

ESTABLECIMIENTO DE LA TÉCNICA SEROLÓGICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (I.F.I.) COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LA BABESIOSIS BOVINA EN EL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO DE LA POLICLÍNICA VETERINARIA DE L.U.Z.

Stablishment of indirect immunofluorescent antibody (I.F.A.) test for the diagnosis of bovine babesiosis at the Veterinary Polyclinic of the University of Zulia (L.U.Z.) Venezuela

Aníbal R. Basalo S.*
Omaira Parra M.*
Cruz M. Arraga de Alvarado*
Edgar León**
Ana Guillén**

* Unidad de Investigaciones Clínicas
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

** Instituto de Investigaciones Veterinarias
CENIAC-FONAIAP-MAC
Maracay, Estado Aragua, Venezuela.

RESUMEN

Se logró establecer la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (I.F.I.) en el Laboratorio de Diagnóstico Clínico de la Policlínica Veterinaria Universitaria de la Universidad del Zulia, para el diagnóstico de la Babesiosis bovina (*Babesia bigemina*). Un becerro esplenectomizado fue inoculado con dos estabilizados de *B. bigemina*, evaluándose diariamente los parámetros hematológicos y el grado de parasitemia a través de frotis convencional y frotis de capa blanca. Cuando la parasitemia alcanzó un valor de 7%, se procedió a la elaboración de 2.070 frotis antígenos. La técnica se estandarizó utilizando un conjugado comercial a la dilución de 1:40. Con la finalidad de detectar animales positivos y negativos a *B. bigemina*, se muestrearon 74 bovinos, realizándose frotis convencionales, frotis de capa blanca y la prueba de I.F.I. Se determinó que con el frotis convencional el 4% de las muestras resultaron positivas a *B. bigemina*, mientras que con el frotis de capa blanca este valor fue de 6.75%. Con la técnica de I.F.I. a la dilución de 1:80, el 100% de las muestras fueron positivas y a la dilución 1:160 el 71.6% resultaron positivas y el 28.4% negativas. Se reportan los valores hematológicos obtenidos en el estudio.

Palabras claves: Bovinos, Babesiosis, diagnóstico, I.F.I.

ABSTRACT

In order to perform the diagnosis of *Babesia bigemina*, the Indirect Fluorescent Antibody test (I.F.A.) was established in the Clinical Diagnostic Laboratory at the University Veterinary Polyclinic of the University of Zulia. An splenectomized calf was inoculated with two *Babesia bigemina* stabilized. Clinical and hematological tests, standard smear and buffy coat blood smear were done daily and 2070 antigen smears were made when parasitemia reached 7%. Commercial conjugate at 1:40 dilution was used to standardized the technic. In order to detect cattle negative and positive to *B. bigemina*, 74 animals from three farms of Zulia State were tested with standard and buffy coat blood smear and with the I.F.A. test. Through standard smear, 4% of the animals were positive to *B. bigemina* and with buffy coat blood smears 6.75% were positive. When I.F.A. test was used, 100% of the serum samples were positive at 1:80 dilution and 71.6% at 1:160 dilution. Hematologic results during study are reported.

Key words: Bovines, Babesiosis, diagnosis, I.F.A.

INTRODUCCIÓN

La Babesiosis bovina (piroplasmosis, ranilla, fiebre de Texas, tristeza, fiebre de la garrapata, agua roja, esplenetis),

es una enfermedad hemotrópica diseminada por el país, transmitida por la garrapata *Boophilus microplus*. Los agentes etiológicos de ésta enfermedad son dos especies de protozoarios sanguíneos: la *Babesia bovis* (Babes 1888) y *Babesia bigemina* (Smith y Kilbourne 1893).

Desde 1893 se demostró la enfermedad en mamíferos [19] causada por diferentes especies de babesias, distribuidas en diferentes partes del mundo. [16]

La *B. bovis* y la *B. bigemina* se encuentran ampliamente distribuidas en países, entre los 40° latitud Norte y 32° latitud Sur [16], lo cual corresponde a la distribución de sus vectores, las garrapatas *B. microplus* y *B. annulatus*.

En la mayoría de los países, incluyendo el nuestro, la enfermedad es causada principalmente por *B. bovis*, no así en África donde la infección por *B. bigemina* es considerada de mayor importancia [18]. Ambas especies se encuentran ampliamente distribuidas en territorio venezolano [3,30], y se reconoce como vector a la garrapata *B. microplus* [28].

