

DINÁMICA DE ANTICUERPOS E INCIDENCIA DE *Babesia bigemina* EN BECERRAS EN UNA UNIDAD DE PRODUCCIÓN EN EL MUNICIPIO CRESPO DEL ESTADO LARA, VENEZUELA

Incidence and Antibody Dynamic of *Babesia Bigemina* in Female Calves from a Production Unit at Crespo Municipality, Lara State, Venezuela

José Luis Rodríguez-Peraza¹, María Dalila Forlano-Riera² y Roy Daniel Meléndez²

¹Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Decanato de Ciencias Veterinarias, Área de Anatomía de los Animales Domésticos, Barquisimeto. Estado Lara, Venezuela. ²Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Decanato de Ciencias Veterinarias, Unidad de Investigación en Parasitología Veterinaria (UNIPRAVET) Barquisimeto. Estado Lara, Venezuela. Correspondencia: e-mail: jose.rodriguez@ucla.edu.ve; mforlano@ucla.edu.ve

RESUMEN

A nivel mundial existen diversas enfermedades que afectan la ganadería, dentro de las cuales se encuentra la babesiosis bovina. En Venezuela se presenta esta enfermedad con una prevalencia de 58,83 y un 42,6% para el estado Lara. La presente investigación, tiene por objetivo evaluar la dinámica de anticuerpos e incidencia de *Babesia bigemina* en becerras. Para ello, se seleccionó una población de 35 becerras de una unidad de producción (UP) ubicada en el municipio Crespo, estado Lara; a cada una de las becerras se les extrajo sangre, con y sin anticoagulante, directamente de la vena yugular, comenzando el primer muestreo entre el día (d) cero y el d 7 de nacimiento, y posteriormente fueron muestreadas cada 15 d hasta obtener un total de 12 muestras por becerro. Se realizaron frotis de capa blanca y determinación del Hematocrito (Hm) con las muestras con anticoagulante, luego con las muestras sin anticoagulante se procedió a extraer el suero y posteriormente fueron procesadas mediante la técnica Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para detectar anticuerpos anti-*Babesia*. La población total de becerras en ningún momento presentó casos clínicos, por ende, no se obtuvo valor en la incidencia, los valores de Hm presentaron cifras normales y en relación a la dinámica de anticuerpos anti *Babesia* fue así: 1°) los anticuerpos calostrales disminuyeron por IFI entre 0 a 3 meses de edad, y 2°) los anticuerpos anti *Babesia*, probablemente debido a infecciones con este hemoparásito, fueron progresivamente aumentando al avanzar en edad las becerras. En cuanto a los valores encontrados en las diferentes mediciones cada 15 d, la prueba estadística Q de Cochran no evidenció diferencias significativas $P > 0,05$, pero si se encontraron diferencias entre diluciones $P < 0,05$. En este sentido, la UP estudiada presentó una estabilidad enzoótica importante, con una seropositividad de anticuerpos de un 80%.

Palabras clave: *Babesia bigemina*; anticuerpos; IFI; incidencia; becerras.

ABSTRACT

Many diseases affect cattle herds worldwide, among them is bovine babesiosis. The prevalence of this disease in Venezuela, and in Lara State was reported as 58.83 and 42.6%, respectively. The main objective of this research was to assess the incidence, and the antibody dynamic of *Babesia bigemina* in female calves. Thus, a sample population of 35 female calves was selected from a farm located at Crespo Municipality, Lara State; blood samples, with and without anti coagulant (EDTA) were drawn from each calf starting at the age of 0 to 7 days (d) old. Next, all calves were sampled each 15 d until a total of 12 blood samples were collected from each bovine. The values of Hematocrit (Hm) and thin blood smears made out of the white buffy coats were carried out for all samples with EDTA, whereas, serum samples were separated from blood without EDTA, and these sera were processed using the Indirect Immunofluorescence Assay (IFA). All blood smears were negative to *B. bigemina*, and none clinical case was diagnosis during this study, consequently the incidence values were negative. The Hm values were detected as normal for all calves, and the dynamic of anti *Babesia* antibodies was as follows: first, calostrals antibodies were found decreasing by IFA between 0 to 3 months old, and second, anti *Babesia* antibodies, probably due to natural infections with this hemoparasite were progressively increasing as calves became older. The "Q" test of Cochran applied to the antibody dynamic results indicated that there were not significant differences ($P > 0.05$), whereas, differences were found among the values of serum dilutions used in IFA ($P < 0.05$). This study shows as a conclusion that an important condition of enzootic stability for bovine babesiosis is present in the studied herd, since the main seropositivity for all calves was 80%.

