

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL
DE PROBIÓTICOS EN LA VACUNACIÓN DE Anaplasma
marginale BAJO CONDICIONES CONTROLADAS**

TESIS PROFESIONAL

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

PRESENTA

PMVZ. CARLOS ARTURO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

DIRECTOR

PH D. SERGIO DARÍO RODRÍGUEZ CAMARILLO

ASESOR

PH D. GERMINAL JORGE CANTÓ ALARCÓN

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., DICIEMBRE DE 2006

DEDICATORIA

A mi familia por darme todo para llegar hasta aquí
a todos mis maestro(a)s de la carrera de Medicina Veterinaria
a mis compañero(a)s y amigo(a)s del CUCBA y Preparatoria No. 2
y a toda la familia Marban, Anzaldúa y Marquina.

Este trabajo esta dedicado en especial
a mi abuela Esperanza, mis abuelos Trino y Rene
y a mi tío Arturo que desde donde estén
yo se que me cuidan y que están muy orgullosos de mi.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio D. Rodríguez y Dr. Germinal J. Cantó.

Por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo,
así como por su orientación, enseñanza y apoyo incondicional.

Al M.C. Miguel A. García, M.C. Edmundo Rojas,

MVZ. Francisco Preciado, Dr. Carlos Vega

Dr. Alfonso Falcón y Dr. Juan J. Mosqueda.

Por el apoyo, paciencia y su invaluable aportación
de conocimientos y aprendizaje a mi vida profesional.

A Carmen Castañeda, Georgina Hernández,

D. Montoya, R. Labra, J. Romano y L. Montiel.

Por su ayuda en la elaboración de este trabajo.

A todos los investigadores y compañeros

del CENID – Parasitología Veterinaria, INIFAP.

Por su amistad y todo lo que conseguí aprender de ustedes.

CONTENIDO

Resumen.....	x
Introducción.....	1
Planteamiento del problema.....	6
Justificación.....	8
Hipótesis.....	9
Objetivos.....	10
Material y Métodos.....	11
Resultados.....	18
Discusión.....	27
Conclusiones.....	29
Bibliografía.....	30

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar algunos parámetros inmunológicos y clínicos a fin de determinar el efecto de probióticos administrados por vía oral en la respuesta inmune de bovinos contra un agente infeccioso bajo condiciones controladas utilizando la vacunación contra *Anaplasma marginale* como modelo. Se utilizaron 48 bovinos distribuidos en dos grupos; el primer grupo fue inmunizado con una vacuna inactivada los días 35 y 50 después de iniciar la administración de probióticos en el alimento, el día 50 también se inoculó una vacuna de baja virulencia, en tanto que el segundo grupo no recibió inmunización alguna. A su vez, cada grupo fue subdividido en subgrupos (SG) de acuerdo al probiótico administrado en el alimento: SG1 (2g *Bacillus subtilis*/animal/día), SG2 (15g *Saccharomyces cerevisiae* cepa P7/animal/día), SG3 (2g *B. subtilis* + 15g *S. cerevisiae* cepa P7/animal/día) y SGT sin probióticos. El día 78 todos los animales fueron confrontados con una dosis de 1×10^8 de eritrocitos infectados con *A. marginale*. Los resultados sometidos a análisis de varianza y prueba de diferencias mínimas significativas no mostraron diferencias entre los subgrupos de cada grupo, por lo que bajo las condiciones del presente estudio con el modelo de vacunación contra *A. marginale*, la administración oral de probióticos no proporcionó un estímulo adicional significativo en la respuesta inmune. En contraste, en el análisis entre el grupo inmunizado y el grupo control, independientemente si recibieron o no probióticos, se observaron diferencias ($p < 0.05$) en el volumen celular aglomerado, porcentaje de eritrocitos infectados, valores totales de inmunoglobulina G (IgG); valores de IgG1 e IgG2 e interferón gama.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los efectos benéficos de microorganismos en la flora intestinal data de principios del siglo XX con los trabajos de Metchnikoff. Para 1974 surge el término probiótico. La FAO define a los probióticos como “Un microorganismo no patógeno resistente a la digestión normal, que llega al estómago e intestino en forma viable y que se ha probado científicamente que tiene un efecto promotor de la salud para el hospedero”. Entre las funciones benéficas de los probióticos está la producción de metabolitos con propiedades anti-microbianas, exclusión por competencia de patógenos gastrointestinales, neutralización de carcinógenos que se encuentran en las dietas (Teitelbaum y Walker, 2002; Ouwehand y col., 2002), moduladores de la respuesta inmunitaria de las mucosas (Hooper y Gordon, 2001), entre otros diversos efectos de estos microorganismos que se encuentran ampliamente documentados a nivel mundial (Xu y Gordon 2003).

El auge actual de los probióticos como una alternativa en la medicina veterinaria surge de la enorme preocupación del uso excesivo en la administración de antibióticos; al ser estos compuestos los elementos más utilizados para combatir patógenos oportunistas y como aditivos promotores del crecimiento, inducen la selección de cepas bacterianas resistentes y la contaminación con antibióticos en productos destinados al consumo humano como la carne y la leche que podrían a su vez contribuir también a la selección de microorganismos resistentes a los antibióticos utilizados en medicina humana; el problema se hace más complejo al

considerar que los antibióticos también eliminan a microorganismos no patógenos que son de vital importancia en el funcionamiento fisiológico de los animales.

Todo esto ha llevado a que se tomen a cabo estrategias de protección alimentaria a nivel internacional (Codex Alimentarius, FAO-OMS), así como numerosas y complejas normas y leyes en los países de potencia mundial (Code of Federal Regulations, USA) dirigidas a reducir la contaminación en los alimentos, como también prevenir las enfermedades de transmisión alimentarias; llevando a cabo estrictos estándares de inocuidad en materia de sanidad animal que dejan fuera de cualquier competitividad comercial en la exportación de productos a países que no cumplen con las regulaciones y estándares internacionales.

Entre los probióticos más utilizados actualmente está la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que contiene en su pared celular beta-glucanos que son polímeros de glucosa con uniones beta (β 1-3 y/o β 1-6) y que se consideran como promotores de la activación inespecífica del sistema inmune, al incrementar la resistencia del huésped a una gran variedad de problemas biológicos y siendo efectivos en la prevención de infecciones a través de la estimulación de los macrófagos y neutrófilos (Abel y Czop, 1990; Pelizon y col, 2003). Algunos glucanos como el zymosan son utilizados como adyuvantes en la producción de vacunas, al ser un potente estimulador de los macrófagos alveolares (Sorenson y col., 1998). Estos glucanos son ingeridos por células dendríticas a través de un receptor específico para mananos y beta-glucanos (Reis y Sousa, 1993); también se ha demostrado

que los glucanos inducen la secreción de óxido nítrico y Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Luongo et al., 1998).

Los glucanos se han usado como adyuvantes en la inmunización de ratones contra *Babesia microti* (Benach, 1982); además de ser capaces de incrementar la producción, tamaño y función de macrófagos y granulocitos (Burgaleta et al. 1978), incrementan la secreción de lisozima y TNF- α por macrófagos activados, la fagocitosis de antígenos, activan la formación de colonias de monocitos y granulocitos y la actividad de linfocitos T y B (Meira, 1996), asimismo estimulan la actividad hemopoyética (Patchen & McVittie, 1983).

