

Reactivación de un cepario de *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale*, para estudios experimentales

Carmen Madrid, Henry Fuentes, Willians Romero, Ana Álvarez y Emir Espinoza*

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Unidad de Sanidad Animal. Maracay, Aragua, Venezuela.
* Correo electrónico: espinozaemir@yahoo.com

RESUMEN

El uso de microorganismos conservados (*Babesia* sp y *Anaplasma* sp) son claves en la solución de los graves problemas generados por los hemotrópicos de interés veterinario en Venezuela. Aislados de *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* criopreservados en nitrógeno líquido a (-196)°C por largo tiempo, se inocularon en becerros esplenectomizados, con el objeto de evaluar la viabilidad de mismos. Los resultados mostraron alta patogenicidad de los aislados, con manifestaciones clínicas de fiebre, anorexia, incoordinación (*B. bovis*) y hemoglobinuria (*B. bigemina*). La virulencia de los hemoparásitos medida por la disminución del hematocrito, indicó mayor severidad para los aislados de *B. bigemina* y *A. marginale*. La criopreservación de estos parásitos permitirá la producción de antígenos en cantidad y calidad para análisis de rutina de estas enfermedades de interés veterinario, desde el punto de vista parasitológico, serológico y de biología molecular.

Palabras clave: Reactivación, viabilidad, *Anaplasma marginale*, *Babesia* sp.

Reactivation of parasites stock *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale*, for experimental studies

ABSTRACT

The uses of conserved microorganisms (*Babesia* sp and *Anaplasma* sp) are keys in the solution of serious problems generated by veterinary haemotropic parasites of serious concern in Venezuela. Isolated *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* cryopreserved in liquid nitrogen at (-196)°C long splenectomised calves were inoculated with the object of assessing their viability. Results showed high pathogenicity of isolates, with clinical manifestations of fever, anorexia, incoordination (*B. bovis*) and haemoglobinuria (*B. bigemina*). The virulence of the hemoparasites measured by the decrease of hematocrit indicated greater severity for isolates of *B. bigemina* and *A. marginale*. Cryopreservation of these parasites allows antigen production in quantity and quality for routine analysis of these diseases of veterinarian interest, from the viewpoint parasitological, serological and molecular biology.

Key words: Reactivation, viability, *Anaplasma marginale*, *Babesia* sp.

INTRODUCCIÓN

El uso de los microorganismos es clave en el enfrentamiento y control de los graves problemas de la humanidad, agricultura, alimentación, la salud animal y humana. Los microorganismos, entre ellos, los hemoparásitos de interés veterinario, juegan un papel destacado en diversas áreas de la biología; por lo que su aislamiento, caracterización y conservación es importante (Souza *et al.*, 2000; De Oca *et al.*, 2008). Lograr establecer en

Venezuela, una colección de hemotrópicos que afectan de manera endémica la ganadería vacuna y bufalina (*Babesia bigemina*, *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale*), ayudaría a tener un acervo de la biodiversidad de estos parásitos, lo cual proporcionará elementos útiles en la adaptación y estandarización de métodos que permitan la validación de nuevas técnicas de diagnóstico y el desarrollo de vacunas hemoparasitarias libres de patógenos zoonosarios (bacterias y virus) que afectan al efectivo ganadero.

La babesiosis bovina, causada por la *B. bigemina* y/o *B. bovis* es considerada como una enfermedad económicamente importante de los bovinos explotados en las zona sub tropicales y tropicales de América, entre los 40° N y 32° S del Ecuador, donde prevalece su vector: la garrapata *Rhipicephalus (B) microplus* (González., 1979; Vargas y Patarroyo, 2004). Estas dos especies de *Babesia*, conjuntamente con el *A. marginale* son causantes del complejo conocido como “fiebre de garrapatas o tristeza parasitaria bovina”, caracterizada por producir como sintomatología general: fiebre, anemia, ictericia (más intensa y común en la anaplasmosis), hemoglobinuria (*B. bigemina*), incoordinación (*B. bovis*), enflaquecimiento, baja producción de carne y leche, abortos y muerte (Herrera *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2011). La babesiosis puede ser controlada por el uso de acaricidas para regular el vector, la quimioprofilaxis y el uso de medios inmunológicos (Goncalves, 2000) y en la anaplasmosis como opciones de control se utilizan el tratamiento de animales con terapéutica específica, una vez diagnosticada la enfermedad o determinada la seroprevalencia de la misma, y la vacunación con aislados o cepas de *A. marginale* atenuadas o *Anaplasma centrale* (Richey y Palmer, 1990).

