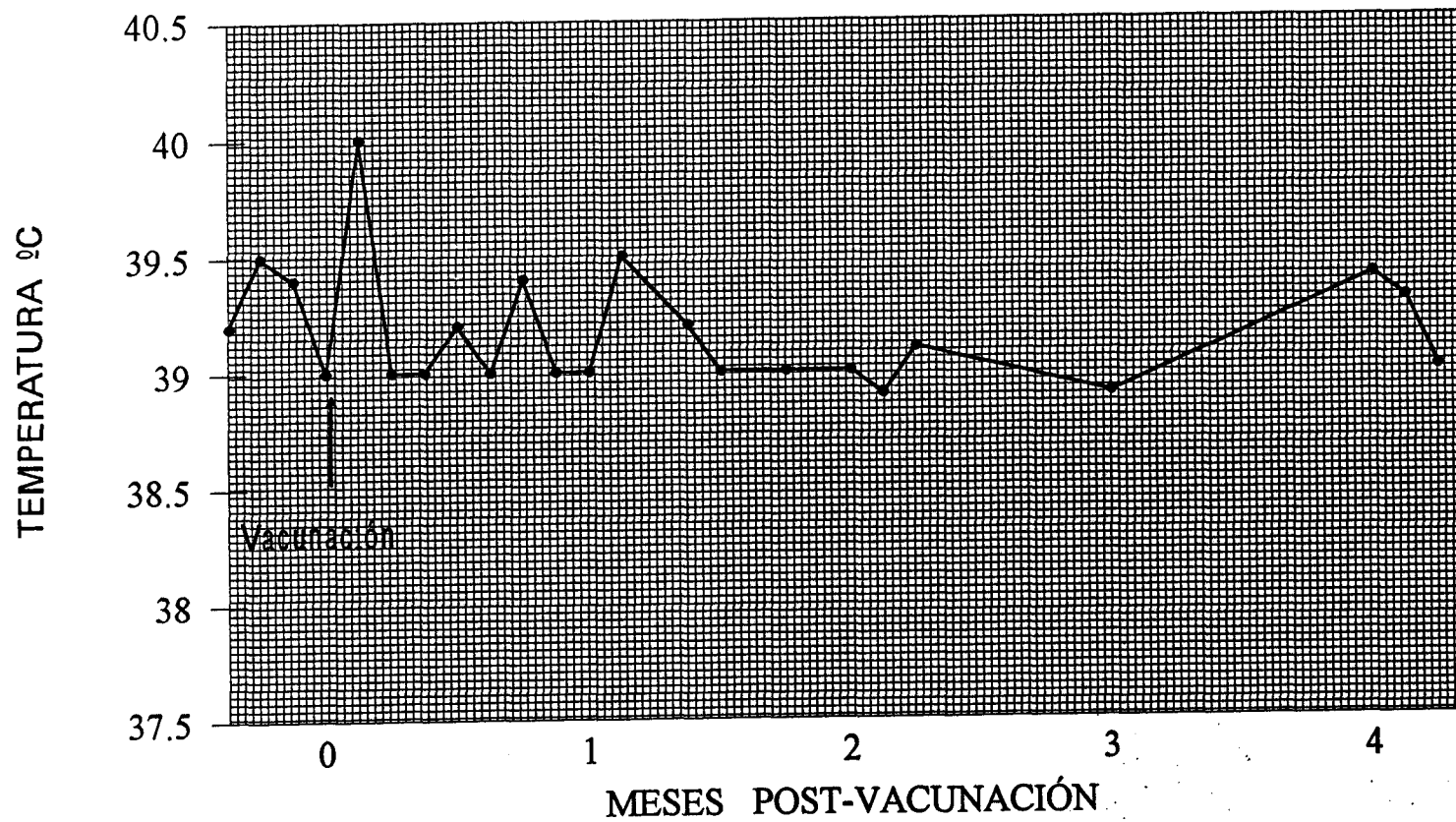


Figura n° 26: Temperaturas rectales registradas en la res tras la inoculación de los linfoblastos infectados con esquizontes de 35 pases en cultivo.

SEGUIMIENTO DE LA RES N° 51

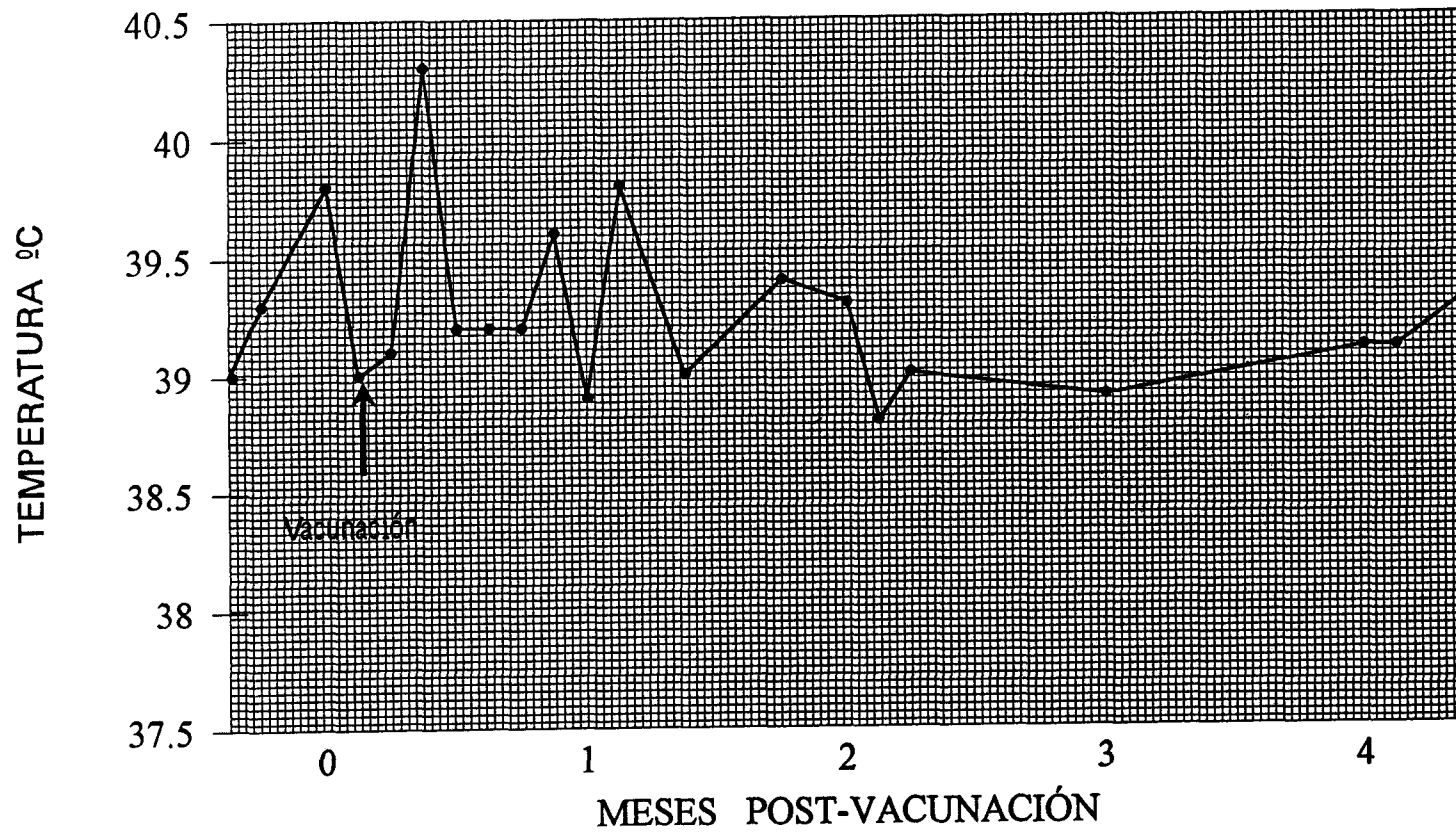


Figura n° 27: Temperaturas rectales registradas en la res tras la inoculación de los linfoblastos infectados con esquizontes de 35 pases en cultivo.

SEGUIMIENTO DE LA RES N° 50

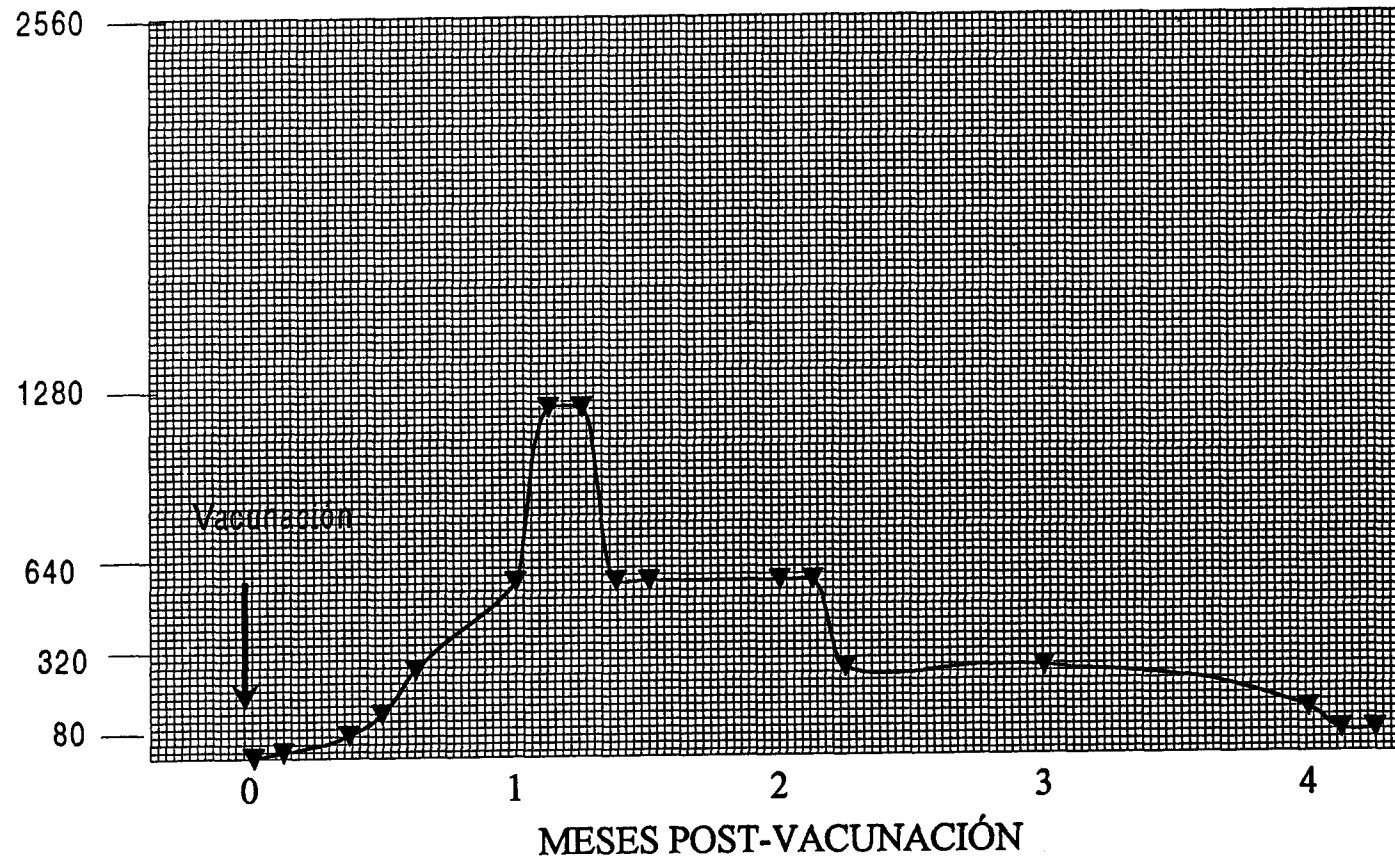


Figura n° 28: Evolucion del titulo de anticuerpos en la res tras la inoculación de linfoblastos infectados con esquizontes.

SEGUIMIENTO DE LA RES N° 51

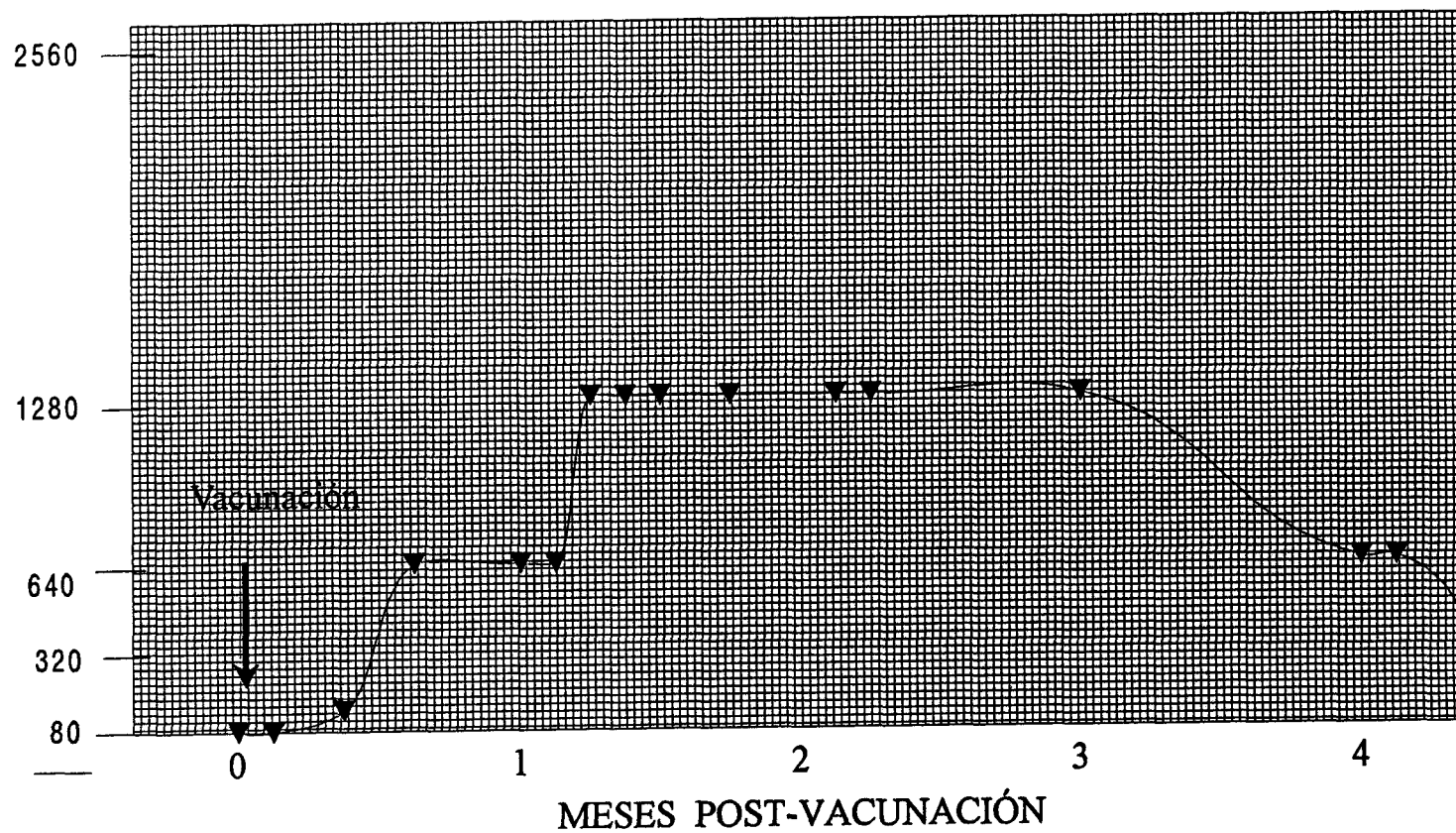


Figura n° 29: Evolucion del titulo de anticuerpos en la res tras la inoculación de linfoblastos infectados con esquizontes.