Key words: *Babesia bigemina*; antibodies; IFA; incidence; calves.

INTRODUCCIÓN

Los hemoparásitos son organismos que pueden ser transmitidos a los animales domésticos por vectores mecánicos como insectos hematófagos, de forma iatrogénica por agujas contaminadas y vectores biológicos como la garrapata *Rhipicephalus microplus*, ocasionando un efecto negativo en la salud animal por las alteraciones hematológicas que causan, lo cual conduce a grandes pérdidas en las explotaciones bovinas (*Bos taurus*). Dichas pérdidas se reflejan principalmente en deficiencias en la ganancia de peso, reducción en la producción láctea, altas inversiones en productos farmacéuticos, atención veterinaria y mortalidad [30].

La babesiosis bovina se presenta con un cuadro clínico producido por uno de estos hemoparásitos (*Babesia bigemina* y *B. bovis*), que impactan la economía pecuaria a diferentes niveles [20]. Venezuela, por ser un país ubicado en el trópico, está expuesto a los problemas que se presentan por la presencia de este hemoparásito, donde casi siempre la fuente de infección de estos parásitos la constituye un animal infectado y a través de vectores mecánicos y biológicos se lleva a cabo la transmisión de infección de animales sanos. Una vez que el animal se infecta puede permanecer como portador por años, de por vida en algunos casos aún cuando el parásito no pueda ser demostrable en la sangre [2].

Durante las últimas dos décadas ha existido un gran avance en el conocimiento del sistema inmune de los bovinos y su funcionamiento. Se sabe que los bovinos difieren del humano y de otros animales de laboratorio en la forma de transferencia de inmunidad materna, en el contenido y en la composición de inmunoglobulinas en calostro y leche. Por su estructura placentaria, no hay paso de las inmunoglobulinas al feto [22].

La detección de la enfermedad se hace a través de los signos clínicos, exámenes de laboratorio con métodos directos e indirectos. Uno de los métodos directos es el frotis sanguíneo, el cual permite la identificación directa de los parásitos de *Babesia* en la sangre periférica de animales infectados. A su vez hay técnicas de tipo indirecto que permiten la detección de anticuerpos específicos circulantes, para la identificación de bovinos portadores asintomáticos y reservorios. Estas últimas son serológicas y se aplican a grupos de animales. Todas estas pruebas poseen un fundamento inmunológico y las más comunes utilizadas en la actualidad son: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) [29]. En este orden de ideas es necesario el conocimiento del papel que juega el sistema inmunológico ante este parásito, por ende, nace la interrogante de cuando es el momento en que el bovino comienza a desarrollar esa inmunidad contra este parásito, que tan efectiva es esa respuesta y cómo se prolonga en su primera fase de crecimiento. Para lograr dilucidar esta problemática en este estudio se estableció como objetivo principal evaluar la dinámica de anticuerpos e incidencia de *B. bigemina* en becerras de una unidad de producción (UP) del municipio Crespo del estado Lara.

MATERIALES Y MÉTODOS

Unidad de producción: el trabajo se realizó en una finca de ganado lechero ubicada en las afueras de la población de Duaca, en la carretera vía Los Chispes km. 1, municipio Crespo, estado Lara, Venezuela, latitud 10° 16' N, longitud 69° 09' O, altitud 735 m.s.n.m. con una precipitación media anual de 755,6 mm, temperatura media de 24° C, una humedad relativa media de 75%, y clasificada como una zona climática de semiárido templado [6].

Población y muestra: representada por el número total de becerras en la explotación y se tomó como criterio de inclusión para la selección de la muestra y desarrollo del proyecto, las becerras con una edad de 0 a 7 días (d) de nacidas en un periodo de 7 meses (mes), por lo que resultaron 35 becerras de la misma raza y edad.