Actualmente, se realiza en el país la evaluación de un inmunógeno ultracongelado polivalente monodosis constituido por *B. bigemina*, *B. bovis* y *A. centrale*, de origen argentino para prevenir éste complejo de patologías, la fiebre de garrapata o la tristeza parasitaria bovina. Por consiguiente este trabajo describe, como parte del proceso de evaluación del inmunógeno argentino, la viabilidad de los aislados de *B. bigemina*, *B. bovis* y *A. marginale*, preservados en nitrógeno líquidos a (-196)°C durante 7, 10 y 26 años, respectivamente, en el banco de hemoparásitos del Laboratorio de Parasitología Unidad de Sanidad Animal INIA-CENIAP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales experimentales

Para la reactivación de las cepas de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*, pertenecientes al cepario de hemoparásitos del Laboratorio de Parasitología de la Unidad de Sanidad Animal, se utilizaron dos (2) becerros Holstein de 7 – 8 meses de edad, provenientes de la Estación Experimental Santa María de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela FCV-UCV, negativos (sin parásitos visibles por microscopía óptica) a *Babesia* sp y *A. marginale* por método directo (frotis coloreado con Giemsa al 10%), realizados en el Laboratorio de Parasitología y la Técnica en Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), utilizando cebadores msp5 para identificación de *A. marginale*, pericia efectuada en el Laboratorio de Inmunología de Hemoparásitos de la Universidad Simón Bolívar. Los becerros seleccionados para ser inmunodeprimidos quirúrgicamente fueron mantenidos antes y posterior a la esplenectomía, bajo estricto aislamiento en un ambiente libre de garrapatas, desde su traslado a los galpones experimentales hasta finalizar el ensayo; alimentándose a base de concentrado, heno y agua *ad libitum*.

Aislado de hemoparásitos

Se utilizaron para este ensayo, aislados de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* obtenidos a nivel de campo en diversas regiones del país, los cuales se han mantenido en formas de criopreservados en nitrógeno líquido hasta el momento de ser reactivado para su uso en estudios experimentales (desafío y/o preparación de frotis para pruebas de inmunofluorescencia indirecta o ensayos inmunoenzimáticos).

Infeción y dosis de inóculo

Los dos animales utilizados para la reactivación de la *B. bovis* y *B. bigemina*, se inocularon por vía intravenosa (IV) con dosis de 10^7 y 10^9 eritrocitos parasitados contenidos en 1 mL de un criopreservado (partes iguales de sangre y DMSO). El becerro previamente inoculado con la *B. bovis*, una vez reactivada la cepa y desarrollada las manifestaciones clínicas de la enfermedad, se trató mediante el empleo de un protocolo esterilizantes (acetato de diminaceno) a los fines de lograr, posteriormente,

una infección pura de anaplasmosis (IICA, 1985). Recuperado clínicamente el animal, se inoculó por vía IV con unacepa de *A. marginale*, a la dosis de 10^8 eritrocitos parasitados y contenidos en 1 mL de criopreservado, similar al de las *Babesia*.

Determinación y registro de temperatura corporal, signos clínicos, muestras sanguíneas y parasitemia

La temperatura corporal se midió en las primeras horas de la mañana (7 a 8 AM), empleándose un termómetro rectal de uso veterinario. Paralelamente, se evaluaron mediante observación y registro diario, los signos clínicos en los becerros inoculados, mucosas, ganglios, frecuencia cardíaca y respiratoria, condición corporal y actitud. A continuación, se tomaron regularmente muestras de sangre venosa de cada animal, en tubos vacutainer conteniendo EDTA (ácido etilendiaminotetracético) para la evaluación del hematocrito (Ht) y la parasitemia, y en tubos sin anticoagulantes para posterior medición de la cinética de los anticuerpos antibabesia y antianaplasma. La determinación de los hemoparásitos fue realizada en frotis sanguíneo delgado coloreado con Giemsa al 10%.