El uso de β 1-3 glucano derivado de *Saccharomyces cerevisiae* en pollos en dosis de 10 y 15 mg/kg indujo una respuesta de anticuerpos a los eritrocitos de carnero (Benda. Et al.1989). También se ha observado que el β 1-3 glucano en pollos estimula la respuesta T inespecífica (Acevedo y Pedroso, 2001).

Además de las levaduras, en los últimos años se ha descrito el uso de bacterias ácido-lácticas con características probióticas (Bengmark, 1998) y funciones inmunomodulatorias (Isolauri et al., 2001; Meydani & Ha, 2000), que estimulan la inmunidad local y sistémica (Christensen et al., 2002; Delneste y col., 1998). Varias cepas de *Lactobacillus* se han reportado como estimuladoras *in vitro* en células del sistema inmune (Haller et al. 2000 a,b) y parece que, a partir de estos estudios, los efectos son específicos de cepa. Los trabajos de Ibnou-Zekri y col. (2003) con *L. johnsonii* y *L. paracasei* mostraron diferentes respuestas inmunes

sistémicas al medir los isotipos de IgG en ratones; así, mientras que *L. johnsonii* produjo niveles más altos de IgG1, *L. paracasei* indujo niveles superiores de IgG2a. Se ha observado que esta flora modifica la proporción de células CD4 y CD8 a favor de CD4 e incrementa la actividad fagocítica. Perdígón y col. (1995) al estudiar la respuesta inmune específica sistémica que *L. acidophilus*, *L. casei*, y *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* producían en contra de glóbulos rojos en ratones, informan de un incremento de la respuesta inmune sistémica a diferentes niveles de estimulación, siendo *L. casei* el más efectivo. Estos mismos autores observaron un incremento en la respuesta inmune no específica de células mononucleares fagocíticas.

La Anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa no contagiosa, transmitida principalmente por garrapatas y otros artrópodos hematófagos (Ristic 1960). El agente causal es *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) (Kocan y col., 2002). Esta es una bacteria intracelular obligada que causa una anemia hemolítica extravascular aguda en ausencia de hemoglobinemia y hemoglobinuria; induciendo fiebre superior a 40 °C, debilidad, pérdida de peso, anorexia, deshidratación, baja en la producción de leche y en casos más severos ictericia, abortos en el último tercio de la gestación y muerte. La enfermedad se manifiesta principalmente en bovinos, pero algunos ungulados silvestres como el bisonte americano (*Bison bison*), el búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) y el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) entre otros, pueden permanecer infectados en forma subclínica por periodos muy prolongados y actuar como reservorios del agente causal (Ristic, 1960; Kuttler 1984; de la Fuente y col., 2003). Esta

enfermedad es de gran importancia por las mermas que ocasiona a la ganadería de las regiones tropicales, subtrópicas, y esporádicamente en zonas templadas. Las estimaciones de las pérdidas económicas causadas por la Anaplasmosis bovina, aunque no son muy recientes, han mostrado un equivalente a lo que actualmente serían 130 millones de dólares (Delegación Mexicana, 1981) y en el año 1997 se responsabilizó a esta enfermedad de la muerte del 26% del total del ganado registrado para programas gubernamentales para el mejoramiento genético de hatos de baja productividad (García y col., 1998). Asimismo, se considera que debe existir un porcentaje similar de pérdidas no registradas en ganado movilizad fuera de programas gubernamentales o sin aseguradora.

El modelo actual de resistencia contra la Anaplasmosis bovina postula una respuesta inmune celular tipo Th1, con producción de interferón gamma (IFN γ), asociado con la producción de IgG2 y citocinas tales como interleucinas (IL)-2, IL-12 y factor de necrosis tumoral, con la consecuente producción de óxido nítrico, reactivo altamente tóxico para estos microorganismos (Brown y col., 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha indicado que los probióticos son principalmente útiles en condiciones de estrés. Es conocido como los métodos actuales en los sistemas de producción animal someten al ganado a un amplio rango de estímulos clasificados como estrés (Dantzer y Mormede, 1993) lo que conduce a incrementos en los niveles de corticosteroides, que a su vez disminuyen la respuesta inmune. Trabajos realizados para estudiar el comportamiento de la vacunación contra *A. marginale* han mostrado que se cuenta con un inmunógeno capaz de prevenir la muerte en confrontaciones con aislados patógenos. Un inmunógeno inactivado que se produce a partir de cuerpos iniciales de la rickettsia (Rodríguez *et al.*, 1999; 2000) ha probado su capacidad para evitar la muerte; sin embargo, también ha mostrado que no evita que los animales presenten una cierta pérdida de peso corporal y un descenso marcado del volumen celular aglomerado, durante la confrontación. Durán y Salazar (2000) en otro estudio donde se vacunó con una mezcla de cuerpos iniciales de tres aislados diferentes y confrontados con una cepa homóloga, observaron pérdidas de peso por grupo a la confrontación entre el 5.9% y 5.1%, con descensos de hematocrito de 56% y 61% con respecto al inicio de la confrontación. Asimismo, estudios usando un inmunógeno vivo con la cepa Yucatán (Méx.-31-096-01) clasificado como de baja virulencia (García y col., 2000), se indujo una protección del 78.2% contra la confrontación heteróloga (Ordáz, 2006); Con base en estos trabajos se decidió utilizar *A. marginale* como modelo para definir desde la perspectiva inmunológica el efecto de la administración oral de probióticos en bovinos ya que una respuesta inmune

robusta puede evitar pérdidas severas en presencia de estrés y agentes patógenos y con esto evitar una baja en su producción y la consecuente merma en las ganancias.

JUSTIFICACIÓN

Existen evidencias de ensayos clínicos controlados que muestran los efectos benéficos de los probióticos en cerdos (Lázaro y col., 2005), pollos, caballos (Medina y col., 2002) y animales de laboratorio; en el caso específico de bovinos se ha estudiado el uso de probióticos en términos de mejoras en la producción de leche antes y después del parto (Dann y col., 2002), así como disminución en la presentación de diarreas e incremento en la ganancia de peso durante la lactancia de terneros (Noeck y col., 2003), sin embargo, poco se ha abordado sobre su uso como inmunoestimulantes en esta especie, lo que hace necesario más ensayos para establecer la eficacia de los probióticos disponibles en el mercado, en la inmunoestimulación y su efecto en la resistencia e inmunidad a enfermedades. El propósito de este trabajo fue evaluar algunos parámetros inmunológicos y clínicos que determinen el efecto de los probióticos administrados por vía oral en la respuesta inmune específica de bovinos contra un agente infeccioso utilizando la rickettsia *Anaplasma marginale* como modelo para este ensayo.

El estudio sobre el uso de los probióticos como inmunoestimulantes abre la posibilidad de tener una alternativa de estrategia profiláctica al fortalecer la respuesta inmune en los animales; además, al ser administrados por vía oral se pueda tener una estimulación práctica reduciendo costos de equipo, mano de obra y del estrés mismo del manejo y, disminuir las pérdidas o incluso aumentar las ganancias ante la confrontación a microorganismos patógenos comunes del ganado.