SEGUIMIENTO DE LA RES N° 50

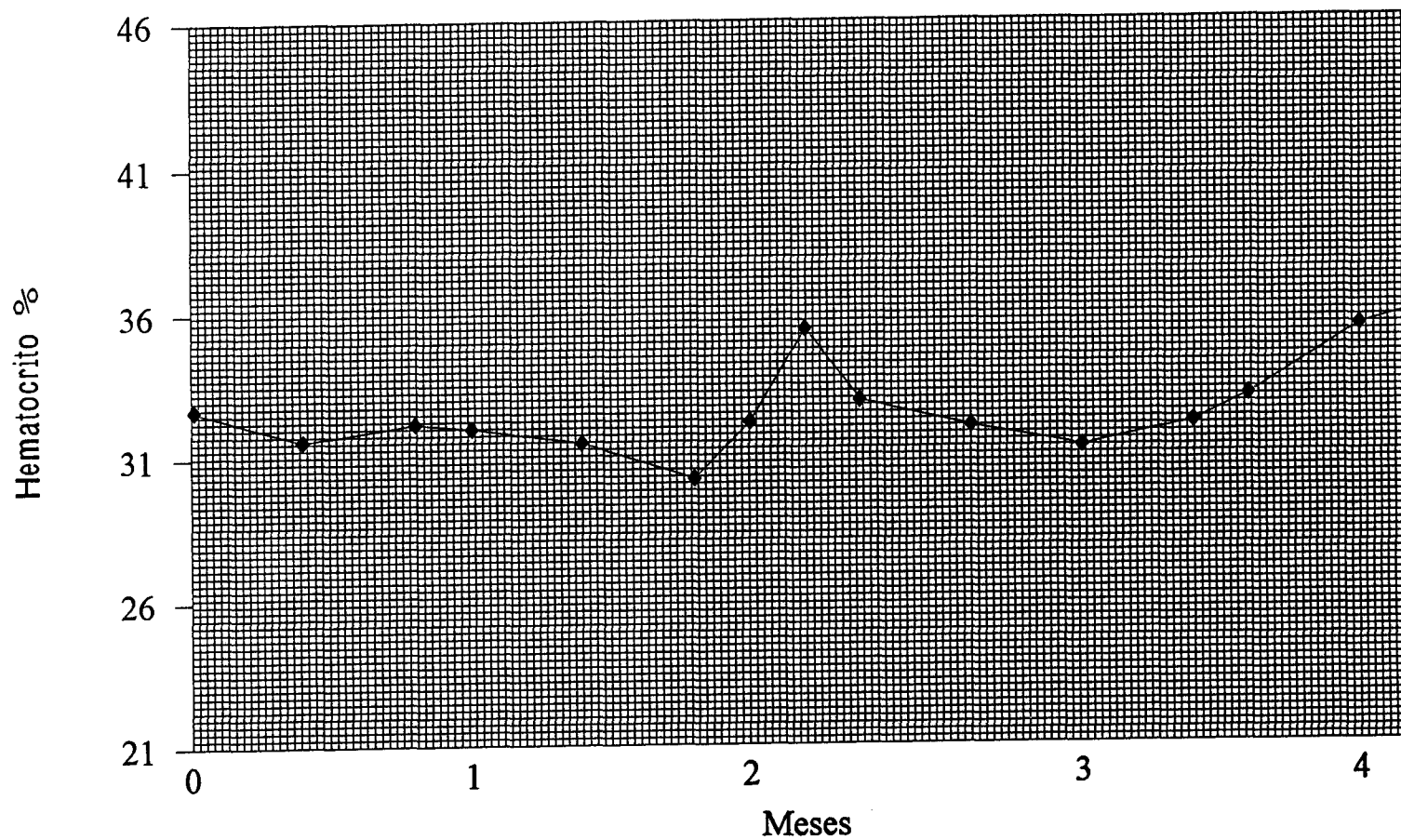


Figura n°30: Hematocrito observado en la res tras la inoculación de los linfoblastos infectados

SEGUIMIENTO DE LA RES N° 51

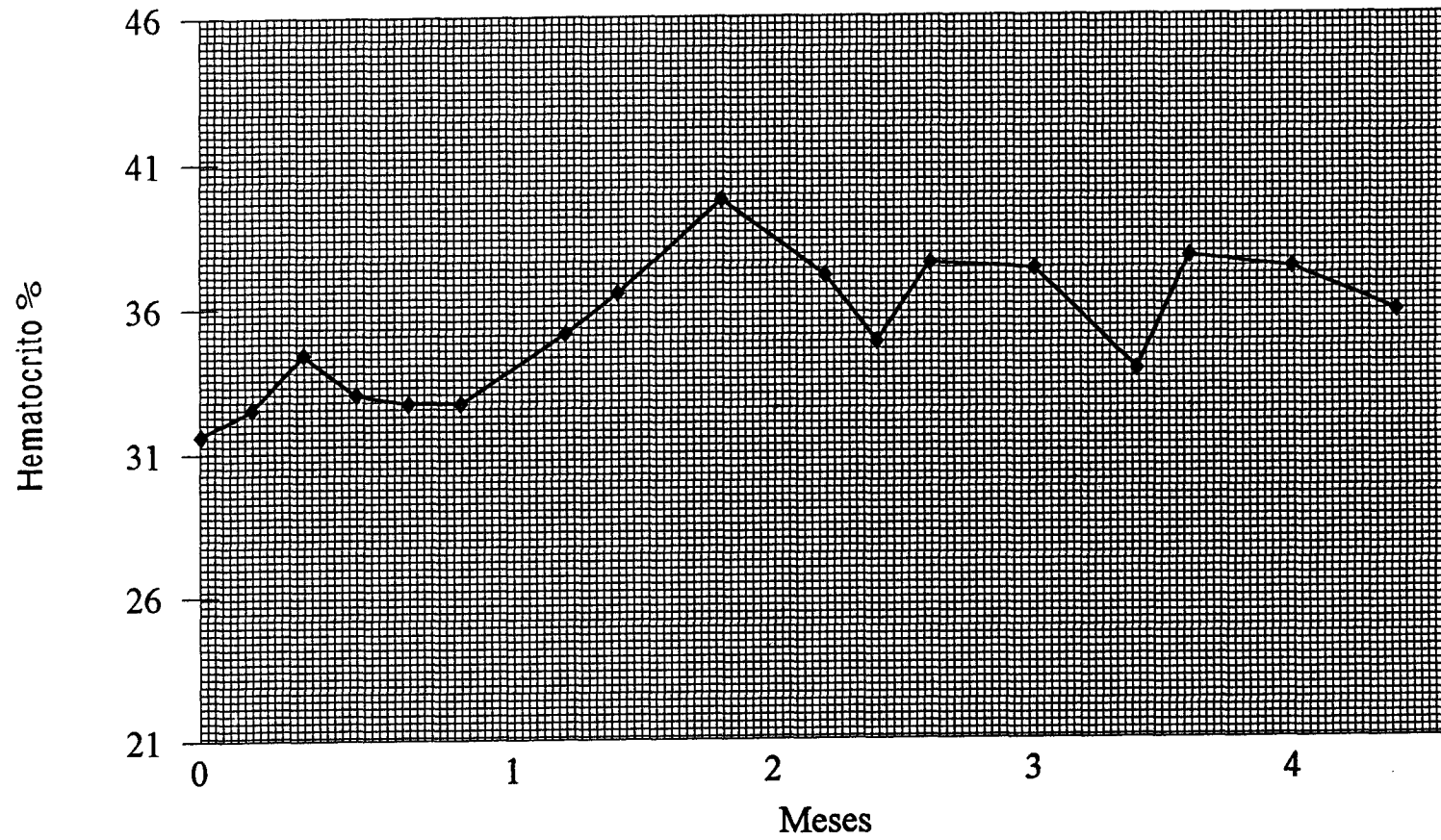


Figura n°31: Hematocrito observado en la res tras la inoculación de los linfoblastos infectados

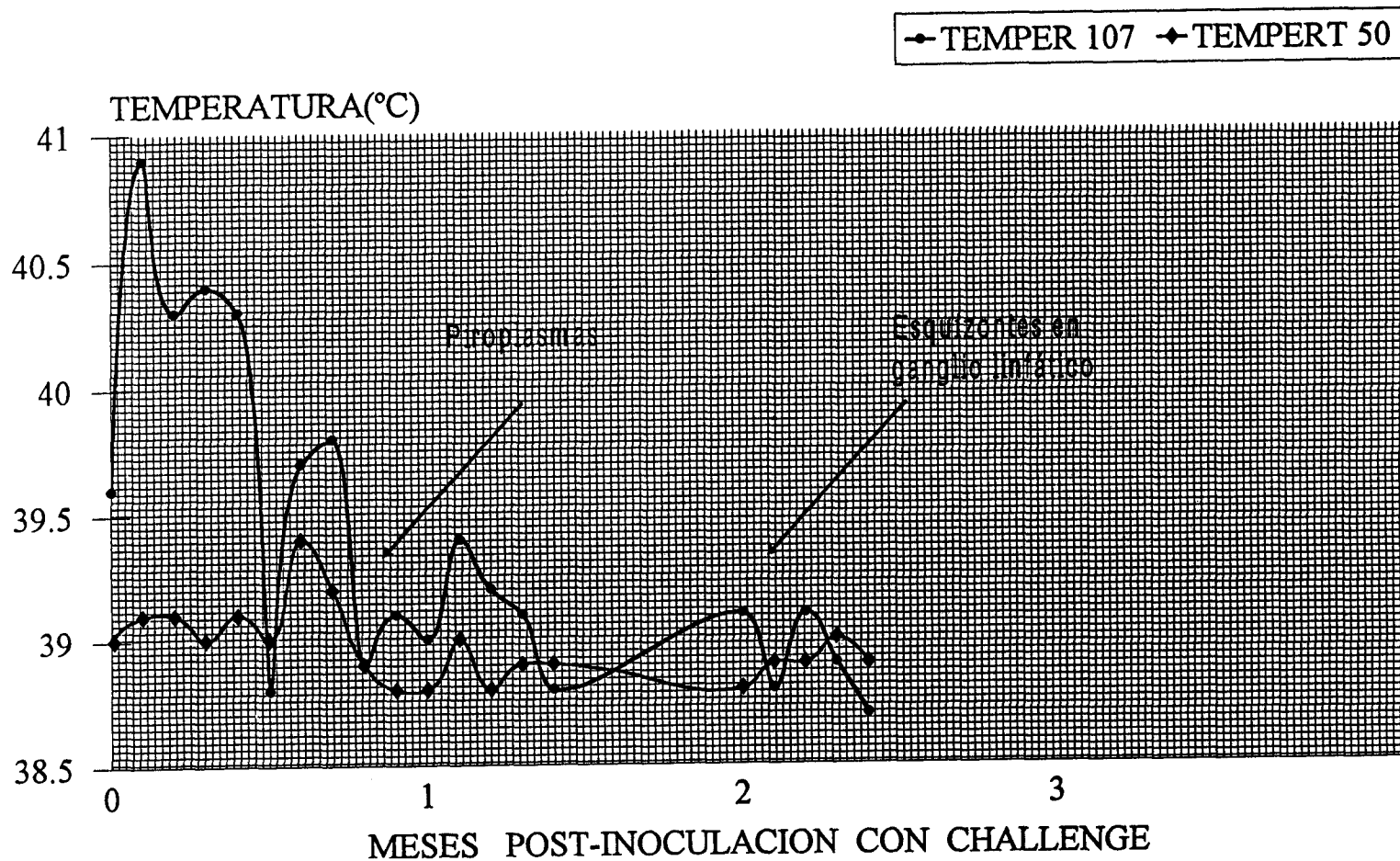


Figura n° 32: Respuesta termica observada en las dos reses inoculadas con el challenge de esquizontes virulentos, localizando los momentos en los que fueron encontrados los parasitos en la res n° 107, mientras que hubo ausencia de aquellos en la res n° 50.

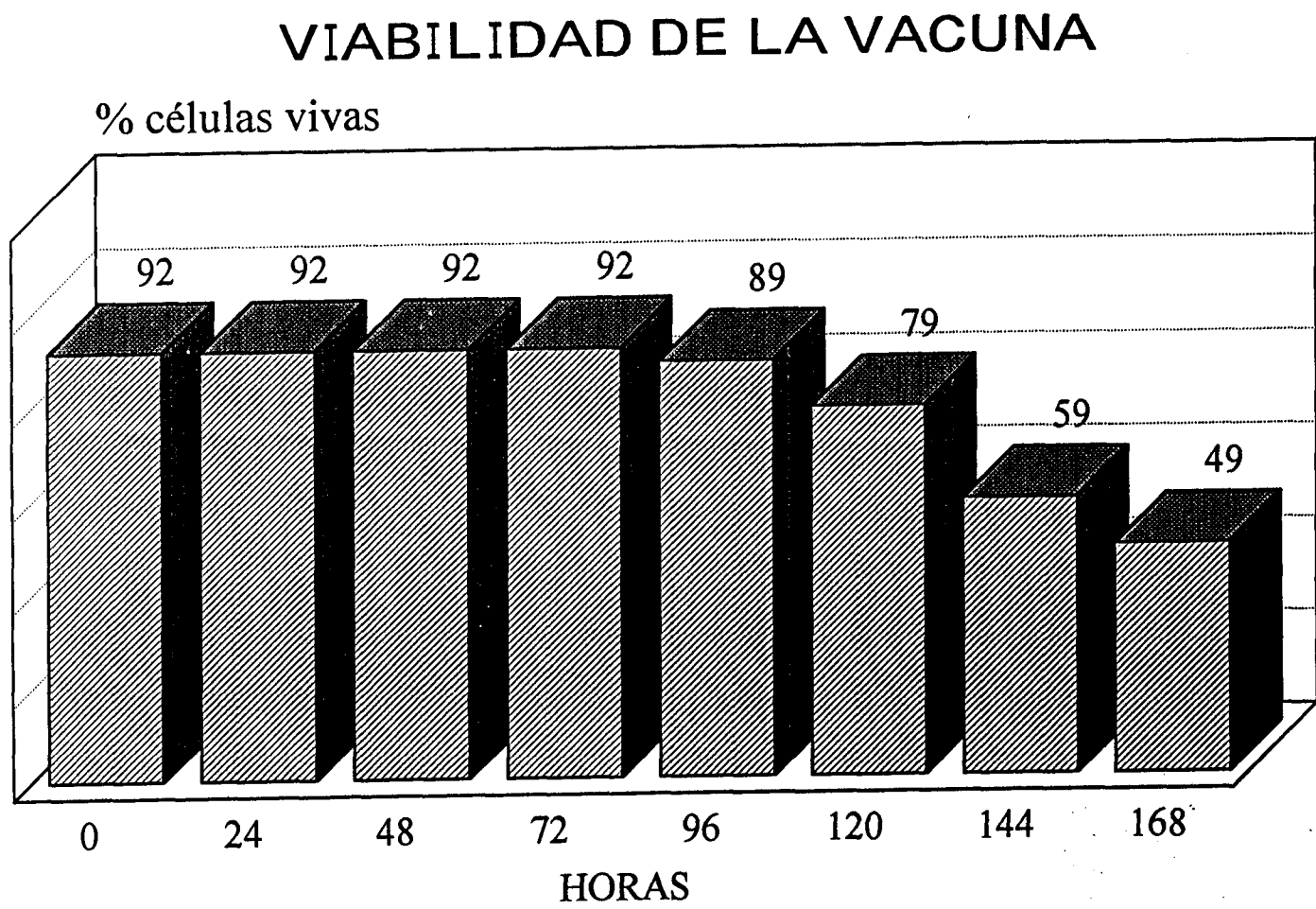


Figura n° 33: porcentaje de células vivas desde el momento de la preparación de la vacuna en estado líquido y conservada a 4 °C

