

5. DISCUSION

Diferentes sistemas de vacunación para proteger el ganado bovino contra la babesiosis y anaplasmosis han sido reportados en Colombia y otros países. La inoculación de parásitos vivos de Babesia spp. y Anaplasma marginale siguen siendo los métodos de inmunización más apropiados en el control de estas enfermedades. Se ha alcanzado una seguridad y eficiencia por medio de la atenuación y estandarización numérica de los parásitos (Callow, 1976; Ristic, 1976; González, et. al., 1976).

Los resultados de este trabajo en la fase de inmunización demostraron, que los sistemas de vacunación mono y bivalentes, presentaron reacciones pos-vacunales severas cuando fué incluida la cepa de Babesia bigemina con altos pasajes en animales esplenectomizados (Corrier, 1977). Los animales que fueron inoculados con Babesia bigemina unicamente (Grupo II) y los que se inocularon con Babesia bigemina y Babesia argentina (Grupo III), desarrollaron una infección aguda que fué controlada con agentes químicos* en dosis profilácticas para no producir una esterilización completa, fenómeno que afectaría el desarrollo de una buena inmunidad en estos animales (Callow y McGregor, 1970). Pese a la ayuda quimio-profiláctica un animal del Grupo II murió como consecuencia de una babesiosis aguda. Es importante anotar que la cepa de Babesia bigemina usada en este trabajo desde su aislamiento en 1971 ha sido pasada a través de animales esplenectomizados mostrando cada vez una potencialización de su poder patogénico. Una situación similar ha sido reportada en

* Ganaseg. E. R. Squibb & Sons Interamerican Corporation, N. Y., Cali, Colombia.

Australia por Callow (1975). El número de pasajes, que llevaba hasta la utilización en este trabajo era de 16. Ver Tabla 2.

Contradictoriamente la cepa de Babesia argentina, aislada el mismo año a través de pasajes en animales esplenectomizados, presentó una atenuación de su patogenicidad especialmente a partir del pasaje 23 según las investigaciones realizadas por González, et. al. (1978). En Australia fué reportado este fenómeno con una cepa de Babesia argentina de origen Australiano por Callow y Mellors (1966). La cepa de Babesia argentina usada en este trabajo fué inoculada a los animales del Grupo I en su pasaje 23. La reacción clínica a la infección pos-vacunal no fué severa, demostrándose sólo por la caída del hematocrito con un leve aumento de la temperatura corporal (Tabla 3, Figuras 1, 10 y 14). Pese a que ninguno de los animales fué controlado quimioterapéuticamente, no se presentaron muertes pos-inmunización en este grupo de animales. Sin embargo, en otras investigaciones realizadas con la misma cepa de Babesia argentina, recién aislada y purificada, se reporta que las pérdidas pos-inmunización pueden ser altas (González, et. al., 1978). Tanto las características de atenuación de la patogenicidad, de la cepa de Babesia argentina (pasaje 23), observadas en este trabajo, como las reacciones severas observadas con la misma, recién aislada por González, et. al. (1978), concuerdan con los resultados encontrados en Australia por Callow y Mellors (1966). Dado que los experimentos con la cepa de Babesia argentina, en la época que se utilizó en este trabajo no habían comprobado plenamente su atenuación. Se utilizó para la inmunización la dosis mínima infectiva, según el método reportado por González, et. al. (1976). El cual puede acarrear problemas al no desencadenar una reacción suficientemente fuerte para estimular inmunológicamente el 100% de los

animales vacunados. Dos de los animales del Grupo I inoculados con Babesia argentina no desarrollaron títulos a anticuerpos fijadores del complemento ni a anticuerpos fluorescentes en la fase pos-inmunización, presentándose la muerte de ellos en el desafío natural.

En forma contraria, la cepa de Babesia bigemina usada en este experimento, recién aislada y purificada en 1971 no presentaba características de alta patogenicidad según los hallazgos reportados por Vizcaino (1974).

La cepa de Anaplasma marginale usada en este experimento en los tres grupos experimentales, presentó una estandarización de su período prepatente (Tablas 1 y 23; Figuras 3, 6, 9, 13 y 16) en los 30 animales inoculados. Las reacciones clínicas pos-inmunización no fueron muy severas y se manifestaron por la caída del hematocrito con leve aumento de la temperatura. En ninguno de los animales las variaciones clínicas pos-vacunación fueron controladas químicoterapéuticamente, sin presentarse muertes por causa de la vacunación. Los resultados encontrados en este experimento confirman los hallazgos reportados por González, *et. al.* (1976). Según este autor, la estandarización de la dosis mínima infectiva, posee las siguientes ventajas: 1) Se conoce el período de incubación de los organismos usados en la preparación de los estabilizados. 2) En la mayoría de los casos, dada la reacción pos-vacunal moderada, no se requiere quimioterapia. 3) El uso de cepas locales elimina el riesgo de variación antigénica y evita la introducción de patógenos foráneos.

Las principales caracterizaciones epizootiológicas encontradas en la fase de exposición natural, como períodos prepatentes de los tres hemoparásitos concuerdan con inves-

tigaciones realizadas en otras zonas de Colombia y en otros países (Vizcaino, 1974; Riek, 1966). La aparición de Babesia argentina en el día 12 pos-desafío natural en los Grupos II y IV (desprotegidos contra Babesia argentina), la detección de Babesia bigemina en el día 17 en los Grupos I y IV (desprotegidos contra Babesia bigemina), y la presencia de larvas en el día 9 pos-desafío natural, demuestran que la Babesia argentina es transmitida por el Boophilus microplus en su fase larvaria y la Babesia bigemina en su fase de ninfa y adulto (Tabla 2).