HIPÓTESIS

La administración oral de *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis* con propiedades probióticas fortalece la respuesta inmune específica en bovinos contra la rickettsia *Anaplasma marginale*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la influencia de la administración oral de probióticos a bovinos de engorda sobre la respuesta inmune inducida por un inmunógeno contra la Anaplasmosis bovina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar la respuesta inmune de bovinos suplementados con probióticos, vacunados y confrontados con *Anaplasma marginale*.
- 2.- Evaluar clínicamente la influencia de los probióticos sobre la vacunación y confrontación contra *Anaplasma marginale*.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (CENID - FyMA)* y en el CENID en Parasitología Veterinaria** del INIFAP.

Se utilizaron 48 bovinos (*Bos taurus*) mayores de 9 meses de edad, libres de tuberculosis, brucelosis, babesiosis y anaplasmosis provenientes de una zona libre de dichas enfermedades. La verificación para tuberculosis y brucelosis se hizo por servicios certificados, por medio de las pruebas oficiales; la verificación para Anaplasmosis se realizó por medio del ensayo de ELISA indirecto y mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específico de acuerdo a lo publicado (de la Fuente y col., 2003).

Los animales se distribuyeron en dos grupos homogenizados por peso; el primer grupo fue inmunizado contra *A. marginale*, en tanto que el otro grupo no recibió inmunización alguna (Grupo Control). A su vez cada grupo fue subdividido en 4 subgrupos (sg): **SG 1** (2g de inclusión *Bacillus subtilis* / animal / día), **SG 2** (15g. de inclusión *Saccharomyces cerevisiae* cepa P7 / animal / día), **SG 3** (2g inclusión *Bacillus subtilis* + *S. cerevisiae* cepa P7 / animal / día) y **SG T** sin probióticos.

* Km. 1 de la carretera a Colón- Ajuchitlán, en Ajuchitlán, Querétaro; Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria (INIFAP)

** ubicado en el Km. 11.5 de la carretera Cuernavaca-Cuatla, en Jiutepec, Morelos; INIFAP

Grupo Inmunizado	Grupo Control
SGi 1 Bacillus Subtilis 2g/ animal / día	SGc 1 Bacillus Subtilis 2g/ animal / día
SGi 2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 15g/ animal / día	SGc 2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 15g/ animal / día
SGi 3 <i>B. Subtilis</i> + <i>S. cerevisiae</i> 2g + 15g/ animal / día	SGc 3 <i>B. Subtilis</i> + <i>S. cerevisiae</i> 2g + 15g/ animal / día
SGi T Sin Probióticos	SGc T Sin Probióticos

Cuadro 1.

SGi = Subgrupo Inmunizado **SGi T** = Subgrupo Inmunizado Testigo
SGc = Subgrupo Control **SGc T** = Subgrupo Control Testigo

Manejo.

A partir de su llegada, todos los animales recibieron una dieta común por 14 días (día -14) y subsecuentemente (día 0) fueron distribuidos, en forma individual, al subgrupo correspondiente. La administración de los aditivos (*S. cerevisiae* y/o *B. subtilis*) en el alimento se realizó diariamente, dependiendo del subgrupo, desde el día 0 y continuó hasta el fin del estudio.

Inmunógeno.

Para la inmunización de los animales del primer grupo se utilizó un inmunógeno inactivado derivado de cuerpos iniciales (CI) de las cepas: Yucatán, (Méx-31-096-01), Morelos (Méx-17-029-01) y Veracruz (Méx-30-193-01) de *A. marginale*, como se ha publicado (Rodríguez *et al.*, 2000; Barigye y col. 2004) a una dosis de 50 µg de proteína total en dos ocasiones, los días 21 y 35 respectivamente. Los animales también recibieron, el día 35, una dosis de 1×10^8 eritrocitos infectados de la cepa Yucatán, dicha cepa empleada como inmunógeno de baja virulencia (García y col., 2000) y capaz de inducir protección a la confrontación heteróloga (datos no publicados). Esta vacuna fue transportada en hielo seco al lugar de uso y descongelada en baño de agua al momento que fue usada. La sangre infectada fue diluida apropiadamente e inyectada vía subcutánea.

Confrontación.

Con objeto de tener una confrontación adecuada capaz de poner en peligro la vida de los animales inoculados, el día 78 recibieron por vía intramuscular, una dosis de 1×10^8 de eritrocitos infectados con la cepa Aguascalientes (Méx-01-01-01) de *A. marginale*, aislada a partir de un brote de campo en el Mpio. del mismo nombre.

Monitoreo.

Semanalmente, se tomaron muestras de suero y sangre completa para evaluar, las variables que más adelante se mencionan, además, una vez que los animales fueron confrontados y comenzó la aparición de los signos clínicos de la enfermedad, se registró la temperatura rectal y se tomaron muestras cada tercer

día para medir el volumen celular aglomerado (VCA) y determinar el porcentaje de células infectadas en frotis sanguíneo (PEI).

VARIABLES DE RESPUESTA:

EVALUACIÓN CLÍNICA.

-Temperatura rectal.

Se registró a la misma hora del día para evitar variaciones debidas a cambio de temperatura durante el día.

-Volumen celular aglomerado.

Fue medido por la técnica de microhematocrito y expresado como el porcentaje del volumen total

-Porcentaje de eritrocitos parasitados.

Este valor se derivó del conteo de por lo menos 500 eritrocitos en diferentes campos de cada frotis sanguíneo teñidos con Giemsa.

EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA

-Títulos de IgG específicas totales.

El ensayo indirecto de ELISA se llevó acabo usando un extracto de la cepa Yucatán como fuente de antígeno, usando diluciones 1:100 de los sueros

problema; anticuerpos de ratón anti IgG de bovino conjugados a fosfatasa alcalina en diluciones 1:40,000 para IgG totales; Los resultados fueron expresados como valores de densidad óptica obtenidos de la lectura a 405nm. (Rodríguez y col., 1999).

-Títulos de IgG1 e IgG2.

Estos fueron medidos por un ensayo de ELISA indirecto para cada inmunoglobulina como se ha descrito (Barigye y col., 2004). Se emplearon anticuerpos monoclonales de ratón anti IgG2 y anti IgG1 de bovino en diluciones 1:10,000 y anticuerpos de conejo anti IgG de ratón conjugados a fosfatasa alcalina en diluciones 1:10,000; el resto del proceso fue como se describió para IgG totales.

-Linfoproliferación.

El estado inmune fue monitoreado también mediante el ensayo de linfoproliferación (LP) *in vitro*, para este propósito, células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas por centrifugación en gradientes de densidad de Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham-Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia), fueron cultivadas en presencia de antígenos en medio de cultivo como se ha descrito (Rodríguez et al., 1996; Barigye y col., 2004). Las células, a una concentración de 5×10^6 /ml se cultivaron en placas de 96 pozos en un volumen final de 200 μ l con 2.5 μ g/ml de antígeno de *A. marginale* (Barigye y col, 2004). Pozos controles del mitógeno no específico, concanavalina (Con) A y extractos de GR no infectados fueron incluidos en cada ensayo. Las células se incubaron

durante 5 días en una atmósfera húmeda de 5% CO₂ a 37° C. La proliferación celular fue determinada mediante el uso de un paquete comercial (Cell proliferation ELISA system, Versión 2 Code RPN 250 Amersham-Pharmacia, Uppsala, Suecia) de acuerdo a las instrucciones del productor (Barigye y col., 2004).

-Producción de Interferón gamma.