Toma de muestras: se realizaron con repeticiones cada 15 d hasta los primeros 5 mes de edad para un total de 12 muestras por animal a las 35 becerras durante todo el estudio (septiembre – abril). Las muestras consistieron en la extracción de 3 mL de sangre directamente de la vena yugular en tubos estéril Vacutainer® con anticoagulante etilendiaminetetracético (EDTA) y con ayuda de agujas estériles (*Vacutainer Becton Dickinson*) previa desinfección de la zona con alcohol isopropílico. Igualmente se extrajo de cada bovino 3mL de sangre, los cuales se colocaron en tubos estériles sin anticoagulante a fin de separar el suero sanguíneo, previa la realización del examen clínico.

Determinación de la incidencia de *B. bigemina* en las 35 becerras: se utilizó la siguiente fórmula [17]:

$$\% I = \frac{Nc}{Nt} \times 100$$

Donde: I= porcentaje de incidencia; Nc = número de casos nuevos, Nt = Número total de animales.

Se tomó una cantidad de sangre del tubo Vacutaniner® con anticoagulante, en un tubo de microhematocrito para ser centrifugada (Dynac, Clay Adams, EUA) realizar el frotis de capa blanca y ser coloreado con Hemacolor®, para su posterior observación en microscopio óptico (Olympus, CX41, Japón), esta técnica se realizó con la finalidad de diagnosticar parasitosis bajas ya que permite concentrar las células y las posibilidades de diagnóstico de infecciones activas a *Babesia* aumentan [11].

Quantificación de la dinámica de anticuerpos: se realizó mediante diluciones a través la técnica de inmunofluorescencia (IFI). El suero que se extrajo de los tubos Vacutaniner® sin anticoagulante se utilizó para la detección de los anticuerpos contra el parásito. La técnica de IFI se aplicó de acuerdo al método descrito [1], utilizando como antígeno eritrocitos infectados con *B. bigemina*. Las muestras fueron observadas en un cuarto oscuro. Se utilizó un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, Japón) con lámpara de mercurio. Los sueros positivos fueron aquellos en donde *Babesia* presentó fluorescencia de color verde brillante,

mientras los sueros negativos no exhibieron fluorescencia.

La determinación del hematocrito (Hm) se realizó a partir de las muestras de sangre con anticoagulante inmediatamente después de la llegada al laboratorio. Como indicadores del grado de anemia, el método empleado fue la técnica del microhematocrito [34]. Con los microcapilares centrifugados se procedió a medir a través de la escala de lectura el porcentaje de Hm para cada bovino.

Análisis estadístico: Se aplicó la prueba estadística Q de Cochran a las muestras procesadas por IFI, usando el paquete estadístico SSPS para Windows versión estándar 10.0.6.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 420 muestras se colectaron en el transcurso de la investigación donde no se detectaron animales positivos a *B. bigemina* a través del frotis de capa blanca, estos resultados coinciden con el hecho de que durante las tomas de muestras los animales no presentaron signos clínicos de la enfermedad. En un estudio realizado en México en animales menores de 1 año, a pesar de haber utilizado la técnica menos sensible (frotis sanguíneo de capa fina) los resultados fueron iguales a los encontrados en este estudio [25]. Aunque en diferentes Estados de Venezuela se han reportado prevalencias bajas de babesiosis bovina o infección activa con porcentajes que oscilan entre 0,41 y 2,85% utilizando la técnica de frotis sanguíneos de capa fina [8, 31], un 8,5% de incidencia fue diagnosticado en un estudio longitudinal realizado con 15 animales mediante frotis sanguíneo por Meléndez y Forlano [19], tal como se ha observado en países como México y Colombia, donde se reportan incidencias que van de 0,7 hasta 4,9% a través de métodos directos, las cuales se siguen considerando como bajas [9, 21, 24]. Sin embargo, a pesar de que la enfermedad activa en Venezuela suele presentarse con baja incidencia, existe un reporte del estado Zulia de explotaciones bovinas con 29,6% para *B. bigemina*, porcentajes muy diferentes a los obtenidos en este estudio [27], no obstante, seis años después en la región zuliana se realizó un estudio retrospectivo donde no se encontró infección activa para *B. bigemina* [8]. La mayoría de los estudios confirman que, la babesiosis se presenta en los rebaños bovinos con baja o ninguna infección activa, lo que parece reflejar un estado de premunición, condición favorable en ambientes enzoóticamente estable.