ENSAYO DE VACUNACION DE CAMPO

Evolución título de anticuerpos

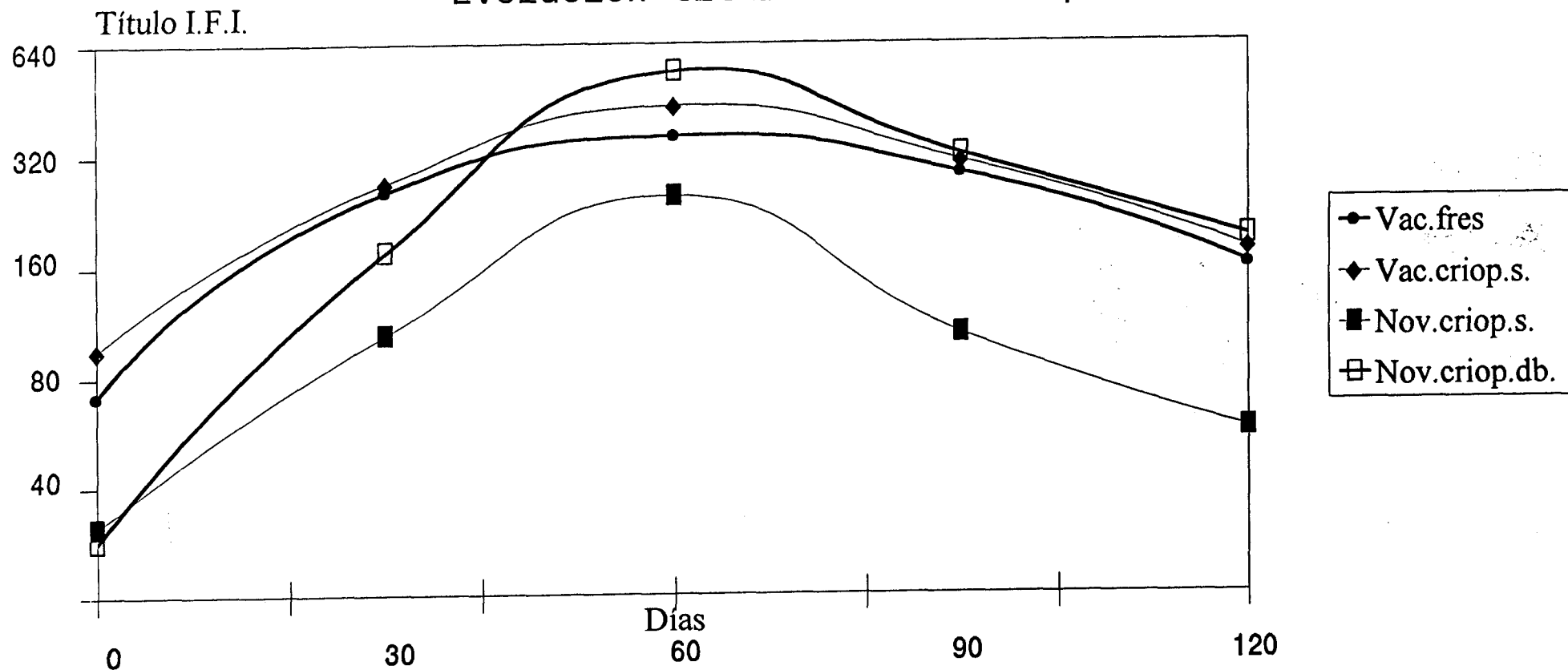


Figura nº 34: Vacas inmunizadas con vacuna fresca (vac.fres), vacas inmunizadas con vacuna criopreservada (vac.criop.s), novillas inmunizadas con vacuna criopreservada (nov.criop.s) novillas inmunizadas con vacuna a doble dosis criopreservada (nov.criop.db)

ENSAYO DE VACUNACION DE CAMPO

Evolución título de anticuerpos

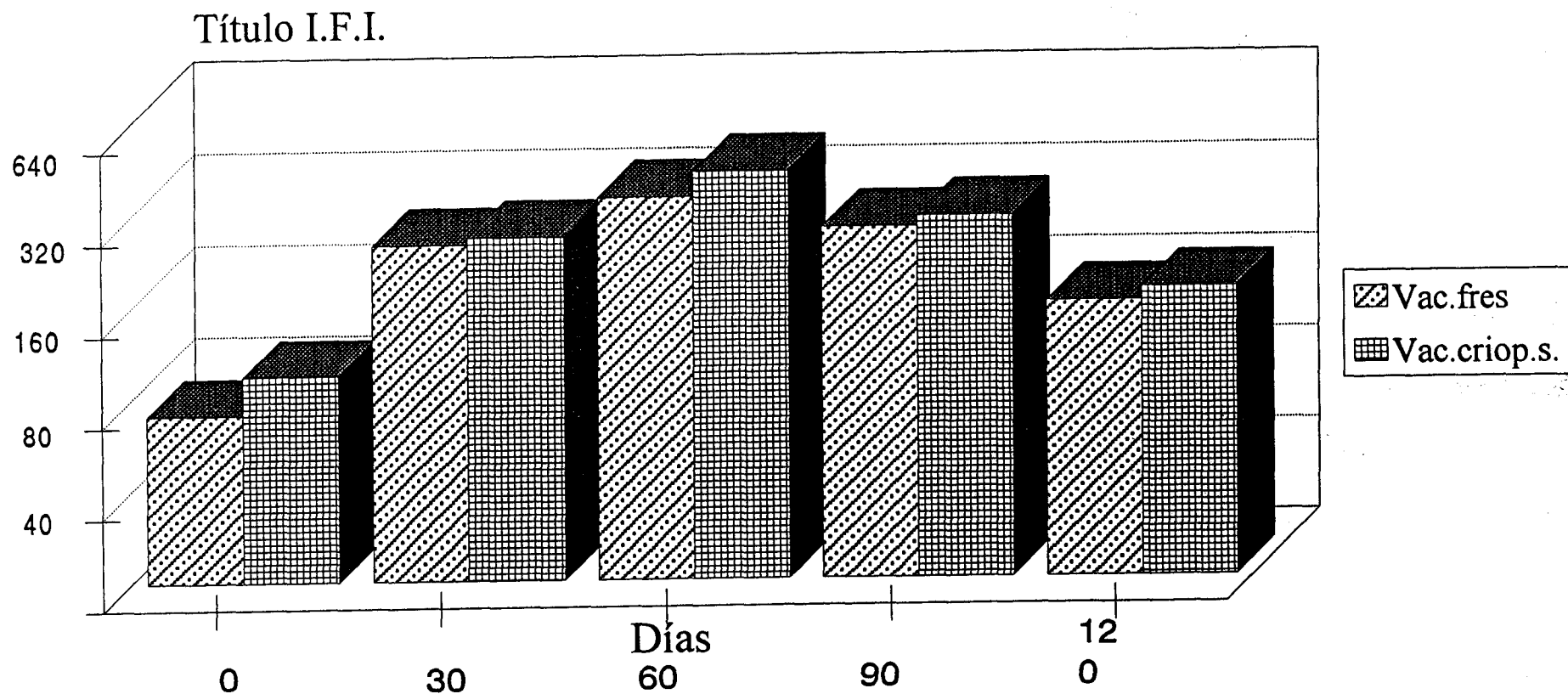


Figura nº 35: Vacas inmunizadas con vacuna fresca y vacas inmunizadas con vacunacriopreservada.

ENSAYO DE VACUNACION DE CAMPO

Evolución título de anticuerpos

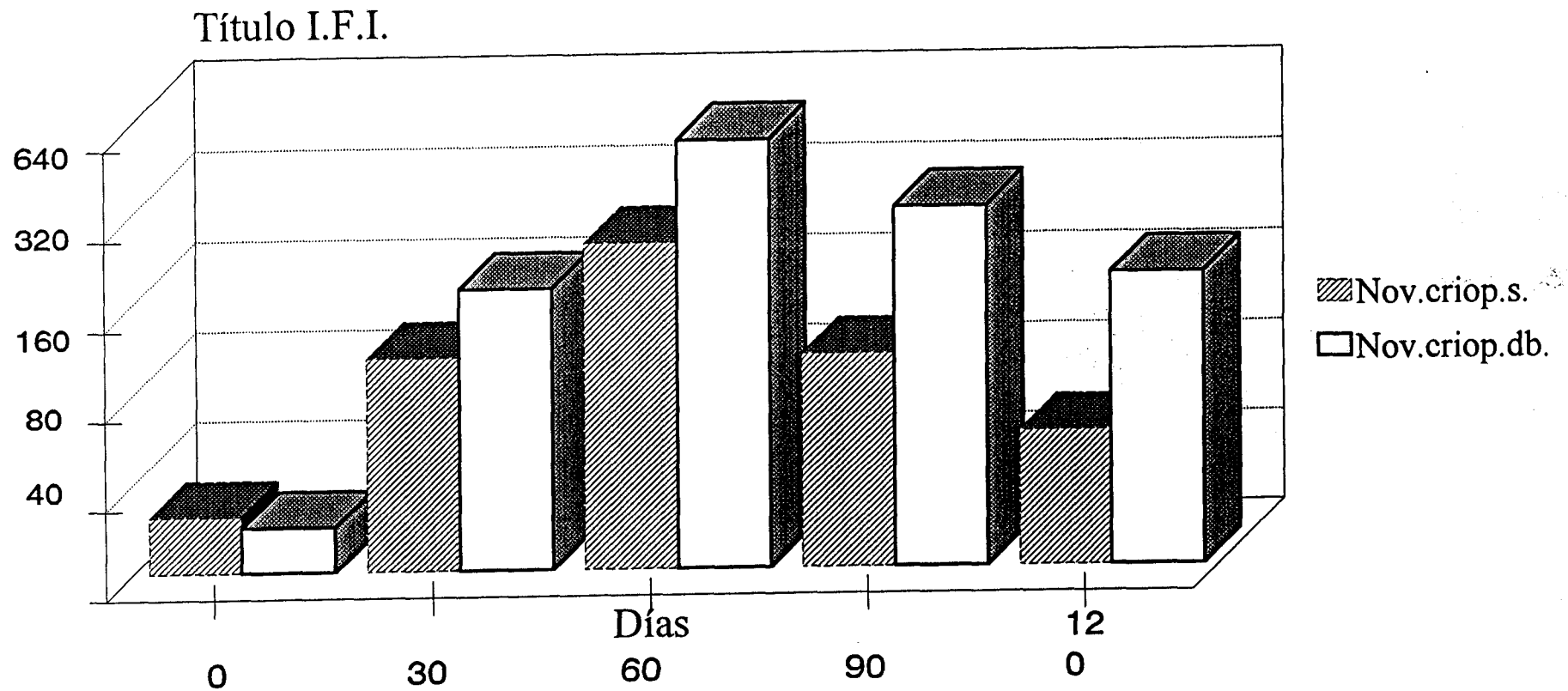


Figura nº 36: Novillas inmunizadas con vacuna criopreservada a dosis simple y doble.

ENSAYO DE VACUNACION DE CAMPO

Evolución título de anticuerpos

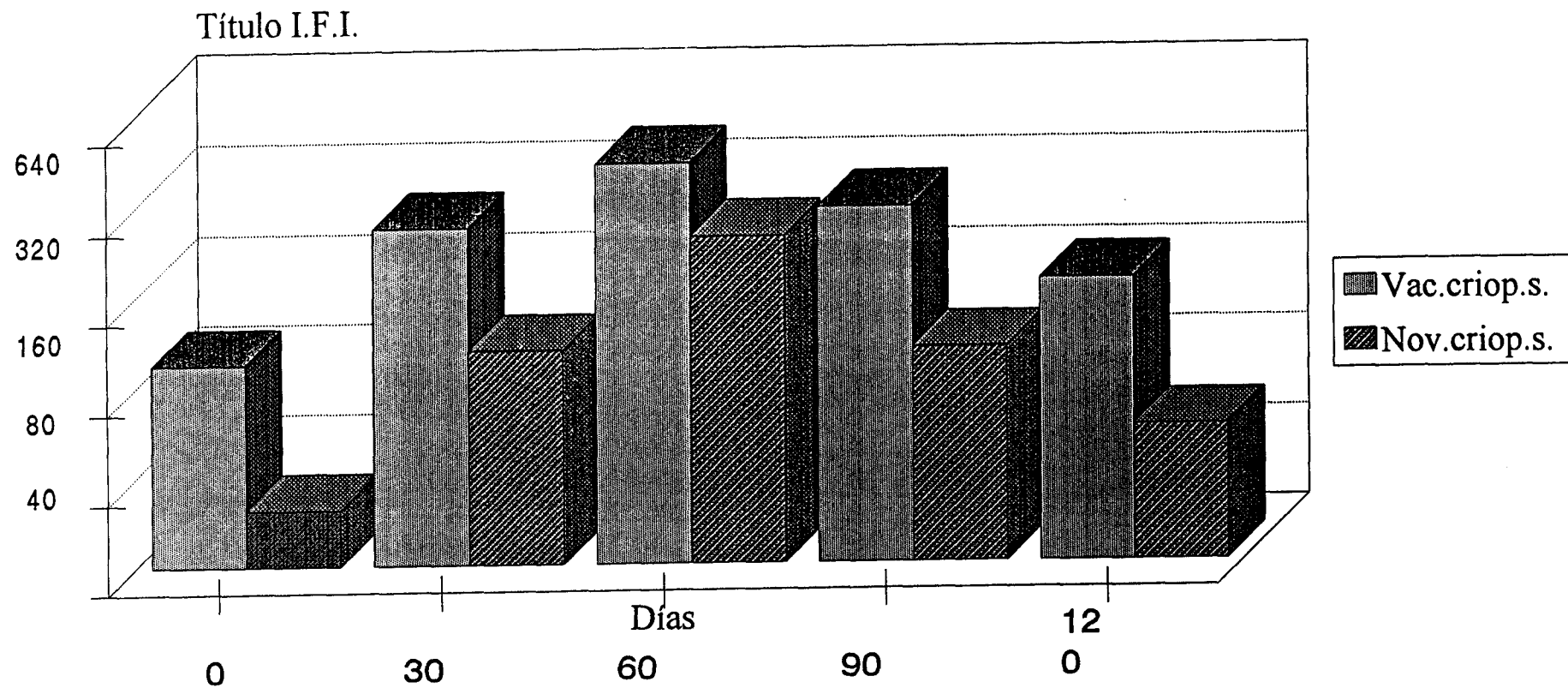


Figura nº 37: Vacas y novillas inmunizadas con vacuna criopreservada a dosis simple.

DISCUSSION

1. EPIDEMIOLOGIA

Los datos obtenidos de la encuesta epidemiológica realizada a las Inspecciones Comarcales Veterinarias (ICV) ponen de manifiesto la gran importancia que tienen las piroplasmosis en las provincias de Cádiz, Huelva y Sevilla. Es un hecho que de dichas provincias se recibieron el mayor número de respuestas y todas ellas positivas, si bien la distribución geográfica de municipios en los que se dan casos es más diseminada en Cádiz y Huelva, como puede observarse en el mapa nº 2, mientras que en Sevilla siempre se encuentran los casos en municipios localizados en zonas del Valle del Guadalquivir, próximas al río.