Toro y col. [25] utilizando la técnica de I.F.I. muestrearon 2.240 bovinos adultos de diferentes zonas del país, para conocer la prevalencia de la enfermedad, demostrando que la misma está ampliamente distribuida, no encontrándose áreas libres de babesiosis. También observaron que tanto el ganado de carne como el de leche se ve afectado por esta enfermedad.

Los síntomas clínicos de la Babesiosis han sido descritos por muchos autores [7, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 26]. En estado agudo, uno de los signos más comunes de la enfermedad es la presencia de fiebre, la cual coincide con el incremento de la parasitemia [16]; después la temperatura se normaliza y el animal queda como portador crónico por años [15].

El ganado *Bos indicus* es más resistente a la Babesiosis [6, 9, 12] y las garrapatas [27, 29] que las razas *Bos taurus*. Esto puede ser un criterio de importancia en la selección de ganado a ser importado para el desarrollo de un propósito específico.

El diagnóstico de esta enfermedad en nuestro país se basa, en la mayoría de los casos, en la sintomatología clínica y la observación del agente etiológico en frotis de sangre periférica y sangre capilar teñidos con coloración de Wright-Giemsa.

En los últimos años se han desarrollado métodos serológicos encaminados a detectar la infección por *Babesia spp.*, mediante la demostración de anticuerpos específicos [24] utilizando técnicas como: fijación de complemento (Mahoney 1962), precipitación en agar gel (Mahoney y Goodger 1969), inmunofluorescencia directa e indirecta (Ross y Lörh 1968), hemaglutinación directa e indirecta (Curnow y Curnow 1967), aglutinación capilar (Lörh y Ross 1969), aglutinación en placa (Curnow 1973), prueba de aglutinación en tarjeta para la Babesiosis (Todorovic y Kuttler 1974), aglutinación rápida en latex (López y Todorovic 1978), test de ELISA (Purnell y col. 1976) [4].

Las pruebas serológicas como las ya mencionadas, se basan en la detección de anticuerpos presentes en el suero sanguíneo y nos permiten determinar si el animal ha sido expuesto al agente. De estas pruebas la Inmunofluorescencia Indirecta (I.F.I.) es una de las más sensibles [5, 8, 10, 13, 17, 21, 22].

Al analizar la reacción antigénica entre *B. argentina*, *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* con la técnica de I.F.I., se observaron reacciones cruzadas entre ambos géneros [13].

En Cuba se realizaron trabajos para comparar la técnica de I.F.I. y otras técnicas serológicas, con la observación de frotis sanguíneos teñidos por el método de Giemsa, en un muestreo de 4878 animales afectados en forma aguda y crónica con *B. argentina* y *B. bigemina*. Se pudo detectar a través de la técnica de I.F.I. un porcentaje significativo de reactores positivos para la *B. argentina* (12.9%) en infecciones agudas y de 6.1% en infecciones crónicas, mientras que la parasitemia detectada microscópicamente en frotis teñidos con Giemsa fue de 1.7% en casos agudos y 0.04% en casos crónicos. Para *B. bigemina* el porcentaje de reactores positivos fue de 20% en la fase aguda y en casos crónicos 12.2%. La parasitemia detectada por frotis sanguíneos teñidos fue de 8.8% en casos agudos y 0.8% en casos crónicos, determinando que los animales portadores asintomáticos eran considerados erróneamente como no afectados de babesiosis. La prueba de I.F.I. permitió detectar animales portadores durante un tiempo aproximado de 3-4 años [20].

Posteriormente se realizó un estudio similar en rebaños parasitados o no por garrapatas para determinar la efectividad de la técnica de I.F.I. como método diagnóstico en infestaciones sub-clínicas. En este estudio se detectaron 29% de reactores positivos para *B. bovis* y 35% para *B. bigemina* a través de la técnica de I.F.I. y de un 2% para *B. bovis* y de un 3% para *B. bigemina* en frotis teñidos con Giemsa en rebaños afectados por garrapatas. En los rebaños no afectados por garrapatas se obtuvo a través de la técnica de I.F.I. un 1.5% de positividad para *B. bovis* y de un 4% para *B. bigemina*, no observándose los agentes en frotis teñidos de sangre periférica [1].