En áreas enzoóticas, los bovinos se infectan generalmente en los primeros meses de edad y reciben anticuerpos maternos vía calostro, lo cual indica que difícilmente se observarían signos clínicos de la enfermedad [18], esta resistencia está relacionada con la edad, no sólo por los efectos protectores de los anticuerpos maternos, sino también por los adquiridos en fases tempranas de la enfermedad [7]. Esta condición puede haber ocurrido en este estudio, ya que no se diagnosticó infección activa en las becerras durante la determinación de la incidencia de *B. bigemina* en la UP,

resultados que coinciden con los de Vidotto y col. [32], quienes realizaron análisis de frotis sanguíneos en bovinos determinando la ausencia de infección activa en un rebaño.

En cuanto a la cuantificación de la dinámica de anticuerpos, en la dilución 1:80 se observó un 80% de animales con presencia de anticuerpos contra *B. bigemina*, en la dilución 1:160 se presentó un 14,28% y en la dilución 1:320 únicamente el 2,85%. En cuanto a la comparación de las diferentes mediciones que se realizaron cada 15 d, según la prueba Q de Cochran no encontraron diferencias significativas con un 95% de confianza ($P > 0,05$), pero si habían diferencias significativas entre las diluciones ($P < 0,05$) y un 20% de las becerras resultaron negativas. Con base a los resultados obtenidos para los títulos de anticuerpos las becerras se clasificaron en tres grupos: el primer grupo, con anticuerpos calostrales, conformado por 10 becerras, las cuales presentaron títulos de anticuerpos en promedio de 56 a 63 d de nacidas; el segundo grupo, con anticuerpos post-infección conformado por 7 becerras, las cuales presentaron títulos de anticuerpos a partir de los 100 a 107 d de edad en promedio, y el tercer grupo fueron las becerras que presentaron títulos durante todo el muestreo (TABLA I).

Geográficamente, una zona se considera epidemiológicamente estable a babesiosis cuando el 75% de los bovinos en edades de 3 a 9 meses son serorreactivos a la presencia de anticuerpos contra *Babesia* spp. [35]. Los resultados obtenidos en este estudio permiten categorizar a esta UP bajo la condición de estabilidad enzoótica para *B. bigemina*, la cual tiende a mantener el equilibrio entre el parásito y los animales, lo que condiciona a que por lo general no se presente la enfermedad en su forma aguda en las becerras que serán el reemplazo de esta explotación.

Del 80% de los animales que resultaron con presencia de anticuerpos anti-*Babesia* en la prueba de IFI en la dilución 1:80, un 32,14% eran becerras con edad de 0 a 7 d, estos anticuerpos por la edad de las becerras fueron transferidos de la madre a través del calostro, dichos anticuerpos calostrales se mantuvieron hasta los 90 a 120 d de edad y posteriormente declinaron (FIG. 1).

TABLA I
GRUPOS DE BECERAS QUE PRESENTARON
ANTICUERPOS ANTI-*Babesia*. (PROMEDIO POR EDAD)

N° de Becerras	Edad (d)	Títulos	Observaciones
9 Becerras	56 a 63	1/80	1 ^{er} grupo
1 Becerra	56 a 63	1/80 y 1/160	
7 Becerras	100 a 107	1/80	2 ^{do} grupo
7 Becerras	0 a 161	1/80	3 ^{er} grupo: becerras con anticuerpos durante todo el estudio
3 Becerras	0 a 161	1/80 y 1/160	
1 Becerra	0 a 161	1/80, 1/160 y 1/320	

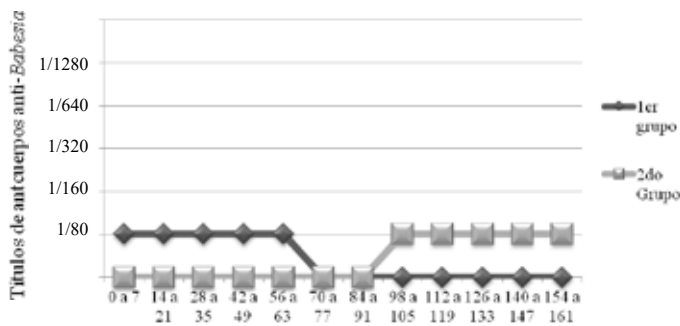


FIGURA 1. PROMEDIO DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS EN BECERROS, DIVIDIDOS EN ANTICUERPOS CALOSTRALES (1ER GRUPO) Y POST EXPOSICIÓN (2DO GRUPO) DURANTE 161 DÍAS.