En la provincia de Málaga, al igual que en la de Sevilla, se observa que la localización de los municipios con casos positivos está determinada nuevamente por la presencia de ríos. Se considera que ello es debido probablemente a que en estas zonas se crean las condiciones idóneas de humedad que posibilitan la proliferación de las garrapatas vectoras del parasitismo como y habían indicado García Fernández y Hueli (1984). Así mismo, se observa que los casos de piroplasmosis se dan en los meses en que la actividad de las garrapatas es máxima, de la misma forma que describen en su trabajo Ohuelli y col.(1989).

De los resultados de la encuesta y apoyándola con los trabajos de García Fernández (1978) se deduce que estas enfermedades se presentan de manera enzoótica en Cádiz, Sevilla, Huelva y Málaga; epizoótica en Córdoba; y prácticamente ausente en Granada, Jaén y Almería, sobre todo en ésta última, por la poca importancia que tiene el sector ganadero en la provincia.

El ganado que se ve más afectado es el de raza frisona y sus cruces, siendo ésto una constante en todas las zonas endémicas a la theileriosis. Efectivamente, suele tratarse de ganado importado, desde zonas no endémicas a la enfermedad, con objeto de mejorar la producción lechera en las granjas de zonas endémicas. Sin embargo, en ocasiones, esta práctica ha dado lugar al efecto contrario, originándose grandes pérdidas económicas en el sector, por no haber vacunado al ganado importado con cepas autóctonas del parásito.

Como ya se vió en el apartado de resultados, todas las garrapatas recogidas sobre los animales muestreados en zona endémica resultaron ser *H. lusitanicum*, lo que nos hace sospechar que se trata del vector de la theileriosis mediterránea en Andalucía por dos razones fundamentalmente:

- En todas las regiones del mundo donde existe *T. annulata* siempre ha sido incriminada como vector una especie del género *Hyalomma* (Irvin, 1987).

- En el mismo ganado sobre el que se recogieron las garrapatas se encontró una alta seroprevalencia frente a *T. annulata*.

En el análisis de la seroprevalencia (Figuras 1 y 2) en este ganado es de destacar que, si bien el porcentaje total de seropositividad es bastante alto (66,3 %), cuando el estudio se hace distribuyendo a las reses por edades, vemos que no todos los grupos así establecidos contribuyen de igual forma a ese porcentaje. De hecho, en el grupo de las becerras (menos de un año) sólo un 40% son seropositivas, en el grupo de las novillas (aproximadamente 2 años) las positivas se acercan al 50 %, y en animales entre 3 y 4 años se alcanzan valores de seropositividad muy próximos al 80 %. El hecho de que el porcentaje de seropositividad vaya creciendo con la edad del

grupo considerado, se podría explicar por el aumento del tiempo de exposición de los sujetos susceptibles a la posibilidad de que se fijen sobre ellos garrapatas infectadas con *T. annulata*.

Además, si se hace un estudio más pormenorizado de los títulos alcanzados por las reses en cada uno de los grupos de edad se encuentran diferencias aún mayores (Figuras 3, 4 y 5)

Dentro del 40% de seropositividad detectada en el grupo de becerras, en la figura 5 se puede observar que la totalidad de los animales seropositivos presentan títulos entre 40 y 160.

En el grupo de novillas, la seropositividad se concentra nuevamente en los títulos 40, 80 y 160, (figura 4), sin embargo en este grupo ya existen individuos que han podido tener mayor contacto con el parásito, alcanzándose títulos de 2560 y 5120, en algunos casos. Recordaremos que en este grupo de animales tienen ya alrededor de 2 años y por lo tanto han tenido la oportunidad de enfermar por haber permanecido en el campo durante la época del año en que son habituales los casos de la enfermedad (desde Junio a Octubre aproximadamente (Pipano, 1988)).

En el grupo de las vacas en producción lechera (figura 3) se observa que dentro de las seropositivas, es difícil encontrar animales con títulos por debajo de 160, mostrando la mayoría de las reses de este grupo títulos entre 160 y 2560, llegándose a alcanzar en algún caso hasta 10.240.

Todo esto no parece ser más que el resultado de haber permanecido en una zona endémica para la theileriosis tropical durante varias temporadas, por lo que muchas de ellas habrán sufrido la enfermedad y por lo tanto habrán quedado, probablemente, inmunizadas frente a ésta.

2. AISLAMIENTO DEL PARASITO

La infección experimental de la res nº99, se ha desarrollado de una forma muy lenta no presentando un periodo de incubación típico de la theileriosis tropical. Sin embargo, Jarret y col. (1969) indican que el periodo prepatente de un animal infectado con *Theileria*, depende en gran medida de la dosis infectiva, y no debemos olvidar la bajísima parasitación encontrada en la res nº 27E, que fue sobre la cual se estaban alimentando los ixódidos vectores en el momento de su recogida. Además, se debe tener en cuenta que la pérdida de carga parasitaria documentada por Irvin y col. (1981), que se produce desde el animal en que se alimentan los ixódidos vectores y la parasitemia que son capaces de ocasionar en el siguiente hospedador vertebrado.

En cualquier caso, Kamío y col. (1989) consideran que la cantidad de eritrocitos parasitados ingeridos por la garrapata durante su alimentación es determinante para el establecimiento de la infección.

Por estas razones, se puede explicar porqué se ha conseguido una infección que no ha producido ningún acceso clínico aunque sí se ha conseguido la transmisión del parásito.

Por un lado, las garrapatas que se emplearon estaban parcialmente alimentadas y, por tanto, hay que tener en cuenta que la mayoría de los ejemplares que se fijaron y alimentaron sobre el animal susceptible eran machos. Algunos autores han concluido que los machos tienen una capacidad menor que las hembras a la hora de transmitir la theileriosis, como indican Sangwan y col. (1989) en un estudio epidemiológico acerca de la transmisión de *Theileria* con adultos de *H. anatolicum*, en el que, sugieren que las garrapatas hembras tienen un papel más importante que los machos en la transmisión de *Theileria*.

Durante todo el proceso de evolución de la enfermedad en este ternero, no se produjo inflamación de ganglios linfáticos superficiales y no se detectaron esquizontes en biopsia de ganglios debido probablemente a su desarrollo atípico. Por lo tanto, no intentamos el aislamiento a partir de ganglios. Al encontrar formas intraeritrocíticas del parásito, y a pesar de no ser detectada la presencia de esquizontes, se intentó el aislamiento de células linfoblastoides infectadas con esquizontes, partiendo de un gran volumen de sangre, por el método de Ficoll-Paque^R (Boyum, 1968), aunque con resultados negativos.

Con objeto de intentar aislar *in vitro* el parásito, visto que el método anterior había fracasado en 2 intentos realizados, se decidió pasar la infección a una nueva res de experimentación (res nº111) por inoculación de un volumen grande de sangre (50 ml) que presentaba un índice de parasitación del 12 %.

En 15 días aparecieron formas intraeritrocíticas del parásito (figura 20), si bien no se produjeron aumentos destacables en la temperatura (Figura 22), aunque hubo una inflamación de ganglios linfáticos superficiales. Este hecho permitió realizar el aislamiento de células linfoides infectadas con esquizontes a partir de biopsia de ganglios, estableciéndose en cultivo como una línea celular, que se denomina con el número de referencia de la res de origen, línea 111.

El ternero 97 presentó, así mismo, un comportamiento atípico ya que desarrolló una infección que se puso de manifiesto tardíamente. En infecciones por inoculación de sangre, en un amplio trabajo realizado por el equipo de Sergent (Sergent y col. 1945) encontraron que el periodo medio de incubación era de 17 días aunque se llegaron a dar casos de

periodos de incubación anormalmente largos, en algunas ocasiones hasta de 10 meses.

En este ternero también se intentó el aislamiento, por 2 veces, de células linfoblastoides infectadas, por el método de Ficoll-Paque^R (Boyum, 1968), a partir de un volumen grande de sangre, nuevamente con resultados negativos. Por esta razón, cuando hacía un año que había sido inoculado, viendo que presentaba en sangre un I.P. del 14%, se decidió extraerle 50 ml de sangre que fueron inoculados inmediatamente por vía intravenosa a una nueva res de experimentación (res nº 104) con objeto de mantener el aislamiento *in vivo* y a su vez intentar provocar en este nuevo animal un acceso de la enfermedad que nos permitiera aislar el parásito *in vitro*. Nuevamente, como en el caso de la res 111, no se produjeron picos de temperatura que nos indicaran gravedad, pero aparecieron los primeros parásitos en sangre a los 15 días, periodo de incubación igual que en la res 111, ambas inoculadas con sangre. Dicho periodo coincide con lo descrito por Sergent y col. (1945), en cuyo trabajo establecen como media 17 días.

La infección transcurrió sin alcanzarse una alta parasitación. Cuando el ternero se encontraba en una fase crónica, sin evolucionar a mayores índices de parasitación, se le extrajeron 250 ml de sangre para ser criopreservada y poder disponer de ella en el futuro sin tener que prolongar el mantenimiento del animal indefinidamente. Aunque la enfermedad no cursó con un aparente acceso agudo, se observó inflamación de ganglios linfáticos. A partir de biopsia de ganglios, fue posible aislar y cultivar *in vitro* linfoblastos infectados con esquizontes.

El aislamiento *in vitro* se realizó, en el caso del ternero nº 111, transcurrido un mes desde la inoculación, coincidiendo

con un incremento en el I.P. que empezó a manifestarse desde ese momento. Este incremento destacable en el I.P. no se produjo en el ternero 104 al mismo tiempo que la inflamación de ganglios, siendo este último síntoma el que nos indujo a intentar el aislamiento que, si bien aportó un número mucho menor de células, terminó siendo un éxito como el anterior.

Por este mismo método se han intentado tres aislamientos más, de los que se ha conseguido éxito en un caso, si bien se perdió el cultivo por contaminación posterior. También se intentó aislar a partir de biopsia de ganglio de uno de estos animales sin éxito. Una vez que se tenía la línea celular 28E establecida y mantenida en cultivo, se tomaron células con un bajo número de pases (15 pases) siendo inoculadas intramuscularmente a un ternero susceptible (res nº 107), provocando una reacción que se podría considerar "moderada" según la clasificación de posibles respuestas ante un "challenge" establecida por Irvin y col. (1983).

Cuando el animal presentó inflamación de ganglios linfáticos superficiales, se practicó una biopsia de la que se consiguió aislar linfoblastos infectados y establecer la línea celular que denominamos 107, que coincide en la cepa del parásito con la línea celular 28E puesto que ésta fue la empleada para la infección.

En los aislamientos conseguidos, aunque se trata de un número bajo, es de destacar que por el método de Ficoll-Paque, el éxito relativo al número de intentos ha sido del 50% y por el método de biopsias del 75%, partiendo siempre de casos clínicos. Dichos porcentajes de éxito relativo son muy aproximados a los obtenidos por Pipano y col. (1989b), trabajo en el que se destaca como método de aislamiento de líneas celulares con más éxito el que parte de biopsias.

3. PRUEBA DE DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (I.F.I.)

Mediante la microscopía podemos evidenciar la presencia de los parásitos en sangre y en algunos órganos, pero cuando se trata de infecciones superadas mucho tiempo atrás, a veces se hace difícil detectar los parásitos en sangre y, sin embargo, sigue siendo posible detectar fácilmente la presencia de anticuerpos específicos en el suero, que nos indican un contacto seguro del animal con el agente etiológico de la theileriosis mediterránea.

Un método de diagnóstico excelente para conseguir este propósito y que ha sido el más ampliamente aplicado (Irvin y Morrison, 1987) es la inmunofluorescencia indirecta (I.F.I.). Además, el método de I.F.I es adecuado para la confirmación de la especie de *Theileria* que existe en una zona endémica a la theileriosis, incluso en el caso en que haya varias especies coexistiendo (Chema y Brocklesby, 1981). Por ello, nos propusimos la puesta a punto y utilización de esta técnica.

En la prueba de I.F.I. es fundamental disponer de un antígeno muy específico, ya que cuando se analizan sueros de una zona donde son enzoóticas varias enfermedades transmitidas por garrapatas, como babesiosis, theileriosis y anaplasmosis, a diluciones bajas existe la posibilidad de reacciones cruzadas entre los antisueros de estos parásitos y antígenos de los mismos, si éstos no son adecuados. En este caso es muy importante determinar el título umbral a partir del cual la reacción se considera positiva específica para cada uno de estos antígenos, si bien puede variar con el lote preparado. En estas enfermedades puede estar comprendido entre 40 y 160 (FAO, 1988).

Como antígeno, en el caso de la theileriosis, se pueden emplear los merozoítos, que es la fase del parásito que se encuentra en el eritrocito, aunque también puede prepararse el antígeno a partir de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *Theileria*.

El antígeno preparado a partir de las formas intraeritrocíticas requiere disponer de animales con infecciones puras para tener una buena especificidad, lo que suele ser difícil de conseguir en zonas donde las enfermedades transmitidas por garrapatas son endémicas, siendo muy frecuentes las infecciones mixtas por *Anaplasma*, *Babesia* y *Theileria*. Esto hace aconsejable infectar experimentalmente un bovino utilizando el vector específico de cada enfermedad y así estar seguros de la pureza de la infección.

La sangre será adecuada para preparar antígeno cuando, al menos, estén parasitados del 10 al 15% de los eritrocitos.

Hay que señalar que cuando se recoge la sangre, el animal no debe estar en período de recuperación porque en este caso se unen anticuerpos del animal a los piroplasmas y al ser éstos utilizados como antígeno en una reacción de I.F.I. pueden dar lugar a reacciones falsas positivas (FAO, 1988).

En este caso, se requeriría un control más para la detección de anticuerpos ligados a los antígenos en cada lote que se prepare.

Los esporozoítos pueden ser usados como antígeno, pero tienen el problema de su limitada disponibilidad, labilidad y dificultad para obtener preparaciones puras (Cowan, 1981), además, se ha comprobado que con este tipo de antígeno, tanto en el método de ELISA como en I.F.I, se pueden obtener resultados falsos positivos (Kachani y col., 1992).

En el método de I.F.I, los anticuerpos antiesquizonte son detectados más pronto en la infección que los anticuerpos antipiroplasma y aquellos pueden ser identificados durante un período de tiempo más largo después de la recuperación, lo que hace que se recomiende el uso de antígeno de esquizontes sobre todo cuando se usa el método de I.F.I en estudios epidemiológicos (Kachani y col., 1992).

Por todas las razones anteriormente expuestas, se deduce que, disponiendo del equipo necesario y del personal cualificado en las técnicas de cultivo *in vitro*, es preferible, bajo nuestro punto de vista, la utilización de antígeno preparado a partir de linfoblastos parasitados por esquizontes de *T. annulata*, si bien esto no está totalmente exento de problemas. Por ejemplo, en el caso de zonas donde coexisten *T. annulata* y *T. parva*, un antígeno de un parásito puede reaccionar uniéndose a anticuerpos frente al otro, si bien los títulos alcanzados no son los mismos. Tenemos a nuestro favor, que un antígeno de *T. parva* se une bastante bien con un antisuero de *T. annulata*, pero al contrario, un antisuero de *T. parva* se une al antígeno de *T. annulata* con una especificidad de 4 a 6 veces menor que el suero específico anti *T. parva*; además, el suero anti *T. parva* se une aún menos al antígeno de esquizontes de *T. annulata* (FAO, 1988), algo que dice mucho en favor de la especificidad de este antígeno.