CMSP de animales de cada grupo y seleccionados al inicio del experimento se cultivaron en presencia de antígeno tal y como se expuso en el párrafo anterior. El medio sobrenadante de estas células fueron usados en un ensayo comercial (Bovigam®, BIOCOR Animal Health, U.S.A) para la detección de IFN γ de acuerdo a las instrucciones del productor. Los resultados fueron expresados como valores de densidad óptica a 450 nm (Barigye y col., 2004).

-Poblaciones de linfocitos CD4 y CD8.

Las células involucradas en la respuesta inmune celular y que guían hacia un tipo u otro, son los linfocitos, de los cuales los CD4 son de tipo cooperador, a diferencia de los CD8 que son de tipo citotóxico. Es importante el analizar estas poblaciones en los animales vacunados y control así como en los que reciben el/los probióticos para determinar si hay cambios en las proporciones que se presentan durante el experimento. Células mononucleares de sangre periférica fueron marcadas con anticuerpos monoclonales específicos conjugados a fluoresceína y posteriormente cuantificadas en un citofluorómetro de acuerdo a lo descrito (Rodríguez *et al.*, 1996).

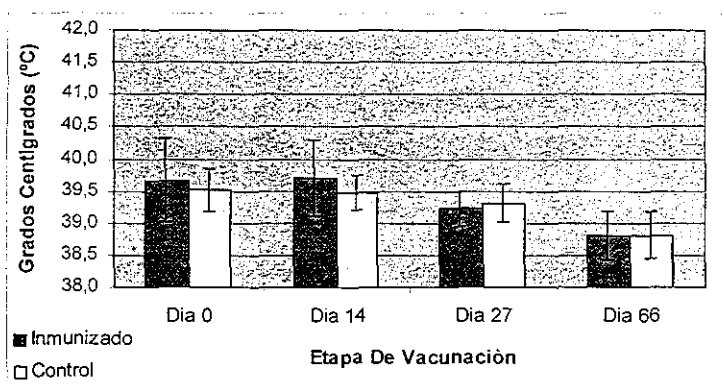
Análisis estadístico de variables de respuesta.

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza. Donde se determinó que existen diferencias, estas fueron analizadas por la prueba de mínimas diferencias significativas.

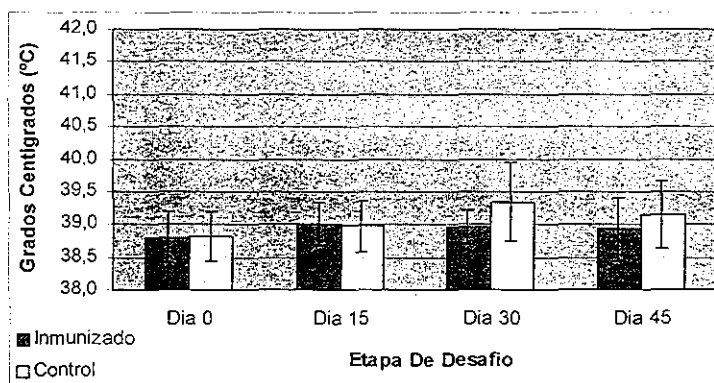
RESULTADOS

Temperatura rectal.

No se observaron diferencias significativas entre grupos durante las etapas de vacunación, en tanto que en el periodo de desafío hubo diferencias al día treinta (Grafica 1.1 y 1.2). No se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos de cada grupo en todas las etapas del estudio.



Grafica 1.1 Promedios de temperatura de la etapa de vacunación entre grupo el inmunizado y grupo control.



Grafica 1.2 Promedios de temperatura de la etapa de desafío entre grupo el inmunizado y grupo control.

Volumen Celular Aglomerado.

Todos los animales inmunizados mostraron un descenso en el VCA en la segunda etapa de vacunación debido a la multiplicación de la cepa Yucatán de *A. marginale* con la que fueron inmunizados (Grafica 2.1). El VCA promedio en esta etapa siempre se mantuvo por arriba del 20% y los subgrupos suplementados con probióticos restablecieron los valores originales de VCA con mayor rapidez que el subgrupo vacunado que no recibió probióticos durante las etapas de vacunación y desafío (Grafica 2.3 y 2.4). En cambio, todos los animales no inmunizados mantuvieron sus valores originales durante las etapas de vacunación.

En el periodo de desafío se observó una marcada diferencia ($p < 0.05$) entre el grupo inmunizado y el grupo control, con una media de descenso del 10% y 49% respectivamente (Grafica 2.2). En esta etapa, solamente el subgrupo inmunizado y suplementado con *Bacillus subtilis* llegó a registrar valores promedio de VCA ligeramente inferior a 30%, todos los demás subgrupos inmunizados mostraron VCA promedios superior a 30%; por su parte todos los subgrupos no inmunizados llegaron a mostrar valores promedios de VCA inferiores a 20%. Considerando la vacunación como única variable, los grupos vacunados fueron semejantes entre ellos pero diferentes de los no vacunados, quienes tampoco mostraron diferencias entre ellos durante el periodo de desafío.

Con el objetivo de evitar la muerte, se administró tratamiento con oxitetraciclinas (tres dosis de 20 mg/kg) a los animales que presentaron un hematocrito $\leq 14\%$; con este criterio fueron tratados 10 animales no inmunizados (2 del subgrupo

Bacillus subtilis, 3 del subgrupo levaduras, 3 del subgrupo *Bacillus subtilis*+*S. cerevisiae* y 2 del subgrupo no probióticos), en contraste solamente, un animal del grupo vacunado (subgrupo *Bacillus subtilis*) fue tratado.

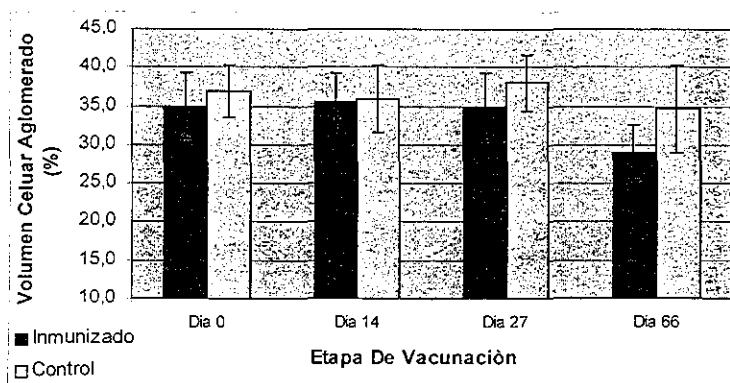


Grafico 2.1. Promedios del volumen celular aglomerado entre el grupo inmunizado y el grupo control durante la etapa de vacunación.