Estos anticuerpos proporcionan una inmunidad específica pasiva de manera natural. Los resultados son muy similares a los reportados por otros autores [13], donde se demostró que los anticuerpos declinan aproximadamente a los 90 a 120 d de edad, sin embargo otros investigadores [16] observaron que la declinación de los anticuerpos dura hasta los 150 d de edad. En babesiosis bovina, los niveles de anticuerpos se elevan durante la etapa temprana de infección y luego declinan durante el estado crónico, por lo tanto los becerros que nacen en área endémicas son protegidos por los anticuerpos calostrales durante sus primeros tres meses de vida [19]. Algunos estudios han demostrado que, generalmente los becerros se infectan alrededor de los 4–5 mes de edad con una buena respuesta inmunológica, la cual puede durar aproximadamente hasta 4 años [12].

También se observó que el 25% de las becerras presentaron títulos de anticuerpos contra *B. bigemina* después de los 7 d de edad, estos anticuerpos se cree que son adquiridos, posiblemente por la exposición al parásito a través del vector (FIG. 1). Estos anticuerpos proporcionan una inmunidad específica activa de manera natural. Resultados similares fueron reportados en animales de 7 d de nacidos por Smith y col. [28] donde indujo una infección con *B. bovis* con *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en condiciones de laboratorio y encontró anticuerpos circulantes.

El 42,85% de los animales que resultaron positivos en la dilución 1:80, permanecieron durante todo el estudio con títulos de anticuerpos desde el día 0 hasta los 161 días de edad. Estos resultados coinciden con los observados por otros autores [33], que reportan la presencia de anticuerpos desde los 7 hasta 148 d de edad. Estos animales que logran permanecer por mucho tiempo con anticuerpos protectores y mantenerse en un estado de premunición, los protege contra infecciones agudas como la babesiosis, similar situación fue reportada por otros investigadores [3] quienes señalan que, sólo animales inmunizados exitosamente o aquellos que han podido resolver una infección aguda adquieren inmunidad contra una confrontación subsiguiente, probablemente debido al desarrollo de una respuesta inmune eficiente.

De las becerras que presentaron anticuerpos en diluciones 1:80 se observó que, el 14,28 y 2,85% resultaron con presencia de anticuerpos en diluciones 1/160 y 1/320, respectivamente, desde 0 a 161 d. Este grupo de becerras fueron las que mantuvieron durante todo el estudio produciendo anticuerpos. Esta situación se explica cuando los animales inicialmente reciben anticuerpos anti-*Babesia* protectores de las madres, desarrollan una inmunidad pasiva y posteriormente al entrar en contacto con el vector y el parásito se presenta una inmunidad activa, en este sentido, los animales que son persistentemente infectados, que han controlado la parasitemia o en los animales inmunizados con éxito con antígenos específicos reconocidos por células T CD4⁺ son fundamentales para la respuesta inmune adaptativa a través de la producción de IFN – γ , por lo tanto son animales que han entrado en un estado de equilibrio o premunición con el parásito. Además también se presenta la activación de los macrófagos para la remoción eficiente del microorganismo, el IFN – γ aumenta la producción de anticuerpos IgG2 [5], que cuando se combina con IgG1 ha demostrado proteger contra la exposición del parásito [4, 15], debido a que se favorece y se incrementa la fagocitosis mediante la opsonización llevada a cabo por dichos anticuerpos.

Este estudio confirma la capacidad de la especie bovina de crear un estado de premunición ante la babesiosis a edades tempranas y mantenerla por un periodo prolongado, lo que le permite en estas condiciones tropicales poder desarrollar una inmunidad innata y/o adquirida cuando se expone a la presencia del vector y el parásito.