Esta técnica se ha usado para establecer la prevalencia de la enfermedad en muchas zonas del mundo. En Guyana se determinó la prevalencia serológica de la babesiosis bovina mediante la técnica de I.F.I., obteniéndose un 61% de positividad para *B. bovis* y un 80% para *B. bigemina* en el ganado nativo [2]. En Brasil utilizaron antígenos de cepas autóctonas, detectándose un 97.9% de positividad para *B. bovis* y de un 100% para *B. bigemina* [14].

Toro y col. [25] utilizando la técnica de I.F.I. estudiaron la seroprevalencia de la Babesiosis en las principales zonas ganaderas del país obteniendo un 45.2% de positividad para *B. bigemina*. [25]

Actualmente en nuestro país esta técnica es utilizada en el Estado Aragua (Universidad Central de Venezuela y en el Instituto de Investigaciones Veterinarias), en el Distrito Federal (Universidad Simón Bolívar) y en el Estado Lara (Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado), logrando importantes estudios epidemiológicos en las zonas de influencia y en el resto del país.

Hasta ahora en el Laboratorio de Diagnóstico Clínico de la Policlínica Veterinaria Universitaria de L.U.Z, se realiza el diagnóstico con frotis sanguíneos teñidos con coloraciones rápidas como Diff Quick Stain. Se realizan frotis sanguíneos a partir de sangre capilar (tomada de punta de cola y oreja) o sangre venosa tomada de la vena yugular y preservadas en EDTA como anticoagulante. A partir de esta sangre se realizan frotis normales y frotis de capa blanca utilizando la técnica de microhematocrito. La Babesia se podrá observar dentro de los eritrocitos en la fase aguda de la enfermedad cuando la parasitemia es alta, no así en la fase crónica o sub-clínica donde la parasitemia es baja o inexistente.

Era necesario entonces que en una zona ganadera como es la del Estado Zulia, se tuviera a disposición métodos confiables que nos permitieran hacer un diagnóstico de la situación de los agentes hemotrópicos en nuestras fincas y establecer una línea de investigación en esta área tan importante para la salud animal nacional y mundial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de frotis antígenos y técnica de I.F.I.

Se realizó siguiendo la metodología descrita por León [11]. Se esplenectomizó un becerro de 6 meses de edad y se inoculó con una cepa de *B. bigemina*. Diariamente el animal fue evaluado a través del examen clínico y hematológico, incluyendo frotis sanguíneos convencionales y de capa blanca [23] teñidos con la coloración rápida Diff Quick Stain (Harleco-Puerto Rico) para determinar el porcentaje de parasitemia en el animal. Cuando la parasitemia alcanzó un valor de 7%, se procedió a la obtención de 400 ml de sangre. Esta fue desfibrinada con perlas de vidrio y centrifugada a 3.000 r.p.m. por 15 min a 12°C. Se retiró el plasma y la capa blanca de leucocitos y plaquetas con un succionador. Se realizaron tres lavados del paquete celular con P.B.S. pH 7.2; culminado este proceso el paquete celular fue resuspendido en P.B.S. pH 7.2 conteniendo 1.75% de sero albúmina bovina. Con ello se realizaron frotis sanguíneos delgados en láminas portaobjetos, los cuales fueron secados y envueltos individualmente en papel bond, y almacenados en bolsas plásticas a -20°C. Un total de 2070 frotis antígenos fueron elaborados con fines diagnósticos.

Recolección de las muestras

Setenta y cuatro muestras de sangre entera (en tubos con anticoagulante EDTA) y suero sanguíneo, se obtuvieron

de bovinos adultos mestizos de tres fincas del Estado Zulia; Mompo (Municipio Jesús Enrique Lossada), San Rafael (Municipio Machiques de Perijá) y Cambalache (Municipio Miranda), todas pertenecientes a una zona de Bosque Seco Tropical.

Procesamiento de las muestras

La sangre completa (con anticoagulante) fue evaluada en un analizador hematológico automático (Cell Dyn 400) y a cada muestra se le realizaron dos frotis sanguíneos, uno convencional y otro de capa blanca [23], los cuales fueron teñidos con una coloración de Diff Quick Stain y observados en un microscopio de luz en objetivo de inmersión (100 X), para detectar *B. bigemina* en los eritrocitos.

Se realizó la dilución de los sueros problemas (1:40, 1:80 y 1:160 en P.B.S pH 7.2) y de los controles positivos y negativos.