Análisis de los datos

Durante la reactivación de los aislados, se registraron los valores cualitativos y cuantitativos de las manifestaciones clínicas, período de incubación, temperatura corporal y hematocrito, obtenidos en dos períodos arbitrarios, uno de incubación y el otro de patencia de los parásitos. Los mismos se registraron y se tabularon, expresándose cualitativamente o en porcentaje de acuerdo al parámetro estudiado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que los tres microorganismos criopreservados por períodos mayores a siete (7) años (*A. marginale*, *B. bigemina* y *B. bovis*), presentaron sobrevivencia y patogenicidad, valorada por la presencia de la parasitemia, el seguimiento de los síntomas clínicos en los animales esplenectomizados y retados con el hemoparásito en particular (Cuadro 1 y 2). No obstante, se resalta en este ensayo, que los becerros retados con los hemoparásitos en términos generales, manifestaron en los frotis coloreados con Giemsa, un cuadro de baja parasitemia, semejante a reportes citados en la literatura por otros autores,

quienes trabajaron con animales esplenectomizados (Kuttler, 1986; Vieira *et al.*, 2000). Los síntomas o manifestaciones clínicas, fueron coincidentes con los señalados en la bibliografía para este tipo de enfermedades hemoparasitarias (Bock *et al.*, 2004; Araujo *et al.*, 2008), agrupadas en lo que se denomina el “complejo de la tristeza parasitaria bovina”, como son entre otros, temperaturas elevadas ($\geq 39^\circ\text{C}$), ictericia/anemia, apatía/debilidad (Herrera *et al.*, 2008). Los resultados mostraron que la sangre infectada con los hemoparásitos y criopreservada con dimetil sulfóxido, siguió siendo infecciosa después de la descongelación e inoculación por separado a los becerros esplenectomizados (Cuadro 1 y 2). Las observaciones mediante microscopía óptica, no evidenciaron hemólisis por el tiempo de preservación, ni causada por el congelamiento y descongelamiento de los viales; observación, anteriormente reportadas por otros investigadores que han congelado protozoarios, tanto de mamíferos como de aves (Souza *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2008).

El Cuadro 1 refleja el desarrollo del período prepatente de los hemoparásitos utilizados en este ensayo. Los microorganismos fueron detectados en frotis sanguíneos a los 21, 6 y 5 días para el *A. marginale*, *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente. Los anteriores períodos de prepatencia son similares o están dentro del rango promedio de los reportados por otros autores que han trabajado infecciones experimentales con estos hemoparásitos en diferentes partes del mundo (Toro *et al.*, 1993; Ribeiro *et al.*, 2001; Sacco *et al.*, 2001; Espinoza *et al.*, 2002). Sin embargo, vale acotar que Meléndez (2001) trabajando en Venezuela con una cepa virulenta de *A. marginale* (Zulia), reporta un período prepatente de 13 días. Para el caso de la *B. bigemina* y *B. bovis*, investigadores colombianos señalan períodos prepatentes de 8 y 12 días, respectivamente (Benavides *et al.*, 2000).

En ese mismo orden de ideas, se debe resaltar que la posible resistencia o susceptibilidad innata de los animales utilizados en los ensayos, así como el método de almacenaje, dosis y vía del inóculo del hemotrópico, puede influenciar la patencia de los mismos, y por consiguiente es un factor particularmente importante a considerar (Bock *et al.*, 1999). Simultáneamente a la visualización de los microorganismos, las temperaturas corporales de los animales de este ensayo, se elevaron de $38,7^\circ\text{C}$ en promedios a $41,8^\circ\text{C}$ temperatura máximo promedio, situación presentada

Cuadro 1. Respuesta fisiopatológica medida por intermedio del período de incubación, temperatura corporal y el hematocrito (Ht) en los becerros retados experimentalmente con los hemoparásitos (*A. marginale*, *B. bigemina* y *B. bovis*).