En otros países se han desarrollado técnicas inmunológicas para el diagnóstico de estas parasitosis (Lörh y Röss, 1969 y Burrige y Kimber, 1972), empleando la técnica de I.F.I. para el diagnóstico de la theileriosis bovina producida por *T. parva*. Para la detección de *T. annulata* se ha empleado igualmente la técnica I.F.I. (Pipano y Cahana, 1969).

Para la obtención de suero control positivo frente a *T. annulata*, se puede infectar una res con "estabilizado" de garrapatas o con sangre infectada entre otros métodos. En nuestro caso, uno de los objetivos planteados, era tratar de obtener los reactivos biológicos necesarios para la prueba de I.F.I. empleando cepas del parásito procedentes de nuestras zonas endémicas.

Una vez conseguida una línea celular infectada con parásitos de una zona endémica, era necesario un suero control positivo frente a estos mismos parásitos. Basándonos en el trabajo de Goddeeris y col. (1982), en el que el suero control positivo frente a *T. annulata* se obtiene de un animal inoculado con una línea celular linfoblastoide infectada, pensamos que lo mejor sería inocular a un ternero con la línea 28E, que es la misma con la que se prepara el antígeno. Considerando que el hospedador produce anticuerpos antilinfocito cuando es inyectado con una vacuna a base de esquizontes en cultivo (Kachani y col., 1992) y sabiendo que la primera estimulación del sistema inmune es por la infección de los antígenos específicos asociados a los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad de la línea celular donadora (Innes, 1989), el suero control positivo que obtenemos al inocular las mismas células que empleamos como antígeno, podría tener cierta carga de anticuerpos que no fueran específicos frente al parásito, sino frente a la célula que lo contiene.

Para evitar este problema, ideamos inocular a un ternero con linfoblastos de la línea 28E parasitados con esquizontes virulentos, de forma que fuesen capaces de provocar un acceso de la enfermedad en el animal inoculado. Consiguiendo aislar linfoblastos infectados de este nuevo animal, disponemos de una nueva línea celular en la que el parásito pertenece a la misma cepa que empleamos como antígeno. Inoculando esta nueva línea

celular a un nuevo ternero obtendremos un suero control positivo que con el antígeno empleado en la prueba gana en especificidad frente al esquizonte que es lo que realmente constituye el antígeno.

4. ELECTROFORESIS

Ya en los años sesenta, Barnett (1963) indicó que el hecho de que diferentes estirpes de *T. annulata* tengan diversos fenotipos antigénicos, es una probable razón del por qué animales inmunizados con una cepa particular del parásito no están completamente protegidos frente a un "challenge" heterólogo.

Para Young (1981), resulta imprescindible identificar la especie de *Theileria* que se encuentra infectando a nuestro ganado. La identificación por criterios morfológicos no es lo suficientemente precisa destacándose el serodiagnóstico como un método muy útil a la hora de identificar las especies de *Theileria*. Sin embargo, para la diferenciación de cepas se han desarrollado métodos de diagnóstico más sofisticados, que emplean anticuerpos monoclonales específicos, o bien determinación de isoenzimas.

Se ha empleado la electroforesis en gel de almidón para investigar las diferencias en relación con el polimorfismo de la GPI para 2 stocks de áreas endémicas a la theileriosis mediterránea diferentes y separadas geográficamente, basándose en el criterio de Melrose y col. (1980, 1984).

Además se ha realizado la electroforesis de para otras isoenzimas como la ME, PGM y MDH. Estas experiencias confirman por comparación de nuestro aislado con una estirpe de

T. annulata de Israel, que efectivamente se trata de *T. annulata*, ya que presentan el mismo patrón.

El interés fundamental de esta comparación radica en que en países como Israel ya han desarrollado vacunas, partiendo de aislados de sus zonas, que han resultado muy efectivas en la lucha contra la theileriosis tropical. En este sentido, nosotros consideramos que si tenemos un stock con características diferentes al de otras zonas debíamos desarrollar una vacuna partiendo de nuestros propios aislados, ya que se ha demostrado que no hay protección cruzada entre cepas diferentes del parásito.

De la observación del patrón isoenzimático mostrado, puede deducirse que la cepa aislada por nosotros presenta diferencias con la cepa israelí. Además se ha comprobado si existían diferencias en el patrón isoenzimático de otras enzimas para confirmar lo descrito por Melrose y col. (1980, 1981, 1984) y Van der Meer y col. (1981), en el sentido de que la isoenzima que tiene valor taxonómico en el caso de *T. annulata* es la GPI.

De acuerdo con lo indicado por Melrose (1984), hemos comprobado que la electroforesis en gel de almidón se puede emplear para investigar el polimorfismo de las isoenzimas asociadas al parásito en el caso de *T. annulata*.

Se han empleado líneas celulares linfoblastoides infectadas con el parásito porque las técnicas descritas hasta ahora para el aislamiento de esquizontes a partir sus la células linfoblastoides hospedadoras (Pinder y col., 1978) no hacen posible separar los esquizontes sin dañarlos (Noyoroi y col., 1981). Por ello se emplea un muestra constituida por células linfoblastoides no parasitadas. que actúa como control de las isoenzimas que son propias de la célula hospedadora y no del parásito.

Para la caracterización de aislados de *Theileria*, otros autores han empleado, además de células linfoblastoides infectadas, los piroplasmas (estadio intraeritrocítico) (Van der Meer y col., 1981). En este caso, tampoco es necesaria la purificación de los parásitos, al igual que con los esquizontes, ya que las bandas de la actividad GPI asociada al parásito no interfieren con las de la célula hospedadora. Sin embargo, estos autores consideran que entre las desventajas de usar piroplasmas como material de estudio se encuentra la necesidad de alcanzar una alta parasitemia en la sangre, por lo que a veces el animal muere antes de conseguirse el nivel adecuado.

Teniendo en cuenta este problema, se considera que una fuente adecuada para preparar las muestras en el estudio del patrón isoenzimático de *Theileria*, el empleo de las células linfoblastoides infectadas con esquizontes y mantenidas en cultivo, ya que podemos conseguir la masa biológica tan concentrada como necesitemos.

5. VACUNA

La prevención de la theileriosis tropical bovina mediante el control de la garrapata vectora no es factible ni práctica bajo condiciones de campo (Singh y col., 1993)

Como método de elección entre las medidas profilácticas se destaca la vacunación del ganado que proporciona excelentes resultados y que se ha practicado en varios países. Las vacunas obtenidas han presentado la particularidad de ser efectivas en las zonas donde han sido aislados los parásitos que sirvieron para producirlas, y no en otras donde las cepas de *T. annulata* endémicas son diferentes.

En España, a pesar de presentarse la theileriosis de manera enzoótica y producirse bastantes casos de la enfermedad al año en ganado vacuno en sus variedades cárnica y lechera, además y casos esporádicos en la raza de lidia, no existía aún una vacuna frente a esta enfermedad. Por esta razón, nos propusimos obtener una vacuna que permitiera hacer frente a un problema de una magnitud económica considerable, siguiendo las indicaciones de Ozkoc y Pipano (1981), quienes consideran que es muy conveniente trabajar empleando cepas indígenas, en lugar de hacerlo con otras aisladas en áreas geográficas remotas.

La vacuna frente a esta enfermedad parasitaria puede confeccionarse por varios métodos. En nuestro caso nos planteamos la obtención de una vacuna constituida por esquizontes de *T. annulata* mantenidos en cultivo celular de linfoblastos bovinos. Se trata de una vacuna viva, esto tiene la ventaja de que el parásito se replica dentro del hospedador, y, por lo tanto, amplifica el antígeno (Ole-Moi Yoi, 1989), a diferencia de las vacunas inactivadas y vacunas sintéticas.

Para la obtención de una vacuna de este tipo, lo primero que necesitábamos era conseguir el aislamiento y cultivo *in vitro* del parásito. Para lograr esto, había sido fundamental todo el trabajo de muestreo y serodiagnóstico anterior, que nos permitía localizar las zonas donde la enfermedad tiene importancia y en las que es posible conseguir aislados de los que partir.

La naturaleza de la atenuación no se conoce, y el tiempo necesario para conseguirla puede variar desde unos pocos meses hasta algunos años (Irvin y Morrison, 1987). Para la atenuación de la virulencia se ha seguido básicamente la metodología descrita por Pipano (1981; 1989).

Para valorar el grado de atenuación, periódicamente hay que inocular a 2 terneros susceptibles con 2 a 5 millones de células parasitadas (Pipano, 1989). Se inocularon cultivos de 35 pases y se observaron las reacciones clínicas de ambos terneros. El resultado fue que se podía considerar que la virulencia ya estaba atenuada con sólo 35 pases, que prácticamente coincide con el mínimo de tiempo que se ha necesitado en los casos de atenuación de este parásito registrados en la literatura (Pipano, 1989). Consideramos que se había conseguido la atenuación completa porque después de la inoculación del cultivo, no se dió ningún síntoma clínico de la enfermedad y no se detectaron ni esquizontes en biopsia de órganos ni piroplasmas en sangre (Pipano, 1979).

El hecho de que los terneros han sido inoculados con un número de esquizontes equivalente a una dosis de vacuna fresca, que el cultivo estaba atenuado y que no presentaban ningún síntoma clínico permite suponer que se encuentran inmunizados frente a la theileriosis tropical.

Para valorar la respuesta de los terneros al proceso de vacunación, todos los autores consultados coinciden en que un método perfectamente adecuado es medir la evolución del título de anticuerpos de los animales después de la inoculación (Pipano y Cahana, 1968; Pipano y col., 1969; Pipano, 1970; 1971; Dolan, 1981; Paling y Geysen, 1981; Morzaria y col., 1987; Subramanian, 1989).

Según Pipano (1979), los esquizontes mantenidos en cultivo celular de pocos pases, cuando son inoculados a ganado susceptible, se comportan como si se tratase de esquizontes de los que hay en la sangre de animales infectados, dando lugar a theileriosis clínica, durante la cual se pueden detectar fácilmente esquizontes en el material de biopsia de ganglios

linfáticos e hígado. Este fenómeno ya había sido comprobado con anterioridad para *T. parva* por Brown y col. (1971) en unas experiencias en las que inducían infección en el ganado inoculando cantidades diferentes de células linfoides infectadas mantenidas en cultivo.

Teniendo en cuenta estos trabajos, como una aplicación más de los cultivos celulares en ensayos de inmunización frente a la theileriosis, empleamos células linfoides de la línea 28E con un número bajo de pases en cultivo, para confeccionar un "challenge" homólogo.

Tras la inoculación de este "challenge" a uno de los terneros vacunados (res nº 50) y a un ternero susceptible (res nº 107), las diferencias en la respuesta de ambas reses han sido evidentes. Mientras en el ternero vacunado la temperatura no ha sufrido alteración alguna, en el ternero susceptible se produjo una respuesta febril notoria, con temperaturas que se aproximaron a 41 °C y que fueron destacables durante varios días. Además, en el ternero susceptible se produjeron otros síntomas de la enfermedad, como son un fluido nasal abundante, petequias en la mucosa ocular e inflamación de ganglios linfáticos, todos ellos típicos de la infección por *T. annulata* (Ouhelli, 1985). Las formas sanguíneas del parásito, siempre que se observaron (a partir de 25 días postinoculación), fue en número muy bajo. y nunca llegó a darse una caída del hematocrito. Se observaron esquizontes en ganglio linfático precural transcurridos dos meses postinoculación. Mientras tanto, el ternero vacunado no mostró ningún síntoma de la enfermedad, ni tan siquiera una leve respuesta febril después de la inoculación del "challenge".

Hay que tener en cuenta que la respuesta encontrada en el ternero 107 tras el "challenge" se puede considerar como

"moderada" (Irvin y col., 1983). Esto puede deberse a que el parásito debía ser parcialmente virulento, dado que fue necesario que se alcanzaran 15 pases en cultivo para conseguir masa suficiente para el inóculo de los dos animales. Además, como ya se ha indicado, se comprobó que esta línea celular tenía una pérdida total de la virulencia con tan sólo 35 pases.

Un trabajo similar a éste, ha sido realizado recientemente con un aislado de la India que ha necesitado 150 pases en cultivo para conseguir la total atenuación (Singh y col., 1993). En dicho trabajo, el seguimiento de los terneros inoculados también ha consistido en medida de la temperatura rectal, observación de la parasitemia, cálculo del hematocrito y observación del estado de los ganglios linfáticos superficiales, al igual que en el presente estudio.

En cuanto a la viabilidad de la vacuna, observamos que se mantiene el porcentaje medio de células vivas que hay en el momento de la preparación de las dosis de vacuna durante los siguientes cuatro días de conservación de la misma, para reducirse a partir de este momento, con lo que dejamos de conocer la cantidad de células que estamos administrando en una dosis.

Por otro lado, observamos que la capacidad para establecerse nuevamente en cultivo que tienen estas células. Esta capacidad es buena durante los cuatro días primeros de conservación, mermando progresivamente a partir de este momento.

Por estos dos motivos, y teniendo en cuenta el trabajo de Uilenberg y Pipano (1981), en el que se indica que los esquizontes muertos fracasan en la inducción de la inmunidad frente a la theileriosis, y que una inmunización efectiva

depende del establecimiento de los parásitos en el hospedador, consideramos que el empleo de la vacuna fresca es adecuado desde el momento de preparación hasta los siguientes 4 días, con total garantía de su efectividad, no siendo aconsejable su empleo pasados los primeros cuatro días dada la pérdida en la viabilidad de las células que la constituyen. Este resultado coincide con las experiencias de Pipano (1989), para quien pasados 4-5 días la viabilidad desciende enormemente.

Aparte de estas pruebas de control general de la vacuna, hay que vigilar el medio en el que se encuentra la suspensión celular. Cualquier cambio del mismo será detectado por un viraje del color del medio, pues lleva como indicador rojo fenol, que presenta un color rojo a pH 7,2. Si no existe alteración en el pH del medio se mantendrá de este color durante todo el periodo de conservación a 4°C y en oscuridad. Si se hubiera producido contaminación en el momento de la preparación, y los microorganismos presentes en el medio lograsen proliferar a pesar de los antibióticos que se añaden al medio, se produciría un cambio hacia color amarillo indicativo de la acidificación del medio. En este caso se deben desechar los viales de vacuna en los que se produzca este proceso. Por otro lado, los viales deben mantenerse en oscuridad, porque existe la posibilidad de que el medio de cultivo se vea alterado por el estímulo de la luz solar dando lugar a compuestos fototóxicos que podrían afectar la propia viabilidad de las células.

Para la experiencia de vacunación de campo, se seleccionó una granja de una zona endémica y que presentaba problemas por theileriosis habitualmente todos los años. Consultado el propietario de la explotación ganadera, mostró una buena disposición a permitir el ensayo de campo de esta vacuna. Concretamente, en esta explotación se habían producido granades

pérdidas en años anteriores, con una morbilidad media del 25 % y una mortalidad media del 12,5 % por theileriosis mediterranea.

Por estas razones, se trataba de una granja idónea para llevar a cabo una experiencia de vacunación en la que el "challenge" por picadura de garrapatas estaba asegurado.

Previo a la vacunación, realizamos un estudio serológico de las reses con objeto de vacunar aquellos animales que pudiesen ser susceptibles de enfermar. Dado que hay un frecuente contacto con el agente infeccioso, muchas de las vacas han sufrido la enfermedad en algún momento de sus vidas y por lo tanto han quedado inmunizadas.