Se utilizó un conjugado comercial de anti-inmunoglobulina G bovina de conejo con Isotiocianato de fluoresceína (Sigma Inmuno Chemicals), diluido con P.B.S. pH 7.2, a las diluciones 1:25, 1:30, 1:40 y 1:50. Se procedió a la titulación de las mismas, escogiéndose la dilución 1:40 como la dilución de trabajo.

Se realizó el montaje de la prueba, utilizando diluciones de los sueros problemas (1:80 y 1:160), mientras que los controles negativos y positivos, fueron diluidos solo a 1:80.

Los frotis fueron observados en un cuarto oscuro utilizando un microscopio de fluorescencia con lámpara de mercurio.

Los sueros problemas positivos eran aquellos donde las *B. bigemina* fluorescían de color verde brillante, mientras que los sueros negativos no exhibían fluorescencia o la misma era opaca.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico S.A.S.; se determinó el máximo, mínimo, medias, desviaciones estándares, distribución de frecuencia y la prueba Z para comparación de proporciones.

RESULTADOS

De las 74 muestras sanguíneas procesadas, 3 de ellas (el 4%) fueron positivas a *B. bigemina* a la observación del frotis convencional FIG. 1 y el resto negativas.

Se elaboraron 2070 frotis sanguíneos de *Babesia bigemina* con un grado de parasitemia de 7% y con un Volumen Globular de 23%. Luego de seis horas de la elaboración de los frotis antígenos, los valores experimentaron una disminución, (parasitemia= 4.76% y Hct= 18%). Al siguiente día la parasitemia había disminuido a 0.14% y el Volumen Globular a 14%. Estos frotis, almacenados a -20°C, resultaron óptimos a la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (I.F.I.).

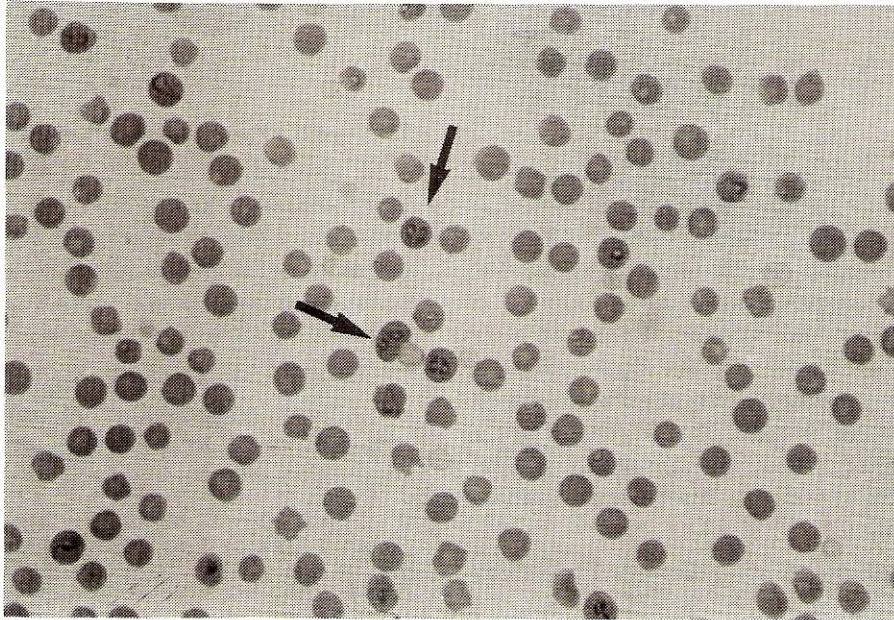


FIGURA 1. ERITROCITOS INFECTADOS CON *B. bigemina*, COLORACIÓN DIFF QUICK STAIN. 1200X.