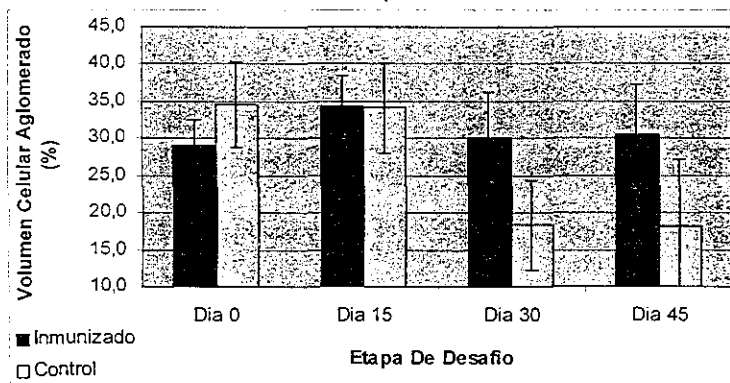
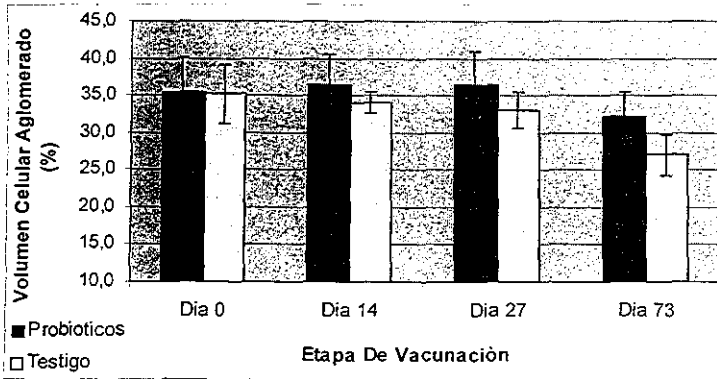
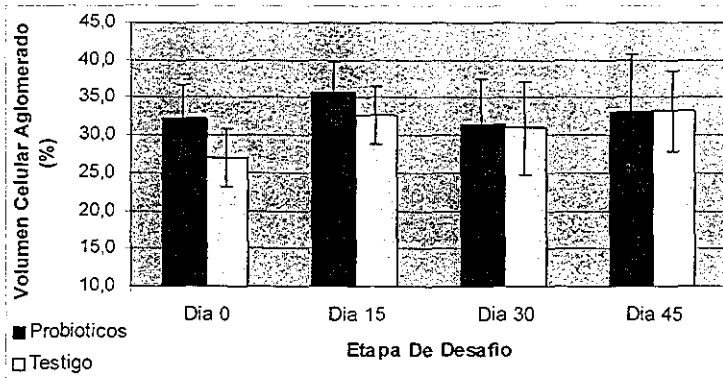


Grafico 2.2. Promedios del volumen celular aglomerado entre el grupo inmunizado y el grupo control durante la etapa de desafío.



Grafica 2.3. Promedios del volumen celular aglomerado entre los subgrupos suplementados con probióticos (SGi 1, SGi 2 y SGi 3) y el subgrupo testigo (SGi T) pertenecientes al grupo inmunizado durante la etapa de vacunación.



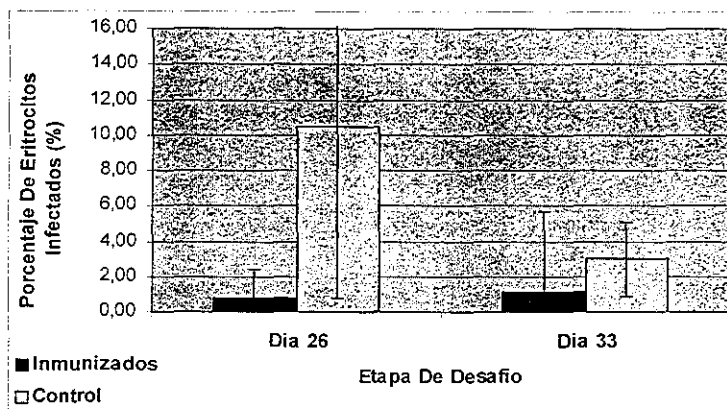
Grafica 2.4. Promedios del volumen celular aglomerado entre los subgrupos suplementados con probióticos (SGi 1, SGi 2 y SGi 3) y el subgrupo testigo (SGi T) pertenecientes al grupo inmunizado durante la etapa de desafío.

Porcentaje de eritrocitos parasitados.

La inmunización con la cepa Yucatán, condujo al establecimiento de una infección subclínica que se registró como presencia de la rickettsia en frotis en el 50% de los animales de grupo inmunizado a los treinta días después de la inoculación; una

semana después en el 100% de los animales inoculados. Los animales no vacunados se mostraron negativos a frotis hasta el momento del desafío.

Veintiséis días posteriores al desafío, todos los animales no inmunizados se observaron positivos a frotis (Grafica 3). Treinta y tres días después del desafío el grupo inmunizado presentó un PEI menor que el grupo no inmunizado ($p < 0.05$).

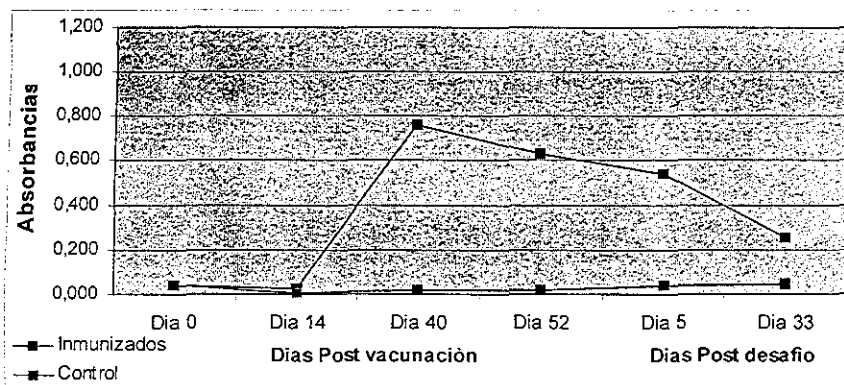


Grafica 3. Porcentaje de eritrocitos infectados entre el grupo inmunizado y el grupo control durante la etapa de desafío.

Títulos de IgG específicas totales

En el grupo inmunizado se observó un aumento inicial de IgG específicas totales catorce días después de la primera inoculación con el inmunógeno inactivado; cuarenta días después de la segunda inoculación con inmunógeno inactivado y a veintisiete días después de la inoculación con la cepa de baja virulencia se observó un segundo aumento de anticuerpos correspondiente a un segundo estímulo antigénico; este estímulo disminuyó cinco días después del desafío, sin embargo a los cuarenta días después del desafío la respuesta de anticuerpos

volvió a incrementarse en los animales inmunizados e inició la respuesta en los animales no vacunados (Grafica 4). Prácticamente en todas las etapas, la respuesta de anticuerpos específicos fue diferente ($p < 0.05$) entre los animales inmunizados y los no inmunizados independientemente de la suplementación con probióticos.

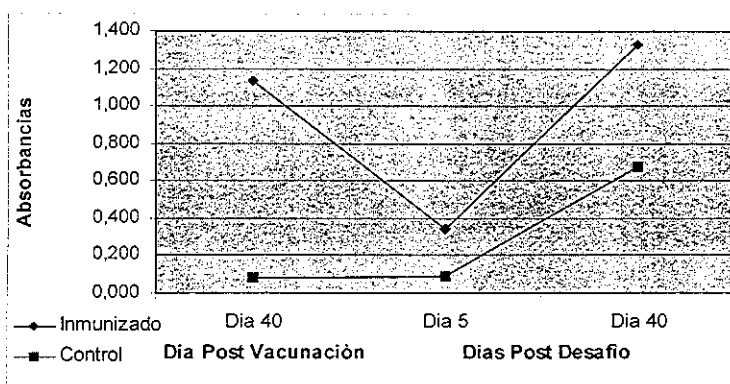


Grafica 4. Promedio de absorbancia de IgG totales entre el grupo inmunizado y el grupo control durante las etapas de vacunación y desafío.