Parásito	Período Criopreservación (Años)	Dosis Inóculo (ml/IV)	Período Prepatente (Días)	Temperatura Máxima (°C)	\bar{x} Ht Pre Inf (l/l)	\bar{x} Ht Pos Inf (l/l)	↓ Ht (%)
<i>A. marginale</i>	26	10 ⁸	21	40	0,28	0,06	78,5
<i>B. bigemina</i>	10	10 ⁷	6	41,8	0,26	0,05	80,8
<i>B. Bovis</i>	7	10 ⁹	5	41,3	0,29	0,17	41,3

\bar{x} = Promedio; ↓ = Disminución

con la infección de *B. bigemina* (Cuadro 1). Las infecciones con los otros dos patógenos, *A. marginale* y *B. bovis* expresaron aumentos de temperatura de 40 y 41,3 °C, respectivamente. Los aumentos de temperaturas, concomitantemente con la disminución del hematocrito constituyen indicadores típicos del desarrollo de estas parasitosis, principalmente en los casos de anaplasmosis (Aso, 1987), sin embargo, para los casos de *Babesia* sp. debe tomarse en cuenta la virulencia de las cepas utilizadas en la replications experimentales, ya que algunos aislados o cepas producen disminuciones rápidas o moderadas de los parámetros clínicos como temperatura y hematocrito (González *et al.*, 1979). Con referencia a los Ht promedios de pre infección (Cuadro 1) se observa, que los valores oscilaron cercanos al límite inferior referencial, posiblemente debido al estado fisiológico (esplenectomía) de los animales utilizados para este trabajo. La bibliografía refiere valores entre 0,24 y 0,46 l/l, para condiciones fisiológicas normales (Jain, 1986). En el Cuadro 1 se evidenció, que los animales del experimento desarrollaron una fuerte disminución del Ht, una vez que se hizo presente la parasitemia en sangre circulante, alcanzando valores tan bajo como el caso de la *B. bigemina* (0,05 l/l; día 10 post inoculación). Los anteriores resultados difieren de los datos señalados por Mendonca *et al.* (2003) quienes trabajando con becerros de la raza Nelore e inoculados experimentalmente con *B. bigemina*, observaron una ligera disminución del Ht. Con referencia a la inoculación de criopreservado de *A. marginale*, se observó una reducción drástica en el Ht, con un valor

de 0,06 l/l para el día 21 post inoculación, situación que difieren moderadamente de los observados (0,10 l/l) por Toro *et al.* (1993), quienes trabajaron con aislados virulentos venezolanos de *A. marginale*. De tal manera, los datos manejados en el presente experimento, son consistentes con los señalados por diversos investigadores al considerar la reducción del Ht como el indicador más confiable para evaluar los signos clínicos del complejo “tristeza parasitaria bovina” (García *et al.*, 2000). En el mismo Cuadro 1 se señalan los descensos porcentuales de los Ht cuando se compararon los promedios de preinfección vs promedios de postinfección. Es de notar que para el caso del *A. marginale* y la *B. bigemina*, la disminución fue mayor del 50%, cifras que difieren con los valores referenciados en animales infectados experimentalmente con *A. marginale* por Montenegro *et al.* (1990), y Toro *et al.* (1988), Los cambios clínicos patológicos advertidos en los becerros retados con los hemoparásitos, fueron agudos (Cuadro 2), caracterizándose por fiebre, ictericia, aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, anorexia, salivación profusa, depresión, incoordinación (*A. marginale*, *B. bovis*), postración (*A. marginale*, *B. bovis*) y hemoglobinuria (*B. bigemina*). Las anteriores manifestaciones clínicas indicadas en este trabajo, coincidieron con las reportadas previamente por otros autores, trabajando con aislados/cepas venezolanas o extranjeras de los tres microorganismos (Richey y Palmer, 1990; Toro *et al.*, 1993; Espinoza *et al.*, 2002).

Cuadro 2. Reacción de los becerros esplenectomizados a la exposición con *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, determinada por los síntomas clínicos.

Parásito	Fiebre	Ictericia	Anorexia	Síntomas Respiratorios	Síntomas Nerviosos
<i>A. marginale</i>	X	X	X	X	-
<i>B. bigemina</i>	X	X (Hemoglobinuria)	X	-	-
<i>B. bovis</i>	X	X	X	-	X