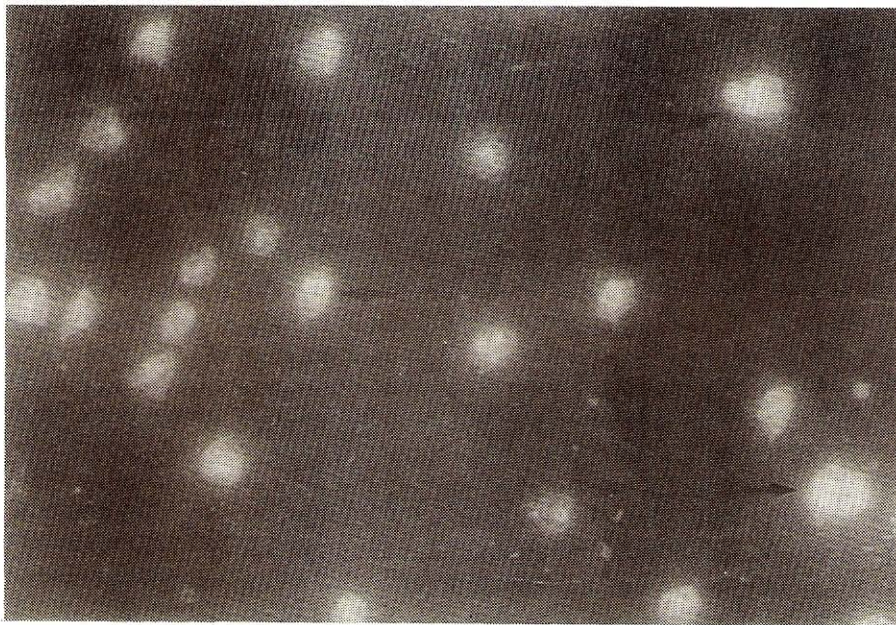


FIGURA 2. SUERO POSITIVO A *B. bigemina*, EN LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (I.F.I.). 1200X.

La técnica fue aplicada a 74 muestras de suero sanguíneo de bovinos y mostró fluorescencia verde brillante en las muestras con anticuerpos contra *B. bigemina*, FIG. 2. Con los sueros controles positivos, *B. bigemina* mostró fluorescencia igualmente de color verde brillante, mientras que los controles

negativos no exhibieron fluorescencia o presentaron un color verde manzana opaco, FIG. 3.

Las tres muestras positivas al frotis convencional, resultaron positivas a la técnica de I.F.I. a las dos diluciones (1:80 y 1:160), mientras que de las 71 muestras negativas al frotis

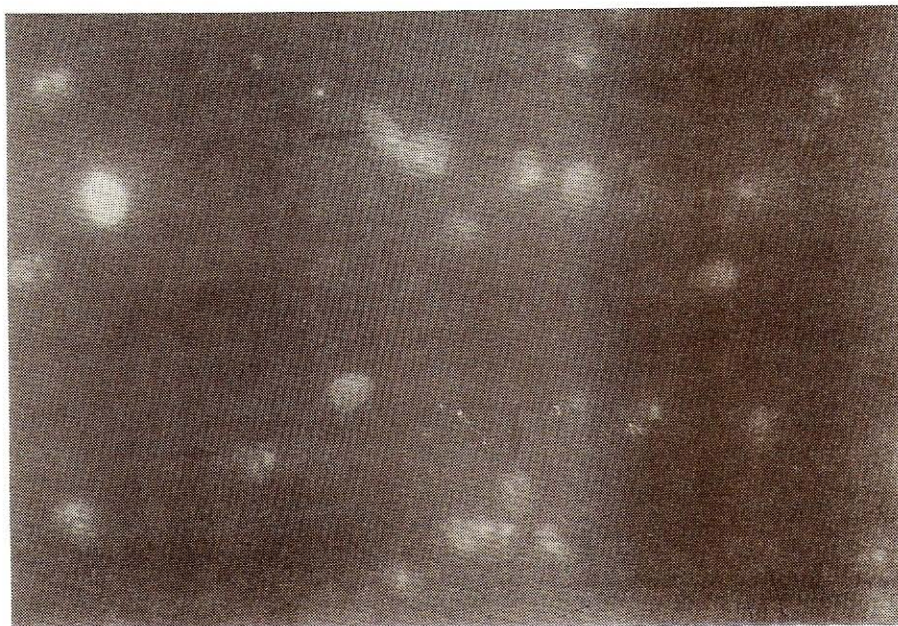


FIGURA 3. SUERO NEGATIVO A *B. bigemina* EN LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (I.F.I.) 1200X.

TABLA I

COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE FROTIS SANGUÍNEO CONVENCIONAL Y LA TÉCNICA DE I.F.I. EN EL DIAGNÓSTICO DE BABESIOSIS BOVINA (*B. bigemina*)

	Técnica de I.F.I.				Total
	Dilución 1:80		Dilución 1:160		
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Positivo	3 (4%)	-	3 (4%)	-	3 (4%)
Frotis Convencional					
Negativo	71 (96%)	-	50 (67,5%)	21 (28,3%)	71 (96%)
Total	74 (100%)	-	53 (71,6%)	21 (28,3%)	74 (100%)

convencional, el 100% resultó positivo a la técnica de I.F.I. a la dilución 1:80. Y el 67.5% a la dilución 1:160. TABLA I.