La dinámica de anticuerpos de las becerras determina una alta incidencia de anticuerpos contra *Babesia* para esta UP, situación muy similar a la detectada en otros países como los reportados por Hugh-Jones y col. [10], quienes encontraron una seroprevalencia de 70% en algunas islas del Mar Caribe. En México se observó una seroprevalencia de 91,3% para *Babesia* spp. [5], sin embargo hay reportes de incidencia de menores porcentajes (47,8%) como las observadas por otros investigadores [25] para *B. bigemina*, estas diferencias marcadas se presume que pueden estar influenciadas por condiciones ambientales, (presencia de vectores). En algunos Estados de Venezuela se han reportado estudios de seroprevalencia de hemotrópicos en diferentes tipos de explotaciones bovinas. Para el estado Guárico se ha reportado un 81,8% [31]; en el estado Zulia se han determinado seroprevalencias de 53,9% [27], mientras que en el estado Lara [23] determinaron una seropositividad para *B. bigemina* de 79,55% en el sector Las Yaguas del municipio Torres; Meléndez y Forlano [19] reportaron una seroprevalencia del 100% de anticuerpos contra *Babesia* spp. así como los reportes de otros autores [8] los cuales realizaron un estudio retrospectivo de hemotrópicos en diferentes Estados del país, donde se observaron seroprevalencias de 58,83%. Estos resultados en Venezuela son fluctuantes, coincidiendo algunos con los obtenidos en este estudio, estas variaciones posiblemente están dadas por la metodología utilizada, la zona estudiada, presencia del vector, manejo de cada UP.

Existen reportes de seroprevalencia de anticuerpos contra *B. bigemina* como los realizados por Zapata y col. [35], que encontraron una serorreactividad en los bovinos evaluados de 61%, así como los de otros autores [14], donde se evaluaron animales entre los 6 y 24 mes de edad, utilizando como prueba serológica ELISA para la detección de anticuerpos contra *B. bigemina* y obtuvo una seroprevalencia del 95%. Este resultado refleja que la seroprevalencia de anticuerpos contra *B. bigemina* es alta, condición que no permite se presente la enfermedad en las explotaciones bovinas.

En cuanto a la determinación del Hm, la ausencia de infección activa en las becerras coincide con los niveles de Hm, el 98,10% de los Hm estuvieron en valores normales los cuales se mantuvieron en la mayoría de los animales en rangos normales de 24 a 46% [2] el estudio. Estos resultados son similares a los reportados por otros investigadores [24, 26] quienes obtuvieron valores de Hm normales en 30 animales con un año de edad en Morelos, México. Del total de becerras muestreadas en este estudio, sólo un animal presentó niveles de Hm por debajo de lo normal durante los 70 a 147 d de nacida, esto se atribuyó a una coinfección o presencia de otro hemoparásito (observado en frotis de capa blanca), a medida que la becerro pudo establecer el estado de premunición con el parásito, los valores de Hm fueron aumentando.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se observaron tres comportamientos distintos de la dinámica de anticuerpos en las diferentes mediciones: animales con anticuerpos calostrales, animales con anticuerpos post exposición y animales con presencia de anticuerpos durante todo el estudio. Los animales estudiados mantuvieron una inmunidad exitosa contra *B. bigemina*. No se presentaron casos de infección activa de *B. bigemina* en las becerras estudiadas en la UP. Por la forma como se presentó la dinámica de anticuerpos, se considera que esta condición permite que las becerras presenten el Hm con valores normales para la especie. Este estudio demuestra que UP presenta una estabilidad enzoótica para babesiosis bovina.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA) por el apoyo financiero a través del proyecto 014-VE-2013 y al Decanato de Ciencias Veterinarias de la UCLA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BASALO, A.; PARRA, O.; ARRAGA, C.; LEÓN, E.; GUILLEN, A. Establecimiento de la técnica serológica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) como método de diagnóstico de la babesiosis bovina en el laboratorio de diagnóstico de la Policlínica Veterinaria de LUZ. **Rev. Científ. FCV-LUZ** . V (2): 87 – 94. 1995.