Normalmente, en las experiencias de vacunación de campo se inmuniza a todo el ganado indiscriminadamente sin tener en cuenta el posible contacto previo con el parásito. En algunos casos (Mutugi y col., 1991), el muestreo serológico previo se realiza con objeto de conocer el nivel posible de "challenge" al que se pueden ver sometidos los animales de la granja, pero no para seleccionar el ganado a inmunizar. En nuestro trabajo, hemos querido ser algo más exigentes para comprobar la efectividad de la vacuna. Por esta razón, sólo hemos considerado para la vacunación aquellas reses que tuvieran títulos de anticuerpos negativos o bajos. Así, sólo se han vacunado animales con títulos inferiores o iguales a 160. La resistencia a la reinfección en la theileriosis no es dependiente del nivel de anticuerpos circulantes (Pipano, 1979), pero éstos siempre son indicativos del contacto previo con el parásito.

En el muestreo serológico de todas las reses de la ganadería, se observaba que el título 160 era alcanzado hasta

por reses que por su edad prácticamente no habían tenido tiempo de enfermar, dado que en los primeros meses los anticuerpos antiesporozoito transferidos en el calostro parecen ejercer suficiente protección (Moll y col., 1981). Posteriormente, sus vidas habían transcurrido fuera de la época de máxima transmisión de la parasitosis, de distribución estacional, que ocurre de Junio a Octubre como indica Pipano (1989) y los facultativos consultados en nuestra encuesta. Pensamos que, de esta forma, animales que presentasen un título de 160 o menor, aunque tenían la posibilidad de haber experimentado algún contacto con el parásito, no habría sido suficiente como para desarrollar inmunidad frente a la misma.

Después de ser inoculadas las reses, se realizó el seguimiento de las mismas, comprobando que no se producían síntomas clínicos de la enfermedad y controlando la efectividad del proceso de inmunización mediante el análisis de la evolución del título de anticuerpos específicos desarrollados por las reses, que constituye, como ya se ha comentado, el método más aceptado por todos los autores que han realizado trabajos de este tipo.

Como se puede ver en la figura nº 34, que representa un gráfico general que resume todo el proceso de inmunización, en todos los lotes de reses vacunadas, se parte de valores medios de título de anticuerpos negativos a débilmente positivos (de negativo a próximos a 80).

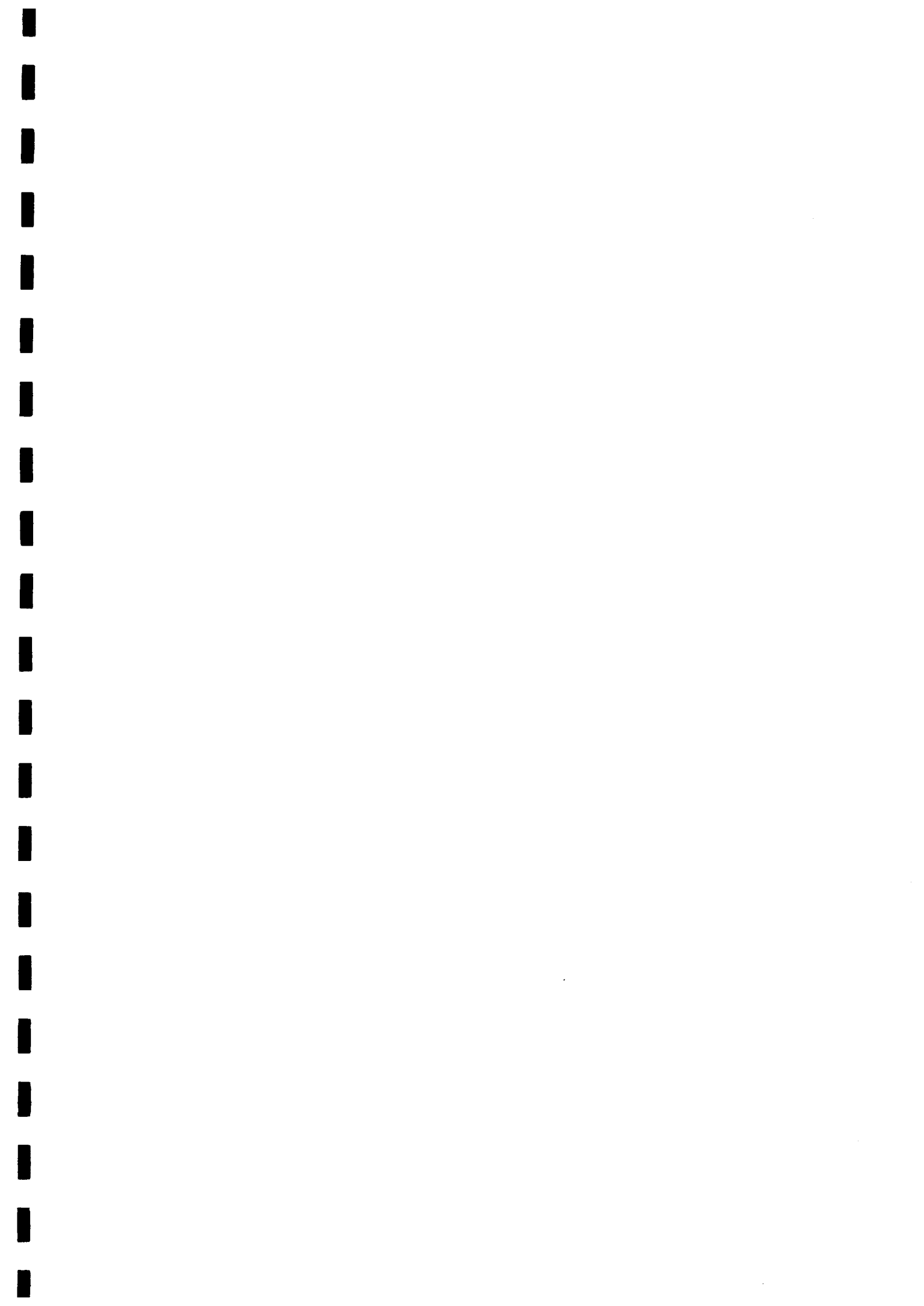
Hay que destacar, que si bien se produce una respuesta humoral adecuada, la media de los títulos alcanzados a los treinta días post-inoculación es sensiblemente inferior a la registrada por los terneros vacunados en condiciones de laboratorio. Este fenómeno coincide con el observado por Pipano y Cahana (1968) y Pipano y col. (1969).

En todos los lotes de reses vacunadas, la evolución de la respuesta ha sido normal tanto en el caso en que se ha administrado vacuna fresca como criopreservada. Se han alcanzado el máximo título de anticuerpos aproximadamente a los dos meses postinoculación, para comenzar un suave descenso a partir de este punto.

Se puede destacar que ha habido diferencia en la magnitud de la respuesta humoral entre los dos lotes de novillas que han sido vacunadas con dosis simple y dosis doble de vacuna criopreservada. No se han observado ninguna otra diferencia.

Al tratarse de un ensayo de vacunación en una granja situada en una zona endémica, el "challenge" al que se someten los animales es el natural, que pone en evidencia si la inmunización ha sido efectiva. Los animales se ven sometidos a la picadura de las garrapatas vectoras en condiciones naturales. Este tipo de "challenge" es el habitualmente empleado en condiciones de campo, como en el caso de los trabajos de Paling y Geysen (1981) y Morzaria y col. (1987), entre otros.

El resultado de someter las reses al enfrentamiento con el agente infectivo en condiciones naturales, ha sido totalmente satisfactorio, ya que no se ha producido ningún caso clínico de la enfermedad entre las reses vacunadas mientras que, en el lote control, se han producido ocho casos clínicos de los que dos han sido mortales.



- 1.- Un elevado porcentaje del ganado vacuno en las zonas endémicas a la theileriosis tropical de Andalucía ha tenido contacto con el parásito *Theileria annulata*. Este porcentaje se incrementa en razón directa a la edad del ganado, llegando a afectar a más de 3/4 partes del ganado vacuno de tres a cuatro años.
- 2.- Se ha demostrado que el ixódido (la garrapata) *Hyalomma lusitanicum* es capaz de transmitir, en condiciones experimentales, la theileriosis mediterránea (*T. annulata*) al ganado vacuno.
- 3.- La esplenectomía de la res de experimentación no es necesaria para que se establezca *T. annulata* en su hospedador vertebrado, ni para el aislamiento y establecimiento del parásito en cultivo *in vitro*.
- 4.- Se ha realizado, por primera vez en España, el aislamiento y establecimiento en cultivo *in vitro* de líneas celulares linfoblastoides infectadas con *T. annulata*, consiguiéndose tanto a partir de sangre como de biopsia de ganglios de animales parasitados.
- 5.- El parásito aislado pertenece a la especie *T. annulata* como se ha puesto de manifiesto por tinción, I.F.I. y análisis de isoenzimas.
- 6.- Se ha puesto a punto una técnica de I.F.I. que se ha demostrado efectiva para el diagnóstico epidemiológico de la theileriosis mediterránea en el ganado vacuno.

Conclusiones

- 7.- Por análisis de los isoenzimas de la glucosa-fosfato isomerasa (E.C. 5.3.1.9) se ha puesto de manifiesto que el primer aislado de *T. annulata* realizado por nosotros corresponde a una cepa diferente a la P-179 procedente de Israel.
- 8.- Mediante el cultivo *in vitro* de la línea celular linfoblastoide 28E infectada con *T. annulata* se logra la total atenuación de la virulencia del parásito en sólo 35 pases.
- 9.- Se ha obtenido una vacuna viva frente a la theileriosis mediterránea del ganado vacuno por inoculación de estas células linfoblastoides infectadas con *T. annulata* procedentes de un cultivo de virulencia totalmente atenuada.
- 10.- Esta vacuna se muestra altamente protectora frente a *T. annulata*, pues ha protegido a todas las reses inoculadas tanto en condiciones experimentales controladas como en situación de campo.
- 11.- La vacuna fresca puede conservarse a 4°C durante 4 días sin pérdida sensible de las características vitales ni organolépticas de la misma.
- 12.- La vacuna criopreservada muestra la misma efectividad que la vacuna fresca, al menos, en condiciones de campo.

GLOSARIO DE TERMINOS

AISLADO: Organismos viables que se aíslan en una ocasión a partir de una muestra de campo en hospedadores experimentales, sistemas de cultivo o estabilizado.

STOCK o ESTIRPE: Todas las poblaciones derivadas a partir de un aislado sin implicación de homogeneidad o caracterización. Las poblaciones de que consta un stock, de este modo, incluyen líneas celulares infectadas, estabilizadas de garrapatas y subsecuentes preparaciones parasitarias derivadas a partir de los anteriores.

ESTABILIZADO: Una muestra de organismos preservados activos (usualmente en réplica) en una sola ocasión. Material infectivo procedente de garrapatas infectadas preparada con la mezcla de varios ejemplares completos por homogenización y filtrado o bien con la mezcla de las glándulas salivales de varias garrapatas infectadas posteriormente disecadas.

LINEA: Un derivado de laboratorio de un stock mantenido bajo unas condiciones físicas definidas, por ejemplo, como puede ser un cultivo de células linfoides parasitadas.

CEPA: Una población de organismos homogéneos que poseen un grupo de caracteres definidos. Una caracterización no ambigua de una cepa, sólo puede ser asegurada si la población de organismos fue iniciada a partir de un clon parasitario.

CLON PARASITARIO: Líneas de especies de *Theileria* derivadas a partir de un parásito sólo. Tales clones no han sido aislados todavía, pero la posibilidad de conseguirlos a partir de kinetos individuales parece factible según indican los trabajos de Irwin y col (1981) y Youg y col. (1983).

CHALLENGE: Enfrentamiento al agente infeccioso normalmente esporozitos aunque también pueden ser esquizontes o piroplasmas al que se someten las reses después de haber sido inmunizadas. Esto se puede hacer por inoculación artificial de los agentes infectivos, o bien, sometiendo al ganado a la exposición a la picadura de las garrapatas rectoras de la enfermedad en el campo, y hablamos entonces de Challenge de campo.

CHALLENGE HOMOLOGO: Aquel en que se enfrenta al animal con el agente infeccioso de la misma cepa o stock que se empleó para vacunarlo.

CHALLENGE HETEROLOGO: Aquel en que se enfrenta al animal con una cepa o stock diferente del mismo parásito a la empleada para vacunarlo.

BIBLIOGRAFIA

- Baldwin, C. L., Goddeeris, B.M. and Morrison, W.I. (1987). Bovine helper T-cell clones specific for lymphocytes infected with *Theileria parva* (Muguga). *Parasite. Immunology*. vol. 9, pp. 499-513.
- Bansal G.C., S. R. N.V. y Subramanian G. (1987). Seroprevalence of ovine theileriasis in some farms of India. *Indian Journal of Animal Sciences*. vol. 57(5), pp. 366-368.
- Bell, L. J. (1984). Tick tissue culture techniques in the study of arthropod-borne protozoa: the development of *Theileria annulata* in organ culture of *Hyalomma anatolicum anatolicum*. In "Acarology VI" (Proceedings of sixth Acarology Congress). D.A. Griffiths and C.E. Bowman. vol. 2, pp. 1089-1095.
- Bloomfield, M. M. and Remington, J.S. (1970). Comparison of three strains of *Toxoplasma gondii* by polyacrylamide gel electrophoresis. *Trop. Geogr. Med.* vol. 22, pp. 367-370.
- Boyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* vol. 21 (Suppl. 97), pp. 77-89.
- Brandau C. y Jiménez F. (1990.). Theileriosis en el ganado vacuno. Resúmenes del I Congreso Internacional de Medicina Bovina. Madrid (España).
- Brown, C. G. D. (1981). Application of in vitro techniques to vaccination against theileriosis. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 104-119.

Bibliografia

- Brown, C. G. D. (1987). Chapter 10: Theileriidae. *In vitro* Methods for Parasites cultivation. Taylor, A.E.R., Baker, J.R., Academic Press. London. pp. 230-253.
- Brown, C. G. D. and Masiga, W.N. (1981). Chemotherapy: appraisal and future perspectives. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 224-226.
- Brown, C. G. D. (1980). *In vitro* cultivation of *Theileria*. In "The *In Vitro* Cultivation of the Pathogens of Tropical Diseases". (Rowe, D.S. and Hirumi, H. eds.) Schwabe, Basel. pp. 127-144.
- Brown, C. G. D., Stagg, D.A., Purnell, R.E., Kanhai, G.K. and Payne, R.C. (1973). Infection and transformation of bovine lymphoid cells *in vitro* by infective particles of *Theileria parva*. *Nature*. vol. 245, pp. 101-103.
- Brown, C. G. D. (1979). Propagation of *Theileria*. In "Practical Tissue Culture Applications". (Maramorosch, K. and Hirumi, H., eds.). Academic Press, New York and London. pp. 223-254.
- Brown C.G.D. (1983). *Theileria*. In "In vitro cultivation of Protozoan Parasites". J.B. Jensen, ed. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 243-284.
- Brown C.G.D., M. W. A., Cunningham M.P., Radley D.E. and Burridge M.J. (1971). Immunization against East Coast fever. Inoculation of cattle with *Theileria parva* schizonts grown in cell culture. *J. Parasitol.* vol. 57(4), pp. 59-60.

Bibliografia

- Burridge, M. J. (1971). Application of the indirect fluorescent antibody test in experimental East Coast fever (*Theileria parva* infection of cattle). *Res. Vet. Sci.* vol. 12, pp. 338-341.
- Burridge, M. J. and Kimber, C.D. (1973). Duration of serological response to the indirect fluorescent antibody test of cattle recovered from *Theileria parva* infection. *Res. Vet. Sci.* vol. 14, pp. 270-271.
- Burridge, M. J. and Kimber, C.D. (1972). The indirect fluorescent test for experimental East Coast fever (*Theileria parva* infection of cattle). Evaluation of a cell culture schizont antigen. *Res. Vet. Sci.* vol. 13, pp. 451-455.
- Callow, L. L. (1977). Vaccination against bovine babesiosis. In: L.H. Miller, J.A. Pino and J.J. Mckelvery (Editors), Immunity to Blood Parasites of Animals and Man, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. vol. 93, pp. 121-149.
- Carter, R. (1973). Enzyme variation in *Plasmodium berghei* and *Plasmodium vinckei*. *Parasitology*. vol. 66, pp. 297-307.
- Chema, S. and Brocklesby, D.W. (1981). Epidemiology appraisal and future perspectives. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 100-103.
- Conrad, P. A., Kelly, B.G. and Brown, C.G.D. (1985). Intraerythrocytic schizogony of *Theileria annulata*. *Parasitology*. vol. 91, pp. 67-82.