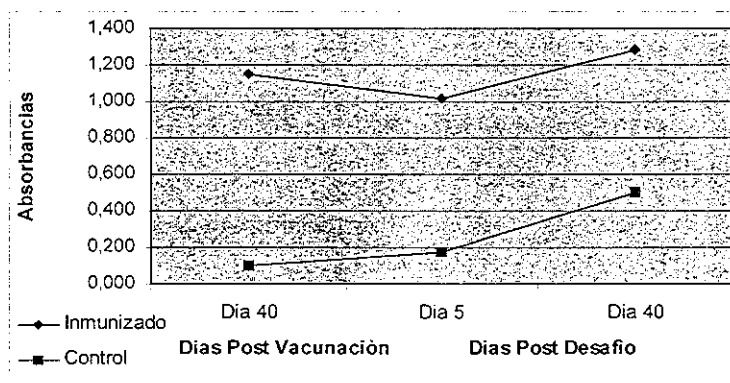
Títulos de IgG1 e IgG2.

Los valores de IgG1 en el grupo inmunizado mostraron diferencias ($p < 0.05$) al día veintisiete de la segunda inmunización con respecto al grupo control; dichos valores disminuyeron al día cinco pos-desafío, no obstante, la respuesta de anticuerpos IgG1 se incrementó nuevamente alrededor de los cuarenta días después del desafío, en tanto que el grupo no inmunizado inició la respuesta después del desafío (Grafica 5). En cuanto a la inmunoglobulina IgG2, el grupo inmunizado mostró una marcada diferencia ($p < 0.05$) al día cuarenta después de la vacunación; esta diferencia se mantuvo por el resto de la etapa de vacunación y

durante toda la etapa de desafío hasta terminar el estudio con respecto al grupo control que mostró un inicio de respuesta con anticuerpos IgG2 cuarenta días después del desafío (Grafica 6). No hubo diferencias estadísticas entre subgrupos tanto del grupo inmunizado como del grupo control.



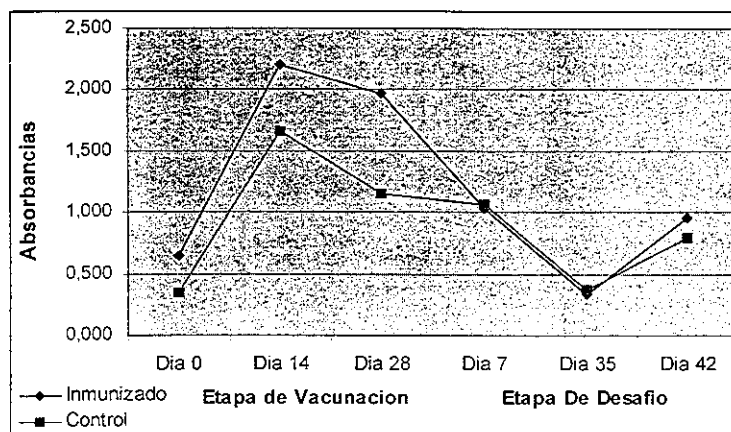
Grafica 5. Promedio de absorbancia de IgG 1 entre el grupo inmunizado y el grupo control durante las etapas de vacunación y desafío.



Grafica 6 . Promedio de absorbancia de IgG 2 entre el grupo inmunizado y el grupo control durante las etapas de vacunación y desafío.

Linfoproliferación.

El grupo de bovinos inmunizados presentó diferencias catorce días después de la primera etapa de vacunación y catorce días después de la segunda vacunación (Grafica 7). No hubo diferencias significativas durante el desafío entre subgrupos de cada grupo.

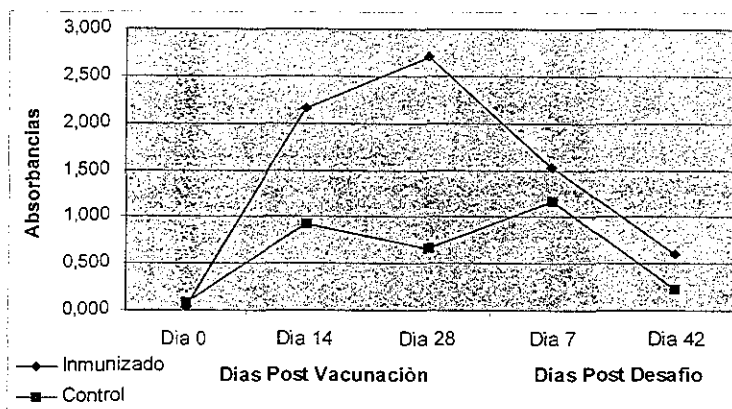


Grafica 7. Promedio de absorbancia de linfoproliferación entre el grupo inmunizado y el grupo control durante las etapas de vacunación y desafío.

Producción de Interferón gamma.

La estimación de $IFN\gamma$ en sobrenadantes de cultivos *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica mostró diferencias a los catorce días de la primera vacunación con inmunógeno inactivado entre los grupos de bovinos inmunizados y no inmunizados, de igual manera mostraron diferencias catorce días después de la segunda vacunación. Después del estímulo de las vacunaciones la producción de interferón fue disminuyendo, observándose diferencias hasta los treinta y cinco y, cuarenta y dos días después del desafío

entre el grupo inmunizado y el grupo no inmunizado respectivamente (Grafica 8). No hubo diferencias significativas entre subgrupos suplementados con probióticos y el subgrupo sin probióticos, tanto del grupo inmunizado como del grupo control.



Grafica 8. Promedio de absorbancia de interferón gamma entre el grupo inmunizado y el grupo control durante las etapas de vacunación y desafío.

Poblaciones de linfocitos CD4 y CD8.

No se encontraron diferencias significativas de poblaciones de células CD4 entre grupos, ni subgrupos en todas las etapas del estudio. En cuanto a poblaciones de células CD8 hubo una diferencia al día cuarenta y dos pos-desafío entre el grupo inmunizado y el grupo control; no se encontraron diferencias entre los subgrupos.

DISCUSIÓN

En el presente estudio el uso de probióticos como inmunomoduladores entre los animales inmunizados y no inmunizados no fue significativo ($p < 0.05$) para ninguna de las variables estudiadas. Sin embargo durante la segunda etapa de inmunización donde se usó la vacuna inactivada junto con la vacuna de baja virulencia, la cual estableció una infección vacunal, el grupo inmunizado presentó una recuperación más rápida del VCA en los bovinos que recibieron probióticos en comparación a los que no lo recibieron; en este mismo sentido, los animales vacunados y suplementados con *S. cerevisiae* no tuvieron necesidad de recibir tratamiento en el período de desafío, en contraste un animal vacunado del subgrupo suplementado con *B. subtilis* requirió tratamiento para evitar su muerte.