- [2] BLOOD, D.; RADOSTITS, O.; HENDERSON, J. Medicina Especial. En: **Medicina Veterinaria**. 6ª Ed. Nueva Editorial Interamericana, México D. F. Pp 949-972. 1986.
- [3] BROWN, W.; PALMER, G. Designing blood stage vaccines against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Parasitol Today**. 7:275 – 281. 1999.
- [4] ESTES, D.; BROWN, W. The type 1/type 2 paradigm and regulation of humoral immune responses in cattle. **Vet Immunol and Immunopathol**. 90:1 – 10. 2002.
- [5] FERNÁNDEZ, M.; CANTÓ, G.; ABOYTES, R. Prevalencia de anticuerpos séricos en contra de *Babesia* spp. y *Anaplasma marginale* en el municipio de Santiago Ixcuintla. Nayarit. **Rev. Vet. Méx.** 4:407 – 409. 1995.
- [6] GACETA OFICIAL DEL ESTADO LARA. Sumario Ley de División Política Territorial del estado Lara. 50pp. 1998.
- [7] GOFF, W.; JOHNSON, W.; PARISH, S.; BARRINGTON, G.; TUO, W.; VALDEZ, R. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin – 12, interferon – γ , and inducible nitric oxide synthases mRNA expression in the spleen. **Parasitol Immunol**. 23:463 – 471. 2001.
- [8] GUILLÉN, A.; LEÓN, E.; ARAGORT, W.; SILVA, M. Diagnóstico de hemoparásitos en el Instituto de Investigaciones Veterinarias período 1986-2000. **Vet. Trop**. 26:47 – 62. 2001.
- [9] HERRERA, M.; SOTO, A.; URRIGO, V.; RIVERA, G.; ZAPATA, M.; RÍOS, L. Frecuencia de hemoparásitos en bovinos del bajo Cauca y alto San Jorge 2000 – 2005. **Rev. Científ. Med. Vet. Zoo**. Córdoba 13:1486 – 1494. 2008.
- [10] HUGH-JONES, M.; SCOTLAND, K.; APPLEWHAITE, L.; ALEXANDER, F. Seroprevalence of anaplasmosis and babesiosis in livestock on St Lucia. **Trop. Anim. Health Prod**. 20:137 – 139. 1988.
- [11] INSTITUTO INTERNACIONAL DE COOPERACIÓN PARA LA AGRICULTURA. Diagnóstico Directo. En: **Técnicas para el diagnóstico de Babesia y Anaplasmosis Bovinas**. Publicación Científica N° 8. San José de Costa Rica. Pp 23-26. 1987.
- [12] JAMES, M. Antibody levels during bovine hemoparasitic diseases: trypanosomiasis, anaplasmosis and babesiosis. **Acta Cientif. Venez**. 34:185 – 190. 1983.
- [13] JAMES, M.; CORONADO, A.; LÓPEZ, W.; MELÉNDEZ, R.; RISTIC, M. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. **Trop. Anim. Health Prod**. 17:9 – 18. 1985.