A la observación de los frotis de capa blanca, 5 muestras (6.75%, fueron positivas. A través de la técnica de I.F.I. a la dilución 1:80 todas las muestras (100%) resultaron positivas, mientras que a la dilución 1:160, de las 5 muestras positivas al frotis de capa blanca, 3 de ellas (4%), resultaron positivas a esta dilución y 2 (2.7%) fueron negativas. De las 69 muestras negativas a la observación de frotis de capa blanca, 48 (64.8%) resultaron positivas a la dilución 1:160 y 21 (28.3%) fueron negativas a esta dilución, TABLA II.

Con la técnica de I.F.I. se obtuvo 100% muestras positivas a la dilución de 1:80, 71.6% a la dilución de 1:160 y 28,4% muestras resultaron negativas a la dilución de 1:160. Con esto

se verifica la eficiencia del diagnóstico con la técnica de I.F.I. en comparación a los resultados obtenidos en la observación de frotis sanguíneos convencionales y de capa blanca, para detectar animales portadores de la enfermedad.

A todos los animales se les realizaron los análisis hematológicos de rutina (Volumen Globular, Hemoglobina, Contaje de Glóbulos Rojos y Contaje de Glóbulos Blancos), para obtener un perfil hematológico general y para conocer si existían otras alteraciones asociadas a la enfermedad. De los 74 animales muestreados sólo 2 (2.7%) presentaron anemia, el resto de los animales se encontraron en los parámetros normales para la especie [23]. Los resultados generales del ensayo se presentan en la TABLA III.

TABLA II

RESULTADOS PORCENTUALES ENTRE LA OBSERVACIÓN DE FROTIS SANGUÍNEO DE CAPA BLANCA Y DE LA TÉCNICA DE I.F.I. EN EL DIAGNÓSTICO DE BABESIOSIS BOVINA (*B. bigemina*)

	Técnica de I.F.I.				
	Dilución 1:80		Dilución 1:160		Total
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Positivo	5 (6,75%)	-	3 (4%)	2 (2,7%)	5 (6,75%)
Frotis Convencional					
Negativo	69 (93,25%)	-	48 (64,8%)	21 (28,4%)	69 (93,25%)
Total	74 (100%)	-	51 (68,9%)	23 (31,1%)	74 (100%)

TABLA III

VALORES HEMATOLÓGICOS DE 74 BOVINOS DE TRES FINCAS DEL ESTADO ZULIA

	\bar{X}	SD	Min	Max
Hematocrito (%)	32,05	4,66	20,00	45,00
Hemoglobina (gr%)	9,46	1,48	5,10	13,00
GR ($\text{mm}^3 \times 10^6$)	7,78	1,65	2,39	11,17
GB ($\text{mm}^3 \times 10^3$)	10,29	3,19	3,20	20,50

DISCUSIÓN

Los frotis antígenos con un grado de parasitemia de 7%, resultaron ser efectivos para su uso en la técnica de I.F.I. En Cuba, Alonso y col. [1], habían realizado sus estudios en Babesiosis con grados de parasitemia entre 7 y 12% obteniendo buenos resultados.

Está claramente establecido que las técnicas serológicas no son adecuadas para el diagnóstico de casos agudos, por lo que se debe evidenciar la Babesia en los eritrocitos. En nuestro ensayo se observó una pequeña diferencia (2.75%) a favor del diagnóstico con frotis de capa blanca sobre el diagnóstico con frotis convencional, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa ($P > 0.05$).

Al obtener el 100% de sueros positivos sobre las 74 muestras a la dilución 1:80 y de 71.6% a la dilución 1:160, llegamos a la conclusión de que la dilución 1:80 es suficiente y efectiva para detectar la presencia de animales portadores o seropositivos a la *B. bigemina*. Para la titulación de anticuerpos anti-*B. bigemina*, se deberá realizar mayor número de diluciones.

Nuestros resultados concuerdan con los de Rivas y col. [20], y Alonso y col. [1], sobre la efectividad de la técnica de I.F.I. sobre la de observación de frotis sanguíneo. También existe concordancia con los trabajos de Madrugá y col. [14], en

Brasil, donde obtuvieron un 100% de seropositividad para la Babesiosis bovina causada por *B. bigemina*, aunque nuestro estudio no determinó prevalencia en un área determinada. En otro país vecino como lo es Guyana, Applewhaite y col. [2], obtuvieron un 80% de seropositividad para *B. bigemina*.