Vieira *et al.* (2001) valorando la parasitemia, hematocrito y niveles bioquímico séricos en becerros esplenectomizados de la raza Nelore de seis meses de edad y retados por vía endovenosa con un criopreservado de *B. bigemina*, detectaron babesiosis clínica caracterizada por un cuadro febril, anemia, ictericia, además de hemoglobinuria. De manera similar, las susceptibilidad de otras especies de animales esplenectomizados a *Babesia* sp. y los signos fisiopatológicos desarrollados (fiebre, disminución del Ht), tal como en los equinos, lo han reportados otros autores (Cunha *et al.*, 1997). Adicionalmente, vale la pena destacar los resultados obtenidos por Blandino y Alonso (2004), al determinar en becerros Holstein de 6 – 10 meses inoculados con un aislado de *B. bovis*, una evolución clínica más severa, situación no presentada en este reporte al notarse en el animal retado con el mismo hemoparásito, un desarrollo patológico de ligero a moderado, al compararse con los síntomas generados por los otros dos aislados. En el caso de la anaplasmosis, el presente ensayo corroboró las informaciones previamente obtenida por Aso (1987), cuando estudio el comportamiento de becerros mestizos *Bos taurus* esplenectomizados.

CONCLUSIONES

Los anteriores aspectos clínicopatológicos obtenidos en estas inoculaciones experimentales con los hemoparásitos estudiados, confirman el poder patogénico de los criopreservados por mucho tiempo en el banco de aislados/cepas de hemoparásitos, lo cual permitirá la producción de antígenos en cantidad y calidad para análisis de rutina de estas enfermedades de interés zootécnico, desde el punto

de vista parasitológico, serológico y de biología molecular.

LITERATURA CITADA

- Araujo, F., C. Costa, C. Ramos, T. Farias, I. Souza, E. Melo, C. Elisei, G. Rosinha, C. Soares, S. Fragoso and A. Fonseca. 2008. IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 103(2): 186-190.
- Aso, P. 1987. Las alteraciones séricas de los bovinos durante la anaplasmosis. Trabajo de Ascenso. USB. Sartaneja. Venezuela.
- Benavides, E., O. Vizcaino, C. Britto, A. Romero and A. Rubio. 2000. Attenuated trivalent vaccine against babesiosis and anaplasmosis in Colombia. Ann. N. York. Acad. Sci. 916: 613-616.
- Blandino, T. y M. Alonso. 2004. Resistencia del ternero a *Babesia bovis* y protección frente a un aislamiento heterólogo. Rev. Salud. Anim. 26(2): 108-111.
- Bock, R., L. Jackson, A. De Vos and W. Jorgensen. 2004. Babesiosis of cattle. Parasitology. 129: 247-269.
- Bock, R., T. Kingston, N. Standfast and A. Vos. 1999. Effect of cattle breed on innate resistance to inoculations of *Babesia bigemina*. Aust. Vet. J. 77(7): 465-466.