S. cerevisiae y *B. Subtilis*, entre otras bacterias con propiedades probióticas han demostrado extensamente el estímulo de la respuesta humoral innata en mucosas digestivas de bovinos, cerdos y aves (Ewaschuk y col., 2004; Letellier y col., 2000; Netherwood y col., 1999). Se ha demostrado que la administración oral de *S. cerevisiae* en bovinos ha disminuido la fiebre de embarque en novillas y la neumonía en terneros (Rubio y Figueredo, 1996); asimismo, en un ensayo donde se administró *S. cerevisiae* como suplemento alimenticio en bovinos en engorda, antes y durante a la vacunación con un inmunógeno experimental inactivado contra la Anaplasmosis bovina, aumentó la respuesta de anticuerpos específicos en los animales que recibieron la levadura activa, las respuesta entre los animales suplementados y no suplementados fueron diferentes y mostraron una tendencia,

aunque estadísticamente las diferencias no fueron significativas (García *et al.*, 2005). Las dosis de probióticos que se emplearon en el presente estudio son las mismas que se recomiendan para lograr un estímulo benéfico en vías digestivas; posiblemente para lograr un estímulo a nivel sistémico de la respuesta inmune se requiera aumentar la dosis; en este mismo sentido, la ausencia de respuesta en el presente estudio también se puede atribuir a que la mayoría de los trabajos de inmunomodulación sistémica emplean a bacterias y levaduras como adyuvantes mezclados con los inmunógenos.

Como ya se ha indicado anteriormente, los probióticos son especialmente útiles en situaciones de estrés; el presente estudio se llevo a cabo bajo condiciones controladas por lo que los animales prácticamente no estuvieron sometidos a situaciones de estrés más allá del manejo necesario para tomar las muestras, quizás si el ganado es expuesto a condiciones más desfavorables como en explotaciones tipo extensivas donde los animales están frecuentemente expuestos a un ambiente hostil, los probióticos brinden una respuesta significativa en la salud del ganado. Para mejorar la respuesta también se podrían evaluar otras vías aún poco exploradas y que no tengan altos costos de equipo, mano de obra y manejo (Ejemplo: vía nasal), tal como los trabajos de Duc y col. (2003), que al inmunizar contra la toxina del tétanos en conjunto con *S. cerevisiae* y *B. subtilis* por vía oral, nasal e intraperitoneal; obtuvieron resultados positivos por las tres vías al emplear una dosis 10 veces mayor de *B. subtilis* por vía oral que por vía nasal e intraperitoneal.

CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones del presente estudio, la administración oral de los probióticos *S. cerevisiae* y *B. subtilis* no proporcionó un estímulo adicional significativo en la respuesta inmune específica de los animales inmunizados, al no presentarse diferencias entre los subgrupos suplementados con probióticos y el subgrupo testigo.
- La administración oral de *S. cerevisiae* y *B. subtilis* tampoco proporcionó un estímulo adicional significativo en la respuesta inmune innata en los animales del grupo control al no presentarse diferencias durante la etapa de desafío entre los subgrupos suplementados con probióticos y el subgrupo control testigo.
- El modelo de vacunación contra *A. marginale* usado en el presente estudio indujo estímulos inmunológicos correspondientes a las dos inmunizaciones, también se observó el período de infección por parte de la cepa de baja virulencia y el estímulo inmunológico correspondiente al período de desafío, de esta forma se constataron las diferencias entre el grupo inmunizado y el grupo control, razón por la cual se propone el empleo del modelo de vacunación contra *A. marginale* para evaluar el estímulo de probióticos y adyuvantes en la respuesta inmune humoral y celular en infecciones intraeritrocíticas de bovinos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abel G, Czop JK. 1990. Activation of human monocyte GM-CSF and TNF-alpha. Production by particulate yeast glucan. International Congress for Infectious Diseases. Montreal, Canada.
- 2) Acevedo AM., Pedroso M., Miranda I. 2001. β 1-3 glucano. Influencia sobre la inmunidad mediada por células en pollos jóvenes. Rev. Cubana de Ciencia Avícola, 25: 107 – 112.
- 3) Barigye, R., García-Ortiz, M.A., Rodríguez, S.D. 2004. Identification of IgG2 specific antigens in three Mexican strains of *Anaplasma marginale*. Tec. Pecu.Mex.; 42:219-236.
- 4) Bautista GCR, Pedraza AG, Rosenstein AY, Ontiveros FJ. 2003. Estudio de la respuesta inmune humoral y celular en la infección y reinfección experimental de bovinos con *Anaplasma marginale*. Vet Mex; 34 (3).
- 5) Bautista GRC, Angeles I, Garcia OMA, Garcia TD, Soto C, Montaña ELF. 2000. Variation of Peripheral blood BoCD2+, BoCD4+ and BoCD8+, lymphocytes, the BoCD4:BoCD8 index and IgG antibodies in bovines infected and re-challenged whit isolates of *Anaplasma marginale* of Mexican origin. Revista Latinoamericana.; 42:101-109.
- 6) Benach JL. 1982. Glucan as an adjuvant for a mutine *Babesia microti* immunization trial. Infection and Immunity; 35:947-951.
- 7) Benda; Pretrovsky E; Hampel A; Kalova J. 1989. Glucan stimulates the antibody response to a T- dependent antigen in chickens. Acta Vet. Brno; 58:345-351.

- 8) Bengmark S. 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 42:2-7.
- 9) Brown WC, McGuire TC, Mwangi W, Kegerreis KA, Macmillan H, Lewin HA, Palmer GH. 2002. Major histocompatibility complex class II DR-restricted memory CD4(+) T lymphocytes recognize conserved immunodominant epitopes of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a. *Infect Immun.*; 70: 5521-32.
- 10) Burgaleta MC, Territo CQ, Quan CG, Gaiden DW. 1978. Glucan activated macrophages: functional characteristics and surface morphology. *J Reticuloendothel Soc*; 23:195-204.
- 11) Christensen H, Frokiaer RH, Pestka JJ. 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol*; 168:171-178.
- 12) Dann HM, Drackley JK, McCoy GC, Hutjens MF, Garrett JE. 1983. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. *J Dairy Sci.* 2000 Jan (1): 123-7.
- 13) Dantzer R., Mordeme P. El stress en la cría intensiva del ganado. Editorial Acribia ISBN: 84-200-05-0536-3
- 14) De La Fuente J, Golsteyn Thomas EJ, van den Bussche RA, Hamilton RG, Tanaka EE, Druhan SE, Kocan KM. 2003. Characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. *Appl Environ Microbiol.*; 69(8):5001-5.

- 15) Delegación Mexicana. 1981. Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. Bull. Off. Int. Epiz. ; (5-6): 903-905.
- 16) Delneste Y, Donnet-Hughes A, Schiffrin EJ. 2002. Functional foods : mechanisms of action on immunocompetent cells. Nutr Rev; 168:171-178.
- 17) Duc LH, Hong HA, Fairweather N, Ricca E, Cutting SM. Bacterial Spores as Vaccine Vehicles. *Infect Immun*. 2003 May; 71(5): 2810-2818.
- 18) Durán M, Salazar E. 2000. Evaluación de una vacuna experimental contra *Anaplasma marginale* bajo una confrontación en condiciones controladas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro.
- 19) Ewaschuk JB, Naylor JM, Chirino-Trejo M, Zello GA. 2004 Oct; *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. *Can J Vet Res*. 68(4): 249-253.
- 20) García O., MA.; Angeles O., LE. Hernández S., G. García T., D., Aboytes T., R. y Rodríguez C., S.D. 1998. Caracterización de la virulencia de un aislado mexicano de *Anaplasma marginale*. *Téc. Pécu. Méx.*; 36 (3): 197-202.
- 21) García OMA, Rojas REE, Preciado TJF, García E, Bernal SG, Cantó AGJ, Rodríguez CSD. 2005. Efectos de *Saccharomyces cerevisiae* proporcionada vía oral en la inmunidad conferida por una vacuna inactivada contra la anaplasmosis bovina. XXIX Reunión Anual de Buiatría.