Toro y col. [25], en nuestro país, obtuvieron un 45.2% de seropositividad a nivel nacional y 43.4% en el Estado Zulia para la *B. bigemina*; tanto en el ganado de carne como en el ganado de leche. La diferencia de este estudio con el nuestro puede estar en el número de muestras procesadas; el presente trabajo se realizó sobre 74 muestras obtenidas en tres fincas de tres Municipios del Estado, el trabajo de Toro y col., se realizó a nivel nacional en base a 2240 muestras, pero en él no se informa de cuántas muestras procedían del Estado Zulia, el número de municipios y la cantidad fincas muestreadas. Otra posible causa de esta diferencia sería que el trabajo de Toro y col. [25] se realizó en 1983 y después de 10 años la población infestada, pudo incrementarse si no se establecieron los controles necesarios.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se estableció la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (I.F.I.) en el Laboratorio de Diagnóstico de la P.V.U. de L.U.Z.

El utilizar sangre con un grado de parasitemia de 7% fue suficiente para obtener un número apreciable de frotis antígenos y realizar con éxito la prueba de IFI.

Aunque el número de observaciones fue escaso, el método de capa blanca resultó ser ligeramente más eficiente que los frotis convencionales para detectar el agente etiológico en los eritrocitos, dicha diferencia no fue significativa ($P > 0.05$).

Por ser la Babesiosis bovina una enfermedad limitante de la producción ganadera y que ocasiona grandes pérdidas económicas recomendamos:

- Utilizar la técnica de I.F.I. como método de diagnóstico en aquellos casos donde se sospeche la presencia de la *B. bigemina* y no se observe el microorganismo en los frotis sanguíneos teñidos.

- Realizar estudios de prevalencia e incidencia de la enfermedad en nuestra región.

- Tratar de establecer programas de control de esta enfermedad en nuestra región y en el país.

- Para el diagnóstico de la Babesiosis bovina aguda se recomienda la observación frotis de capa blanca sobre la observación del frotis convencional.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES), por el financiamiento de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Alonso, M., Blandino, T., Larramendy, R., Jiménez, T., y Meza, J. Inmunofluorescencia Indirecta en el diagnóstico de la babesiosis bovina en Cuba. *Revista Salud Animal*. Vol. 10. 197-203. La Habana Cuba. 1988.

[2] Applewhaite, L. M., Graig, T.M., and Wagner. Serological prevalence of bovine Babesiosis in Guyana. *Trop. Anim. Health. Prod.* Vol. 13. 13-18. Guyana, 1981.

[3] Báez, F. Contribución al estudio de las enfermedades protozoarias naturales y experimentales de Bovinos en Venezuela. *Rev. Med. Vet. Parasit.* Vol. 6. 81. Venezuela. 1947.

[4] Bidwell, D.E., Turp, P. Joyner, L.P., Payne, R.C., Purnell, R.E. Comparisons of serological test for babesia in British cattle. *The Veterinary Record*. Vol. 103. p.p. 446-449. 1978.

[5] Brocklesby, D.W., Zwart, D., and Perie, N.M. Serologic evidence for the identification of *Babesia major* in Britain. *Res. Vet. Sci.* Vol. 12. 285-287. 1971.

[6] Callow, L. L. Vaccination against bovine babesiosis. In: *Babesiosis*. Ristic, M., and Kreier, J. P. Academic Press. pp 1-24. New York. USA. 1981.

[7] Everitt, J. L., Shaddock, C., Steinkamp, C., and Clabaugh, G. Experimental *Babesia bovis* infection in Holstein calves. *Vet. Pathol.* Vol. 23. pp 556-562. 1986.

[8] Goldman, M., Pipano, E., and Rosemberg, A.S. Fluorescent antibody test for *Babesia bigemina* and *B. berbera*. *Res. Vet. Sci.* Vol. 13. pp 77-81. 1972.

[9] Johnston, L.A.Y. Epidemiology of bovine babesiosis in Northern Queensland. *Aus. Vet. Journal.* Vol. 43. 427-432. 1967.

[10] Kuttler, K. L., Adams. L. G., Todorovic, R.A. Comparisons of the Complement Fixation and Indirect Fluorescent Antibody Reactions in the detection of Bovine Babesiosis. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 38, No. 2. 153-156. 1977.