- Cantó, G., J. Álvarez, E. Rojas, J. Ramos, J. J. Mosqueda, C. Vega y J. Figueroa. 2003. Protección contra babesiosis bovina con una vacuna mixta de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* derivada de cultivo in vitro bajo una confrontación de campo. Inmunización en un área libre de la enfermedad. Vet. Mex. 34(4): 323-332.
- Costa, V., A. Rodrigues, J. Medeiros, M. Labruna, S. Simoes e F. Riet-Correa. 2011. Tristeza parasitaria bovina no Sertao da Paraiba. Pesq. Vet. Bras. 31(3): 239-243.
- Cunha, C., S. Silva, A. Rodríguez e G. Guerreiro. 1997. Avaliacao do efeito da esplenectomia em equinos portadores e libres de *Babesia* spp. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 6(2): 157-160.
- De Oca, N., R. González, Y. Riverón, A. Núñez, A. Villoch y N. Rodríguez. 2008. Establecimiento y desarrollo de la colección de cultivos del CENSA. Rev. Salud. Anim. 30(1): 17-24.
- Espinoza, E., N. González y H. López. 2002. Hemoparásitos en becerros esplenectomizados bajo condiciones de pastoreo. Veterinaria. Trop. 27(2): 99-110.
- FAO. 1994. Protocolo para evaluar la seguridad y eficacia de los inmunógenos contra la anaplasmosis y babesiosis bovina. REDLAB. Santiago. Chile.
- Herrera, M., A. Soto, V. Urrego, G. Rivera, M. Zapata y L. Ríos. 2008. Frecuencia de hemoparásitos en bovinos del Bajo Cauca y Alto San Jorge, 2000-2005. Rev. MVZ. Córdoba. 13(3): 1486-1494.
- IICA. 1985. Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovinas. Publicación científica N° 8. Santiago. Chile.
- García, M., R. Torres, G. Hernández, G. Cantó y S. Rodríguez. 2000. *Anaplasma marginale*: Diferentes grados de virulencia en dos aislados mexicanos. Vet. Mex. 31(2): 157-160.
- González, E., R. Todorovic, G. López y O. García. 1979. Atenuación de una cepa de *Babesia* argentina (*Babesia bovis*) de origen colombiano. Revista ICA. 14(1): 33-39.
- Goncalves P. 2000. Epidemiología e control da tristeza parasitaria bovina na Regiao Sudeste do Brasil. Ciencia Rural. 30(1): 187-194.
- Jain, N. 1986. Schalm's Veterinary Hematology. 4^{ta} ed. Lea y Febiger. Philadelphia.
- Kuttler, K. 1986. Dynamics of *Anaplasma marginale* in splenectomised calves treated with either imidocarb or oxytetracycline. Trop. Anim. Hlth. Prod. 18: 91-96.
- Martins, N., C. Lobato, F. Salvarini, R. Silva, G. Costa, C. Lima, P. Pires e R. Assis. 2008. Viabilidade de *Tritrichomona foetus* apos congelamiento com diferentes crioprotectores. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 17(3): 161-162.
- Mendonca, C., D. Vieira, A. Kohayagawa, M. Schenk, C. Madruga e J. Afonso. 2003. Avaliacao clínica e hematológica em becerros Nelore infectados experimentalmente com isolados de *Babesia bigemina* das regioes Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil. Pesq. Vet. Bras. 23(2): 52-60.
- Meléndez, F. 2001. Evaluación de una vacuna de *Anaplasma centrale* contra la anaplasmosis bovina. Tesis de Maestría. Mención Patología. UCV-FCV. Maracay. Venezuela.
- Montenegro, S., M. Toro, E. León, B. Baek, A. Guillen y R. López. 1990. Inducción de inmunidad protéctica contra la anaplasmosis bovina usando un inmunógeno corpuscular purificado de *Anaplasma marginale*. Veterinaria trop. 15: 57-76.
- Richey, E. and G. Palmer. 1990. Bovine anaplasmosis. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. 12(11): 1661-1669.
- Ribeiro, M., E. Filho, L. Passos, H. Saturnino e M. Malaco. 2001. Quimioprofilaxia da babesiose bovina com diidroxitetraciclina de longa duracao. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53(1): 9-14.
- Sacco, A., R. Kessler e C. Madruga. 2001. Cepas atenuadas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e de *Anaplasma centrale* como imunógenos no controle da tristeza parasitaria bovina. 31(5): 849-855.

- Souza, P., C. Elisei, C. Soares y C. Massard. 2000. Criopreservación de Plasmodium (*Novyella*) *juxtenuclerae* con glicerol. Parasitol. Día. 24(1-2): 22-26.
- Toro, M., S. Montenegro, E. León, A. Guillen, R. Urbina, L. Llovera y M. Silva. 1993. Uso de una vacuna polivalente inactivada en la inmunización de bovinos contra la anaplasmosis y babesiosis. Veterinaria trop. 18: 23-37.
- Toro, M., S. Montenegro, E. León, R. López y M. Ristic. 1988. Babesiosis bovina: Efecto inmunoprotector de un exoantígeno de *Babesia bovis* (=B. argentina) obtenido mediante cultivo in vitro. Veterinaria trop. 13: 69-82.
- Vargas, M. y J. Patarroyo. 2004. Patofisiología de la infección por *Babesia bovis*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 13 (Supl 1): 48-52.
- Vieira, D., C. Mendonca, A. Kahayagawa, C. Madruga, M. Schenki e R. Kessler. 2001. Avaliações da parasitemia, dos hematócrito e dos bioquímico séricos, de bezerros nelore (*Bos indicus*), inoculados com isolados de *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893), das regiões sul, sudeste, centro-oeste, nordeste e norte do Brasil. Ciencia Anim. Bras. 2(2): 101-10.
- Vieira, D., C. Mendonça, A. Kahayagawa, C. Madruga, P. Bicudo, M. Schenki e R. Kessler. 2000. Avaliações da parasitemia, hematócrito e níveis enzimáticos de bezerros nelore (*Bos indicus*), inoculados com isolados de *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893), das regiões sul, sudeste, centro-oeste, nordeste e norte do Brasil. Ciencia Anim. Bras. 1(2): 127-135.