Bibliografía

- Dolan, T. T. (1981). Progress in the chemotherapy of theileriosis. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 186-208.
- Dschunkowsky, E. and Luhs, J. (1904). Die piroplasmosen der Rinder. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr.* vol. 1(35), pp. 486-491.
- Ebert, F. (1973). Charakterisierung von *Leishmania donovani*. Stämmen mit der Disk-Elektrophorese. *Z. Tropenmed. Parasit.* vol. 24, pp. 517-529.
- Emery, D. L., Morrison, W.I., Nelson, R.T. and Max Murray. (1981). The induction of cell-mediated immunity in cattle inoculated with cell lines parasitized with *Theileria parva*. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 295-310.
- F.A.O. (1988). El control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten Vol. I,II. F.A.O.. Roma. 458 pags.
- Flach, E. J. and Ouhelli, H. (1992). The epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection in cattle) in an endemic of Morocco. *Vet. Parasitol.* vol. 44, pp. 51-65.
- Fujisaki, K. K., T., Kawazu, S., Minami, T., Nakamura, Y., Shimura, K., Shimizu, S. and Henna, M. (1988). Experimental transmission of *Theileria sergenti* of cattle in Japan by *Haemaphysalis*. *Annals of Tropical and Parasitology.* vol. 82(5), pp. 513-515.

Bibliografía

- García Fernández P. y Hueli L.E. (1984). Garrapatas (Acarina, Ixodidae) Parásitas del ganado bovino en el sur de España. Identificación, distribución geográfica y estacional. *Rev. Ibér. Parasitol.* vol. 44(2), pp. 129-138.
- García Fernández P. y Romero Rodríguez J. (1978). Ixódidos vectores de las Piroplasmosis bovinas en España. Resúmenes de la II Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles. Madrid (España),. pp. 91.
- García Sanz, A. (1984). Cirujía más frecuente en ganado vacuno. vol. 1, 217 pags.
- García Fernández, P. (1978). Contribución al estudio de las Piroplasmosis bovinas en el Sur de España. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. pp. 591 pp.
- García Fernández, P. Romero Rodríguez, J. y Hueli, L.E. (1987). Piroplasmosis bovinas en Andalucía. II. Estudio en explotaciones agropecuarias. *Rev. Ibér. Parasitol.* vol. 47, pp. 7-13.
- García Fernández P., Romero Rodríguez J., y Hueli L.E. (1985). Piroplasmosis bovinas en Andalucía. I. Estudio en reses procedentes de mataderos. *Rev. Ibér. Parasitol.* vol. 45, pp. 48-58.
- García Fernández P., Romero Rodríguez J. y Hueli L.E. (1987). Piroplasmosis bovinas en Andalucía. II. Estudio en explotaciones agropecuarias. *Rev. Ibér. Parasitol.* vol. 47(1), pp. 7-13.
- García Fernández P. y Romero Rodríguez J. (1979). Realización de una encuesta epizootiológica sobre Piroplasmosis en Andalucía. Resum. II Congr. Nac. Parasitol. León. pp. 84.

Bibliografía

- García Fernández P., Viseras Alarcón J., Carrasco Carrillo L. y Hueli Amador L.E. (1993). Estudio sobre las garrapatas parásitas en ganaderías españolas de toros de lidia. Resúmenes del II Simposio Ibérico Sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas. Evora (Portugal).
- Gardener, P. J. and Howells, R.E. (1972). Isoenzyme variation in leishmanial parasites. *J. Protozool.* vol. 19, pp. 47.
- Gautam, O. P. (1981). Bovine tropical theileriosis and its control. Advances in the Control of Theileriosis. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 262-265.
- Gill, B. S., Bhattacharyulu, Y., Kaur, D. and Singh, A. (1981). Immunisation of cattle against *Theileria annulata*: a resume of work done at Punjab agricultural University, Ludhiana. Advances in the Control of Theileriosis. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 259-261.
- Gill, B. S., Bhattacharyulu, Y. and Kaur, D. (1976a). Immunization against bovine tropical theileriasis (*Theileria annulata* infection). *Res. Vet. Sci.* vol. 21, pp. 146-149.
- Gill, B. S., Bhattacharyulu, Y., Kaur, D. and Singh, A. (1976b). Vaccination against bovine tropical theileriasis (*Theileria annulata*). *Nature.* vol. 264, pp. 355-356.
- Goddeeris, B. M., Katende, J.M., Irvin, A.D. and Chumo, R.S.C. (1982). Indirect fluorescent antibody test for experimental and epizootiological studies on East Coast fever (*Theileria parva* infection of cattle). Evaluation of a cell culture schizont antigen fixed and stored in

- suspension. *Res. Vet. Sci.* vol. 33, pp. 360-365.
- Goding J.W. (1986). *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Second Edition (Academic Press). pp. 315 pags.
- Grootenhuis, J. G. and Young, A.S. (1981). The involvement of wildlife in *Theileria* infections of domestic animals in east Africa. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 71-73.
- Habela M., Aranda C., Rol J.A. y Navarrete I. (1993). Seroprevalencia de la theileriosis mediterránea en ganado bovino de aptitud lechera en la provincia de Granada (España). *Acta. Paras. Port.* vol. 1(2), pp. 247.
- Hall, F. R. (1988). Antigens and Immunity in *Theileria annulata*. *Parasitology Today*. vol. 4(9), pp. 257-261.
- Hashemi-Fesharki, R. (1988). Control of *Theileria annulata* in Iran. *Parasitology Today*. vol. 4(2), pp. 36-40.
- Hooshmand-Rad, P. and Hawa, N.J. (1975). Cultivation of *Theileria hirci* in sheep lymphoid cells. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* vol. 7, pp. 121-125.
- Hooshmand-Rad, P. and Hashemi-Fesharki, R. (1968). The effect of virulence on cultivation of *Theileria annulata* strains in lymphoid cells which have been cultured in suspension. *Arch. Inst. Razi*. vol. 20, pp. 85-89.
- Hooshmand-Rad, P. (1975). The growth of *Theileria annulata* infected cells in suspension culture. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* vol. 7, pp. 23-28.

Bibliografía

- Hueli, L. E. (1979). Estudio del ciclo biológico de *Hyalomma marginatum marginatum* Koch, 1844 (Acarina: Ixodidae) bajo condiciones estándar de laboratorio. *Rev. Ibér. Parasitol.* vol. 39, pp. 143-152.
- Hueli, L. E. (1982). Estudios sobre la biología de algunos Ixódidos del Sur de España. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. pp. 357 pp.
- Hueli, L. E. (1984). Método de cultivo de *Hyalomma (Hyalomma) marginatum marginatum* Koch, 1844 (Acarina: Ixodidae). *Ars. Pharmaceutica.* vol. 25, pp. 407-413.
- Hulliger, L. W., J.K.H., Brown, C.G.D. and Turner, L. (1964). Mode of multiplication of *Theileria* in cultures of bovine lymphocytic cells. *Nature.* vol. 203, pp. 728-730.
- Innes, E. A., Ouhelli, H., Oliver, R.A., Simpson, S.P., Brown, C.G.D., and Spooner, R.L. (1989). The effect of MHC compatibility between parasite-infected cell line and recipient in immunisation against tropical theileriosis. *Parasite Immunol.* vol. 11, pp. 47-56.
- Irvin, A. D. (1987). Characterization of Species and Strains of *Theileria*. In *Advances in Parasitology*. Ed. J.R. Baker and R. Muller, Academic Press. vol. 26, pp. 145-179.
- Irvin, A. D. and Gill, B.S. (1981). Immunization against theileriosis: appraisal and future perspectives. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 266-272.

- Irvin, A. D., Dobbelaere, D.A.E., Mwamachi, D.M., Minami, T., Spooner, P.R. and Ocama, J.G.R. (1983). Immunization against East Coast Fever: correlation between monoclonal antibody profile of *Theileria parva* stocks and cross-immunity in vivo. *Res. Vet. Sci.* vol. 35, pp. 341-346.
- Irvin, A. D. and Morrison, W.I. (1987). Immunoprophylaxis, Immunology, and Immunoprophylaxis of *Theileria* infections. In Immune responses in parasite infections: Immunology, immunopathology, and immunoprophylaxis. Vol. III, Protozoa. Soulsby, E.J.L. (ed.). C.R.C. Press, Boca Ratón, Florida. vol. 3(5), pp. 223-267.
- Irvin, A. D., Chumo, R.S.C., Dobbelaere, D.A.E., Goddeeris, B., Katende, J., Minami, T., Ocama, J.G.R. and Spooner, P.R. (1981). Preliminary studies on East Coast fever in the coast province of Kenya. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 66-70.
- Ishii, M. M., T., Takahashi, K., Kawakami, Y., Iwai, H. and Onuma, M. (1992). Activation of Bovine Peripheral Blood Monocyte and Its Suppressive Effect on Parasitemia in *Theileria sergenti* Infected Calves. *J. Vet. Med. Sci.* 54(3), pp. 473-477.
- Jarrett, W. F. H., Jennings, S. Martin, W.B., Urquhart, G.M., Nderito, P., Brocklesby, D.W. and Bailey, K.P. (1969). Transmission of East Coast Ferver using cells from infected animals. En: *Proceedings of the First International Congress of Parasitology*. (A. Coradetti, ed.), Pergamon Press, New York. vol. 1, pp. 105-106.

Bibliografía

- Juste, R. A., Scott, G.R., Paxton, E.A., Gelabert, S.L. and Jiménez, S. (1989). Presence of *Cytoecetes phagocytophila* in an atypical disease of cattle in Spain. *Veterinary Record*. vol. 124, pp. 636.
- Juste Jordán, R. A., García Pérez, A.L. y Povedano Fernández, I. (1986). Estudio experimental de algunos agentes patógenos transmitidos por garrapatas (*Babesia*, *Theileria*, *Cytoecetes* y *Anaplasma*) en ovejas del País Vasco. *Med. Vet.* vol. 3(9), pp. 431-439.
- Kachani, M. and Spooner, R.L. (1992b). Anti-lymphocyte antibodies generated in animals immunised with *Theileria annulata*-infected cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* vol. 33, pp. 163-169.
- Kachani, M. S., R.L., Rae, P., Bell-Sakyi, L., and Brown, C.G.D. (1992a). Stage-specific responses following infection with *Theileria annulata* as evaluated using ELISA. *Parasitol. Res.* vol. 78, pp. 43-47.
- Kamio, T. F., K. and Minami, T. (1989). Correlation between the infection rate of the vector tick, *Haemaphysalis longicornis* and the parasitaemia of cattle infected with *Theileria sergenti*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. vol. 83(1), pp. 77-83.
- Kamio, T. F., K. and Minami, T. (1987). The improvement of "ear bag" method for tick infestation. *Proc. Jpn. Assoc. Acarol.* vol. 14, pp. 1-4.
- Kilgour, V. G., P.J., Godfrey, D.G. and Peters, W. (1974). Demostration of electrophoretic variation of two amino transferases in *leishmania*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. vol. 68, pp. 245-246.

- Kilgour, V. a. Godfrey, D.G. (1973). Species-characteristic isoenzymes of two aminotransferases in trypanosoms. *Nature New Biology*. vol. 244, pp. 69-70.
- Kreutzer, R. D. and Christensen, H.A. (1980). Characterization of *Leishmania* spp. by isoenzyme electrophoresis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. . vol. 29, pp. 122-208.
- Kurtti, T. J., Munderloh, U.G., Irvin, A.D. and Buscher, G. (1981). *Theileria parva*: early events in the development of bovine lymphoblastoid cell lines persistently infected with macroschizonts. *Experimental Parasitology*. vol. 52, pp. 280-290.
- Levine, N. D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, III, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. and Wa. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J. Protozool.* vol. 27(1), pp. 37-58.
- Löhr, K. F. and Röss, J.P.J. (1969). Serological Response in Cattle to East Coast fever (*Theileria parva* Infection) as Measured by the Indirect Fluorescent Antibody Test. *Res. vet. Sci.* vol. 10, pp. 453-460.
- Malmquist W.Q., N. M. B.A. and Brown C.G.D. (1970). East Coast fever: cultivation *in vitro* of bovine spleen cell lines infected and transformed by *Theileria parva*. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* vol. 2, pp. 139-145.
- Marshall y Brown, 1.(citado por Pasteur y col., 1987).

Bibliografía

- McHardy, N. (1991). Integrated strategy to control East Coast fever. *The Veterinary Record*. vol. 129(21), pp. 475.
- Mehlhorn, H. and Schein, E. (1984). The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.* vol. 23, pp. 37-103.
- Melrose T.R., Brown C.G.D. and Sharma D. (1980). Glucose phosphate isomerase isoenzyme patterns in bovine lymphoblastoid cell lines infected with *Theileria annulata* and *T. parva*, with an improved enzyme visualisation method using meldola blue. *Research in Veterinary Science*. vol. 29, pp. 298-304.
- Melrose, T. R., Brown, C.G.D., Morzaria, S.P., Ocama, J.G.R. and Irvin, A.D. (1984). Glucose phosphate isomerase polymorphism in *Theileria annulata* and *Theileria parva*. *Trop. Anim. Hlth Prod.* vol. 16, pp. 239-245.
- Melrose T.R., W. A. R. and Brown C.G.D. (1981). Identification of *Theileria* infections in the salivary glands of *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Rhipicephalus appendiculatus* using isoenzyme electrophoresis. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* vol. 13, pp. 70-78.
- Minami, T. I., T. and Fujita, J. (1981). Bovine theileriosis and its control in Japan. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 94-96.
- Moll, G. L., A. and Young, A.S. (1981). The epidemiology of theileriosis in the Trans-Mara Division, Kenya. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 56-59.

Bibliografía

- Montalvo, F. a. Reeves, R.E. (1968). Electrophoretic characterization of Amebal Glucose Phosphate Isomerases. *Exp. Parasitol.* vol. 22, pp. 129-136.
- Morrison, W. I. (1987). Host Effector Mechanisms Against Parasites. *Vet. Parasitol.* vol. 25, pp. 163-176.
- Morrison, W. I., Büscher, G., Emery, D.L., Nelson, R.T. and Murray, M. The kinetics of infection with *Theileria parva* in cattle and the relevance to development of immunity. 1981. pp. 311-326.
- Morzaria, S. P., Irvin, A.D., Taracha, E., Spooner, P.R., Voigt, W.P., Fujinaga, T. and Katende, J. (1987). Immunization against East Coast fever: the use of cattle exposed to field challenge. *Vet. Parasitol.* vol. 23, pp. 23-41.
- Morzaria, S. P., Um El Hassan Mustafa, Shawgi, M.H., Pedersen, V. and Osman, A.M. (1981). Isolation, identification and transmission of *Theileria mutans* in northern Sudan. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 166-169.
- Morzaria, S. P., Tatchell, R.J., Minor, R., Pedersen, V., Julla, I., Rahim, Dyson, D. and Van Aarle, P.A.M. (1981). Preliminary studies on the epidemiology of theileriosis in eastern equatoria province of the Sudan. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 83-85.