- [14] LEÓN, A.; RIBERA, C.; VILLEGAS, F. Detección de anticuerpos IgG contra *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* en bovinos en los Municipios de Roboré y San José de Chiquitos del Departamento de Santa Cruz, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Bolivia. Tesis de Grado. 56 pp. 2010.
- [15] MAHONEY, D. The immune response to babesiosis. In: Morrison WL (Ed) **The ruminant immune system in health and disease**. Cambridge: Cambridge University Press. Pp 539 – 545. 1986.
- [16] MAHONEY, D.; WRIGHT, I.; MIRRE, G. Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 67:197 – 203. 1973.
- [17] MARGOLIS, L.; ESCH, G.; HOLMENS, J.; KURIS, A.; SCHAD, G. The use of ecological terms in Parasitology (Report of an "Ad Hoc" Committee of the American Society of Parasitologists). **J. Parasitol.** 68 (1): 131 – 133. 1982.
- [18] MELÉNDEZ, R. Revisión integral de los factores epidemiológicos que inciden en la relación *Boophilus microplus* – bovino – *Babesia* spp. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** VIII (1): 25 – 34. 1998.
- [19] MELÉNDEZ, R.; FORLANO, M. Seroprevalence and incidence of Babesiosis and Anaplasmosis in a Carora breed herd from Venezuela. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 6:105 – 109. 1997.
- [20] ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE SANIDAD ANIMAL. Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. En: OIE ed. Sanidad animal y economía. Serie Técnica n° 3. París, Francia Pp 375 – 388. 1982.
- [21] ORJUELA, J.; NAVARRETE, M.; BETANCOURT, A.; REQUEME, L.; CORTEZ, E.; MORRISON, R. Salud y Productividad en Bovinos de la Costa norte de Colombia. En: **World Anim. Rev.** (FAO). (69): 7 – 14. 1991.
- [22] PASTORET, P. Immunology of Cattle. In: **Handbook of Vertebrate Immunology**. New York Academic Press. Pp 438 – 484. 1998.
- [23] QUIJADA, T.; CONTRERAS, J.; FORLANO, M. Seropositividad a *Babesia bigemina* en bovinos mestizos de las Yaguas, Carora, estado Lara, Venezuela. **Vet. Trop.** 23:13 – 24. 1998.
- [24] RODRÍGUEZ-VIVAS, R.; COB-GALERA, L.; DOMÍNGUEZ-ALPIZAR, J. Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos en el laboratorio de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (1984-1999). **Rev. Biomed.** 11:277 – 282. 2010.
- [25] ROJAS, E.; DOMÍNGUEZ, F.; GARCÍA, M.; CRUZ-VAZQUEZ, C.; FIGUEROA, J. Prevalencia e incidencia de la Babesiosis bovina y *Babesia bigemina* en un Hato Bovino en Axochiapan, Morelos. **Avan. Invest. Agrop. México.** VIII (2): 1 – 8. 2004.
- [26] SCHALM, O.; JAIN, N.; CARROLL, E. Normal Hematology of Cattle. En: **Veterinary Hematology**. Lea y Fabiger, USA. 180 pp. 1975.
- [27] SIMOES, D.; CHIRINOS, A.; MARTÍNEZ, N.; CASTEJÓN, O.; ÁVILA, J. Prevalencia de Babesiosis bovina en el sector cuatro (Playa Bonita) del municipio Mara. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** V (1): 5 – 10. 1995.
- [28] SMITH, R.; OSORNO, B.; BRENER, J.; DE LA ROSA, R.; RISTIC, M. Bovine Babesiosis: severity and reproducibility of *Babesia bovis* infections induced by *Boophilus microplus* under laboratory conditions. **Res. Vet. Sci.** 24: 287 – 292. 1978.
- [29] TIZARD, I. Sorología: Detecção e Medição dos Anticorpos. En: **Imunologia Veterinária**. Uma Introdução. 5ª Ed. Editora Roca LTDA. São Paulo. Brasil. Pp 224 – 243. 1998.
- [30] TORO, M. Seroepidemiología de la hemoparasitosis en Venezuela. **Vet. Trop.** 4:1 – 13. 1990.
- [31] TORO, M.; LEÓN, E.; PALLOTA, F.; LÓPEZ, G.; GARCÍA, A.; RUÍZ, A. Prevalencia de las hemoparasitosis en bovinos del estado Guárico. **Vet. Trop.** 8:21 – 36. 1983.
- [32] VIDOTTO, O.; ANDRADE, G.; AMARAL, C.; BARBOSA, C. Freqüência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** 49 (5): 655 – 659. 1997.
- [33] WEISMAN, J.; GOLDMAN, M.; PIPANO, E. Passive transfer of maternal antibodies against *Babesia* to new – born calves. **J. Protozool.** 21: 466. 1974.
- [34] WEISS, D.; WARDROP, K. Normal Hematology of Cattle. En: **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th Ed. Blackwell Publishing. Editorial Office 2121 State Avenue, Ames, Iowa. EUA. Pp 5014 – 8300. 2010.
- [35] ZAPATA, R.; LARA, N.; BAENA, A.; REYES, J.; RÍOS, L. Seroprevalencia de babesiosis bovina en la hacienda Vegas de la Clara, Gómez Plata (Antioquia). **Rev. Med. Vet.** Colombia 21:63 – 71. 2008.