[11] León, E. Curso de técnicas de Inmunofluorescencia aplicada a la Parasitología. (*B. bovis*, *b. bigemina* y *A. marginale*). Pp 12-19. Fonaiap-Ceniap. Maracay. Venezuela. 1985.

[12] Lohr, K. F., Otuno, P.S., and Gacanga, W. Susceptibility of Boran Cattle to experimental infections with *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. *Z. Vet.* 22B. Vol. 10, 842-847. 1975.

[13] Ludford, C. G., Hall, W. T. K., Sulzer, A. J., and Wilson, M. *Babesia argentina*, *Plasmodium vivax*, and *P. falciparum*: Antigenic cross reactions. *Exp. Parasitol.* Vol. 32, pp 314-326. 1972.

[14] Madruga, C., Kemsseler, A.H., Jesús, E.F., Sete, A.J. Indirect Inmunofluorescence of the serological Diagnosis of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*: Production of antigenic stock isolated in the state of Mato Grosso de Sui, and preliminary evaluation of the test. (Pesquisa em andamento). *Empraba*. Vol. 32, pp 1-4. Brasil. 1986.

[15] Mahoney, D.F. Babesia of domestic animals. In: "Parasitic Protozoa". Volume IV. (Kreier, J. P. ed.) p.p. 1-52. Academic Press. New York. 1977.

[16] Mc Cosker, P. J. Global importance of Babesiosis. In: *Babesiosis*. (Ristic, M. and Kreier, J. P.) Academic Press. (1ª) p.p. 1-24. New York. 1981.

[17] Morzaria, S.P., Young, A. J. identification of *Babesia bigemina* in tick *Boophilus microplus decoloratus* by

- Indirect fluorescent antibody technique. Research in Veterinary Science. Vol. 23. p.p. 55-58. 1977.
- [18] Purnell, R. E., Babesiosis in Various Hosts. Babesiosis. Academic Press. 1ª ed. p.p. 25-63. New York. 1981.
- [19] Ristic, M., Kreier, J. P. Preface of Babesiosis. Academic Press. 1ª ed. New York. 1981.
- [20] Rivas, A., Rodríguez, O.N. y Espaine, N. Evaluación epizootológica de los métodos serodiagnósticos de la Babesiosis y Anaplasmosis bovina. Revista Científica Cubana de Ciencias Veterinarias. Vol. 8. p.p. 1-11. Cuba. 1977.
- [21] Ross, J.P.J., and Löhr, K.F. Serologic Diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the Indirect fluorescent antibody test. Res. Vet. Sci. Vol. 9. p.p. 557-562. 1968.
- [22] Ross, J.P.J. and Löhr, K.F. Transmission and persistence of colostral antibodies to *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale*. Z. Tropenmed. Parasitol. Vol. 21 p.p. 410-411.
- [23] Schalm, D.W., Jain. N.C., and Carroll, E.J. Veterinary Hematology. Lea and Febiger. 3ª ed. p.p. 25-122. Philadelphia. 1975.
- [24] Todorovic, R.A., and Carson, C.A. Methods of Measuring the Immunological Response to Babesia. In: Babesiosis. (Ristic, M., and Kreier, J.P.) Academic Press. 1ª ed. p.p. 381-410. New York. 1981.
- [25] Toro, M., León, E., and López, R. Epidemiologic and control feature of bovine Babesiosis in Venezuela. 2nd International Conference on Malaria and Babesiosis. p.p. 19-22. Annecy, France. 1983.
- [26] Toro, M. Seroepidemiología de la hemoparasitosis en Venezuela. Curso de técnicas de Inmunodiagnóstico de enfermedades causadas por hemoparásitos. Ceniap-Fonaiap. Venezuela. 1990.
- [27] Utech, K.B.W., Wharton, R.H., and Kerr, J.D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. Aust. Journal. Agr. Res. Vol. 29. p.p. 885-895. 1978.
- [28] Vergani, F. Datos epizootológicos sobre ixodidos en Venezuela. Bol. Inst. Invest. Vet. Vol. 8. p.p. 46-54. 1956.
- [29] Wharton, R.H. Resistant Cattle for the tick control. Santa Gertrudis. Ann. 1976. p.p. 53-54. 1976.
- [30] Ziemann, H. 1902. Citado por Toro, M., León, E., López, R., Epidemiologic and control of bovine Babesiosis in Venezuela. p.p. 1-11. 1983.