Bibliografía

- Mutugi, J. J., Ndungu, S.G., linyonyi, A., Maritim, A.C., Mining, S.K., Ngumi, P.N., Kariuki, D.P., Leitch, B.L., d'Souza, D., Maloo, S. and Lohr, K.F. (1991). Responses to a vaccine trial for East Coast fever in two cattle herds at the Kenyan coast. *Preventive Veterinary Medicine*. vol. 10, pp. 173-183.
- Navarrete, I. N., C.G., Habela, M.A., Reina, D. y Serrano, F. (1992). *Theileria* y *Theileriosis*. En *Avances en Parasitología: Protozoología* (Coord. M.L. Sanmartín Durán. Servicio Public. e Intercambio Científico. Universidad de Compostela. pp. 239-269.
- Neitz, W. O. (1957). *Theileriosis, gonderiosis and cytauxzoonoses: a review*. *Onderstepoort J. vet. Sci.* vol. 27(3), pp. 275-430.
- Nyormoi, O. and Bwayo, J.J. (1981). Isozyme patterns of *Theileria parva*-infected bovine lymphoblastoid cells and purified *Theileria macroschizonts*. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 383-385.
- Ole-Moiyoi, O. K. (1989). *Theileria parva: An Intracellular Protozoan Parasite that Induces Reversible Lymphocyte Transformation*. *Experimental Parasitology*. vol. 69, pp. 204-210.
- Ouhelli, H. I., E.A., Brown, C.G.D., Walker, A.R., Simpson, S.P. and Spooner, R.L. (1989). The effect of dose and line on immunization of cattle with lymphoblastoid cells infected with *Theileria annulata*. *Vet. Parasitol.* vol. 31, pp. 217-228.

Bibliografía

- Ouhelli, H. (1985). Theileriose bovine á *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs 1904). Recherche sur la biologie des vecteurs (*Hyalomma* spp.) et sur les interactions hôte-parasite. Thèse de Doctorat d'Etat, I.N.P. Toulouse. pp. 190 pp.
- Ozkoc, U. and Pipano, E. (1981). Trials with cell culture vaccine against theileriosis in Turkey. Advances in the Control of Theileriosis. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 256-258.
- Paling, R. W. and Geysen, D. (1981). Observations on rwandan strains of *Theileria parva* and the value of *T. parva* Nyakizu as a possible vaccine strain. Advances in the Control of Theileriosis. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 238-241.
- Pasteur, N. P., G., Bonhomme, F., Catalan, J. and Britton-Davidian, J. (1987). Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. *Technique documentation* (Lavoisier), Paris. pp. 217 p.
- Pinder M., K. T. J. and Hirumi H. (1978). Isolation of macroschizonts and piroplasms of *Theileria parva*. Fourth International Congress of Parasitology, Section C, Warsaw, Poland.
- Pipano E. and Cahana M. (1968). Fluorescent test for the serodiagnosis of *Theileria annulata*. *J. Parasitol.* vol. 55, pp. 765.



Bibliografía

- Pipano, E. and Israel, V. (1971). Absence of erythrocyte forms of *Theileria annulata* in calves inoculated with schizonts from a virulent field strain grown in tissue culture. *J. Protozool.* vol. 18(Suppl.), pp. 37.
- Pipano, E. (1977). Basic principles of *Theileria annulata* control. In: J.B. Henson and M. Cambell (Editors), *Theileriosis*. I.D.R.C., Ottawa. pp. 55-65.
- Pipano, E. (1989). Bovine theileriosis in Israel. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* vol. 8(1), pp. 79-87.
- Pipano, E. (1989). Chapter 10: Vaccination against *Theileria annulata* theileriosis. In *Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines*. Edited by I.G. Wright, C.R.C. Press. Inc. Boca Raton, Florida. pp. 203-234.
- Pipano, E. Skap, V. et Frank, M. (1989). Comparaison de trois méthodes de préparation de cultures *in vitro* de schizontes de *Theileria annulata*. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.* vol. 42(4), pp. 529-533.
- Pipano, E. (1972). Development of schizonts in calves inoculated with red blood cell forms of *Theileria annulata*. *J. Protozool.* vol. 19(Suppl.), pp. 54-55.
- Pipano, E. (1970). Immune response of calves to varying numbers of attenuated schizonts of *Theileria annulata*. *J. Protozool.* vol. 17(Suppl.), pp. 31.
- Pipano, E. (1984). Immunization against *Theileria annulata* infection. In "Tick and Tick-borne Disease Control: a Practical Field Manual II". (McCosker, P.J. and Tatchell, R.J., eds.) FAO, UN, Rome. pp. 508-563.

Bibliografía

- Pipano, E. (1971). Immunization of calves with attenuated wild strains of *Theileria annulata*. *Comptes-Rendus 1 er. Multicolloque Europeen de Parasitologie*. pp. 202-205.
- Pipano, E. G., M., Samish, M. and Friedhoff, K.T. (1977). Immunization of cattle against *Theileria annulata* using killed schizont vaccine. *Vet. Parasit.* vol. 3, pp. 11-22.
- Pipano, E. (1974). Immunological aspects of *Theileria annulata* infection. *Bull. Off. Int. Epiz.* vol. 81, pp. 139-159.
- Pipano, E. and Cahana, M. (1968). Measurement of the immune response to vaccine from tissue culture of *Theileria annulata* by the fluorescent antibody test. *J. Protozool.* vol. 15(Suppl.), pp. 45.
- Pipano, E. (1981). Schizonts and tick stages in immunization against *Theileria annulata* infection. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 242-252.
- Pipano, E. (1979). Virulence and immunogenicity of cultured *Theileria annulata* schizonts. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* vol. 50, pp. 332-333.
- Pirie H.M., J. W. F.H. and Crighton G.V. (1970). Studies on vaccination against East Coast fever. *Exp. Parasitol.* vol. 27, pp. 343-349.
- Purnell, R. E. (1977). East Coast fever: Some Recent Research in East Africa,. In *Advances in Parasitology*. Ed. B. Dawes, Academic Press. vol. 15, pp. 83-132.

Bibliografía

- Purnell, R. E. (1978). *Theileria annulata* as a hazard to cattle in countries on the northern Mediterranean littoral. *Vet. Sci. Comm.* vol. 2, pp. 3-10.
- Radley, D. E. (1981). Infection and treatment method of immunization against theileriosis. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 227-237.
- Rana Y.S. and Dhar S. (1993). Immunization of bovine calves against bovine tropical theileriosis by infection and treatment method. *The Indian Veterinary Journal*. vol. 70, pp. 408-410.
- Rioux, J. A., Lanotte, G., Maazoun, R., Perello, R. and Pratlong, F. (1980). *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent du Bouton d'Orient autochtone. A propos de l'identification biochimique de deux souches isolées dans les Pyrénées-Orientales. *Comp. Rend. Acad. Sci. Paris*. vol. sér. D., pp. 701-703.
- Robinson, P. M. (1982). *Theileria annulata* and its transmission. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* vol. 14, pp. 3-12.
- Rol, J. A. (1990). Epidemiología de la Theileriosis en ganado bovino de aptitud lechera en el término municipal del Casar de Cáceres. Estudio de un caso clínico. Trabajo de investigación del Programa de Doctorado. Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria de Cáceres.
- Saidu, S. N. A. (1981). *Theileria mutans* in Nigeria: clinical records of prevalence and experimental infection in calves. *Advances in the Control of Theileriosis*. Eds A.

- D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 86-87.
- Samish, M. and Pipano, E. (1981). Preparation and application of *Theileria annulata* infected stabilate. Advances in the Control of Theileriosis. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 253-255.
- Sangwan, A. K., Chhabra, M.B. and Samantaray, S. (1989). Relative role of male and female *Hyalomma anatolicum anatolicum* ticks in *Theileria* transmission. *Vet. Parasitol.* vol. 31, pp. 83-87.
- Sato, M. K., T., Kawazu, S., Taniguchi, T., Minami, T. and Fujisaki, K. (1993). Histological Observations on the Schizonts in Cattle Infected with Japanese *Theileria sergenti*. *J. Vet. Med. Sci.* vol. 55(4), pp. 571-574.
- Schein, E. and Voigt, W.P. (1981). Chemotherapy of theileriosis in cattle. Advances in the Control of Theileriosis. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 212-214.
- Schein, E. B., G. and Friedhoff, K.T. (1975). Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung von *Theileria annulata* (Dschunkowsky und Lunhs 1904) in *Hyalomma anatolicum excavatum* (Koch 1844): I. Die Entwicklung im Darm vollgesogener Nymphen. *Z. Parasitenkd.* vol. 48, pp. 123-136.
- Scindler R. and Wolatsch R. (1965). Attempts at differentiation of theileria species from cattle by serological test. *Z. Parasitenkd.* vol. 16, pp. 17-23.

Bibliografía

Sergent, E. Donatien, A., Parrot, L. and Lestoquard, F. (1936).
Development cycle of *T. dispar* in *Amblyomma mauritanicum*.
Arch. Inst. Pasteur Alger. vol. 14, pp. 259-294.

Sergent, E. Donatien, A. et Parrot, L. (1954). Du genre
Piroplasma L.S. et des sous-genres *Piroplasma* S.S. et
Babesiella. *Arch. Institut Pasteur d'Algérie.* vol. 3, pp.
194-197.

Sergent, E. D., A., Parrot, L. and Lestoquard, F. (1945). Etude
sur les piroplasmoses bovines. *Inst. Pasteur d'Alger.* 816
pags.

Shad-Del, F. (1977). Studies on suspension cultures of lymphoid
cells infected with *Theileria annulata*. PhD Thesis.
University of Edinburgh.

Sharma, R. D. and Brown, C.G.D. (1981). In vitro studies on two
strains of *Theileria annulata*. *Advances in the Control of
Theileriosis.* Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S.
Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp.
140-142.

Shiels, B. M., C., Tait, A. and Brown C.G.D. (1986). Antigenic
diversity of *Theileria annulata* macroschizonts. *Vet.
Parasitol.* vol. 21, pp. 1-10.

Shiels, B. K., J., McKellar, S., Dickson, J., Ben Miled, L.,
Melrose, R., Brown, D. and Tait, A. (1992). Disruption of
synchrony between parasite growth and host cell division
is a determinant of differentiation to the merozoite in
Theileria annulata. *Journal of Cell Science.* vol. 101, pp.
99-107.

Bibliografia

- Singh, D. K., Varshney, B.C., Raghav, P.R.S. and Thakur, M. (1993). Response of crossbred calves to immunization with *Theileria annulata* schizont infected lymphoid cells cultures. *Indian Vet. J.* vol. 70, pp. 605-608.
- Singh, D. K. (1990). Methods currently used for the control of *Theileria annulata*, their validity and proposals for future control strategies. *Parasitologia.* vol. 32, pp. 33-40.
- Stagg, D. A., Kanhai, G.K., Young, A.S. and Brown, C.G.D. (1976). The establishment of *Theileria*-infected cell lines from an eland (*Taurotragus oryx* Lydekker, 1906). *Research in Veterinary Science.* vol. 20, pp. 122-126.
- Stagg, D. A., Brown, C.G.D., Crawford, J.G., Kanhai, G.D. and Young, A.S. (1974). *In vitro* cultivation of *Theileria lawrencei*-infected cell lines derived from a buffalo (*Syncerus caffer*). *Research in Veterinary Science.* vol. 16, pp. 125-127.
- Stagg, D. A., Dolan, T.T., Leitch, B.L. and Young, A.S. (1981). The initial stages of infection of cattle cells with *Theileria parva* sporozoites *in vitro*. *Parasitology* . vol. 83, pp. 191-197.
- Stagg, D. A., Chasey, D., Young, A.S., Morzaria, S.P. and Dolan, T. (1980). Synchronization of the division of *Theileria macroschizonts* and their mammalian host cells. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* vol. 74, pp. 263-265.
- Stepanova, N. I. and Zablotskii, V.T. (1989). Bovine theileriosis in the USSR. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* vol. 8(1), pp. 89-92.

Bibliografía

- Subramanian G, B. G. c., Ray D. and Srivastava R.V.N. (1998). Effect of live schizont (*T. annulata*) vaccine in neonatal crossbred bovines. *Indian Journal of Animal Sciences*. vol. 59(1), pp. 9-13.
- Subramanian G., Naithani R.C. and Ray D. (1987). Cross-Reaction among Four Isolates of *Theileria annulata* from India. *Vet. Parasitol.* vol. 25, pp. 75-77.
- Subramanian G, S. R. V N, Bansal G. C and Ray D. (1988). A field trial with a live schizont vaccine (*T. annulata*) for control of bovine. *Indian Journal of Animal Sciences*. vol. 58(6), pp. 529-33.
- Tait, A. and Hall, F.R. (1990). *Theileria annulata*: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* vol. 9(2), pp. 387-403.
- Tsur, I. and Adler, S. (1962). Cultivation of *Theileria annulata* schizonts in monolayer tissue cultures. *Refuah Vet.* vol. 19(4), pp. 224-225.
- Tsur, I. and Alder, S. (1965). The cultivation of lymphoid cells and *Theileria annulata* schizonts from infected bovine blood. *Refuah Vet.* vol. 22(1), pp. 60-62.
- Tsur-Tchernomortz, I. (1945). Multiplication in vitro of Koch bodies of *Theileria annulata*. *Nature*. vol. 156, pp. 391.
- Uilenberg G. (1976). Tick-borne livestock diseases and their vectors. *World Animal Review*. vol. 17, pp. 8-15.

Bibliografía

- Uilenberg, G. a. Pipano, E. (1981). In vitro studies: appraisal and future perspectives. Advances in the Control of Theileriosis. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 143-147.
- Uilenberg, G. (1981). *Theileria* species of domestic livestock. Advances in the Control of Theileriosis. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 4-37.
- Uilenberg G., S. r. s., Mpangala C., Tondeur w., Tatchell R.j. and Sanga H.J.N. (1977). Studies on Theileriidae (Sporozoa) in Tanzania.X. A large-scale field trial on immunization against cattle theileriosis. *Tropenmedizin and Parasitologie*. vol. 28, pp. 499-506.
- Van Den Ende, M. et Edlinger, E. (1971). Culture de lignées lymphocytaires bovines infectées par *Theileria annulata*. Archives de L'Institut Pasteur de Tunis. vol. 1-2, pp. 45-54.
- Van der Meer P., U. G., Van den Bergh S.G., Spanfer M. and Perié N.M. (1981). Isoenzyme studies on *Theileria* (Protozoa, Sporozoa). enzyme activity associated with the erythrocytic stage. *The Veterinary Quarterly*. vol. 3(2), pp. 61-65.
- W.H.O. (1979). The African trypanosomes. Technical Report Series No. 635.
- Wagner, G. G., and Duffus, W.P.H. (1974). Antilymphocyte antibody responses in cattle inoculated with *Theileria parva*-infected lymphoblastoid cell lines. Parasitic

Bibliografía

Zoonoses, Soulsby, E.J.L., Ed., Academic Press. New York.
vol. 420,

Wenyon C.M. (1926). (Citado por Pipano, 1989).

Young, A. S. (1981). The epidemiology of theileriosis en East Africa. Advances in the Control of Theileriosis. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 38-55.

Young, A. S., Leitch, B.L. and Newson, R.M. (1981). The ocurrence of a *Theileria parva* carrier state in cattle from an East Coast fever endemic area of Kenya. Advances in the Control of Theileriosis. Eds A. D. Irvin, M.P. Cunningham and A. S. Young. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. pp. 61-62.

Zablotskii, V. T. (1967). Use of tissue culture in the study of *Theileria annulata*. Veterinariya (Moscow). vol. 44(9), pp. 66-69.