- 22) García OMA, Rojas REE, Preciado TJF, Gómez GA, AGI, Rodríguez CSD. 2004. Control y Tratamiento de la anaplasmosis bovina. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria Publicación Técnica No 1. Oct. ISBN 968-5580-50-2.
- 23) Haller D, Blum S, Bode C, Hammes WP, Schiffrin EJ. 2000. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria *in vitro*: evidence of NK cells as primary targets. *Infect Immun*; 68:752-759.
- 24) Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ, Blum S. 2000. Non pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocytes co-cultures. *Gut*; 47:79-87.
- 25) Hooper LV, Gordon JI. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*;292:1115-1118.
- 26) Ibnou-Zekri N, Blum S, Schiffrin E, von der Weid T. 2000. Different patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:444-450. Meydani SN, Ha WK. Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr*; 71:861-872.
- 27) Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, Salminen S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr*;73:444-450.
- 28) Kocan KM, De La Fuente J, Guglielmone AA, Melendez RD. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* Infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct p. 698-712.

- 29) Koji N, Yun-Gi K, Toshihisa O, Takuya T, Akira K, Teruo Y, Nobuhiko O, Hirofumi D. 2006. Probiotic *Lactobacillus casei* activates innate immunity via NF- κ B and p38 MAP kinase signalling pathways. *Microbes and infection* 8-994-1005.
- 30) Kuttler KL, Zaugg JL, Johnson LW. 1984. Serologic and clinical responses of premunized, vaccinated, and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. *Am J Vet Res.* Nov; 45(11):2223-6.
- 31) Lázaro D., Fernando Carcelén C., Marlon Torres A. y Miguel Ara G. 2005. Efecto de probióticos en el alimento de marranas sobre los parámetros productivos en lechones. *Rev. Int. Vet. Perú* 16 (2):97-102
- 32) Letellier A, Messier S, Lessard L, Quessy S. 2000. Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine. *Can J Vet Res.* Jan; 64(1): 27-31.
- 33) Luongo C, Imperatore F, Cuzzocrea S, Filippelli A, Scafuro MA, Mangoni G, Portolano F, Rossi F. 1998. Effects of hyperbaric oxygen exposure on a zymosan-induced shock model. *Crit Care Med* Dec; 26(12):1972-6
- 34) Medina B, Girard ID, Jacotot E, Jullian V. 2002. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial and fermentation patterns in the large intestine of horses fed and high fiber or a high starch diet. *J. Anim Sci.* 80:2600-2609.
- 35) Meira DA. 1996. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidiomycosis. *Am J Trop Med Hyg* ;55:496-503.

- 36) Netherwood T, Gilbert HJ, Parker DS, O'Donnell AG. 1999 Nov. Probiotics Shown To Change Bacterial Community Structure in the Avian Gastrointestinal Tract. *Appl Environ Microbiol.*; 65(11): 5134-5138.
- 37) Meydani SN, Ha WK. 2000. Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr.* 71:861-872.
- 38) Noeck JE, Kautz WP, Leedle JA, Block E. 2003. Direct-fed microbial supplementation on the performance of dairy cattle during the transition period. *J Dairy Sci.* Jan; 86(1):331-5.
- 39) Ordaz CXA. 2006. Evaluación clínica de bovinos inmunizados con una cepa mexicana congelada de baja virulencia de *Anaplasma marginale*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro.
- 40) Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*;82:279-289
- 41) Patchen ML, McVittie TJ. 1983. Temporal response of murine pluripotent stem cells and myeloid and erithroid progenitor cells to low dose glucan treatment. *Acta Hemat*;70:281-288.
- 42) Pelizon AC, Kaneno R, Soares AM, Meira DA, Sartori A. 2003. Down-modulation of lymphoproliferation and interferon-gamma production by beta-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Dec;98(8):1083-7.
- 43) Perdígón G, Alvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobbato N. 1995 Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci*;78:1597-1606.

- 44) Perdigón G, Alvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobbato N. 1995. Immune system stimulation by probiotics. Symposium: Probiotic Bacteria for Humans: Clinical Systems for Evaluation of Effectiveness. J Dairy Sci b;78:1597-606.
- 45) Reis e Sousa C, Stahl PD, Austyn JM: 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. J Exp Med Aug 1;178(2):509-19.
- 46) Ristic, M. 1960. Anaplasmosis. Adv. Vet. Sci. 112-116.
- 47) Rodríguez SD, García Ortiz MA, Hernández Salgado G, Santos Cerda NA, Aboytes Torres R, Canto Alarcon GJ. 2000. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 23(4):239-52.
- 48) Rodríguez SD, Palmer GH, McElwain TF, McGuire TC, Ruef BJ, Chitko-McKown CG, Brown WC. 1996. CD4+ T helper lymphocyte responses against *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein-1. Infect Immunol;64:2079-2087.
- 49) Rodríguez, S.D., García, M.A., Cantó, G.J., Hernández, G., Santos, N.A., Aboytes, R. 1999. Ensayo de un inmunógeno experimental inactivado contra *Anaplasma marginale*. Tec. Pecu. Mex.;37(1):1-12.
- 50) Rubio; M. Pedroso, J M. Figueredo. 1996. Evimunk: Beta 1-3 glucano: Prevención de la neumonía de terneros en cría artificial. Rev. Salud Anim. 18 163-165.
- 51) Sorenson WG, Shahan T, Simpson J, 1998. Cell wall preparations from environmental yeasts: effect on alveolar macrophage function in vitro. Ann Agric Environ Med Jun 30;5(1):65-71.

- 52) Teitelbaum JE, Walter WA. 2002. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr*; 22:107-138
- 53) Xu J, Gordon JI. 2003. Honor thy symbionts. *PNAS*; 100:10452–10459.

ANEXOS

GRUPO	Subgrupo	Primera Vacunación			Segunda Vacunación			Desafío		
		Media más BAJA de VCA (%)	Media más ALTA de temp (°C)	Media MAXIMA de Parasitemia (%)	Media más BAJA de VCA (%)	Media más ALTA de temp (°C)	Media MAXIMA de Parasitemia (%)	Media más BAJA de VCA (%)	Media más ALTA de temp (°C)	Media MAXIMA de Parasitemia (%)
Inmun.	SG 1	36	39,6	--	26	39,6	0,2	29	39,1	3,6
	SG 2	36	39,5	--	25	39,7	0,3	31	39,4	1,6
	SG 3	38	40,2	--	26	39,5	0,3	31	39,3	0,6
	SG T	34	39,7	--	24	40	0,2	30	39	1,1
Control	SG 1	35	39,4	--	32	39,3	--	20	39,6	10,9
	SG 2	36	39,4	--	32	39,5	--	17	39,7	12,3
	SG 3	37	39,4	--	34	39,3	--	19	39,4	9,6
	SG T	38	39,7	--	36	39,5	--	19	39,7	9,9

Cuadro 2. Tabla de valores críticos de los parámetros utilizados en la evaluación clínica durante las etapas de vacunación y la etapa de desafío entre los grupo inmunizado y el grupo control incluyendo los subgrupos suplementados con probióticos y subgrupos testigo.