El período de incubación del Anaplasma marginale en la exposición natural, en promedio, fué de 44 días en todos los animales. Si se considera que en el grupo hubo una alta mortalidad (80%) y que 20% de los animales requirieron quimioterapia, y si se relacionan estas observaciones con el período de incubación obtenido para Babesia argentina, es posible suponer que un alto porcentaje de las muertes se debió a este organismo. Además, el 45% de las muertes ocurrieron el día 17 de la descarga natural, cuando apenas empezaban a detectarse las primeras parasitemias por Babesia bigemina. El descenso del hematocrito en 50% del día 12 al 17 indica el efecto patógeno de la Babesia argentina. Los animales sobrevivientes (55%) quedaron en un estado de gravedad extrema para morir el día 22 de la descarga natural, fecha en la cual ocurrió el máximo nivel de parasitemia con Babesia bigemina. Esta serie de factores indican la participación de la Babesia bigemina en los efectos patológicos como un organismo oportunista. Los hallazgos de este trabajo, reafirman la baja patogenicidad de la Babesia bigemina a nivel de campo reportada por Vizcaino (1974). Igualmente, las evidencias epidemiológicas que se reflejan en esta investigación, concuerdan con el estudio epidemiológico realizado en el Valle del Cauca por González, et. al. (1978) en el

cual reportan que la mayoría de los casos agudos en las fincas estudiadas fueron causados por la Babesia argentina.

En términos generales, estos fenómenos epidemiológicos en los cuales se manifiesta que la Babesia bigemina posee una escasa patogenicidad a nivel del campo (Tabla 12) no contradicen los hallazgos reportados en Bolivia por McCosker (1975) sobre la baja patogenicidad de la Babesia bigemina. Las investigaciones realizadas en Australia reafirman esta situación epidemiológica del bajo poder patogénico de la Babesia bigemina (Callow, 1975).

Dada la gran mortalidad por babesiosis en los animales susceptibles (Grupo IV), la evaluación de la infección natural causada por el Anaplasma marginale, sólo fué estudiada en los animales tratados contra esa enfermedad. Con la ayuda quimioterapéutica, estos animales resistieron hasta la presentación del Anaplasma marginale en el día 44. Este organismo se replicó fuertemente en los terneros, causando enfermedad clínica grave y postración. Por esta razón, se hizo necesario el tratamiento con Oxitetraciclina HCL*, para evitar mortalidad. Esto demuestra el poder del Anaplasma marginale como un agente agresor, causante de un gran número de muertes y casos clínicos agudos a nivel de campo (González et. al., 1978; Zaraza, et. al. 1971).

La caracterización de las respuestas inmunes y el margen de protección de los métodos mono y bivalentes de vacunación contra la babesiosis aplicados en este experimento, demuestran la efectividad de los diferentes sistemas para prevenir una alta mortalidad en animales susceptibles que

* Emicina líquida. PFIZER. División Agrícola Veterinaria, Bogotá, Colombia.

vayan a ser trasladados de zonas libres a zonas endémicas de la enfermedad.

Los resultados encontrados con el método monovalente, a base de Babesia argentina, con dosis mínimas infectivas, en los animales del Grupo I, determinaron una protección del 80% en términos de mortalidad. Los síntomas clínicos se atenuaron y sólo se manifestaron por la caída del hematocrito y un incremento leve de la temperatura. Las dos muertes que se presentaron en este grupo coincidentalmente fueron en los dos animales que no presentaron títulos en la fase de vacunación. Uno de los animales murió en el día 17 del desafío natural a causa de la Babesia argentina, ya que la Babesia bigemina se detectó en este grupo sólo a partir de este día y los resultados de la necropsia revelaron una severa invasión de Babesia argentina en los capilares del cerebro. El estado clínico del otro animal, que murió en los días posteriores, era de extrema gravedad en el día 17, por lo cual no resistió la descarga de Babesia bigemina en los días consecutivos. Las altas parasitemias de Babesia bigemina en el torrente circulatorio demuestran que la protección de animales vacunados con Babesia argentina es efectiva contra la Babesia bigemina. Lo anterior ha sido comprobado en Australia a nivel experimental y en la aplicación de los programas de control (Callow, 1975). A la luz de las experiencias actuales esta protección se podría explicar inmunológicamente, por reacciones de inmunidad cruzada, las cuales han sido detectadas por métodos serológicos (Brocklesby, et. al., 1971; Leeflang y Perie, 1972; Godman y Rosemberg, 1974). Este hecho confirmaría la presencia de antígenos comunes entre las diferentes especies de Babesias y aún entre familias de hemoparásitos (Cox y Milar, 1968; Ludford, et. al., 1972; Todorovic, 1971).

El otro sistema monovalente de vacunación, a base de Babesia bigemina, utilizado con los animales del Grupo II, confirió una protección del 90% a los animales, en términos de mortalidad contra la infección natural de Babesia argentina. Este organismo afectó a los animales a partir del día 12 del desafío natural, con las primeras parasitemias las cuales se mantuvieron hasta el día 22. Los síntomas clínicos estuvieron representados por la caída del hematocrito y el incremento de la temperatura en el período de replicación de la Babesia argentina. Las primeras parasitemias de Babesia bigemina fueron detectadas el día 20 pos-desafío natural desapareciendo el día 37 de la misma. En este período, no se evidenciaron síntomas clínicos en los sobrevivientes, los cuales se recuperaron progresivamente.

Estos resultados demuestran que la protección de animales susceptibles por medio de la vacunación con cepas de Babesia bigemina es efectiva contra la infección natural causada por la Babesia argentina. Estos hallazgos a nivel de campo afirman los resultados a nivel de laboratorio reportados por Vizcaino (1974). Lo anterior demuestra que existen fenómenos inmunológicos de protección cruzada, en forma recíproca entre las especies de Babesias estudiadas en este trabajo.

El comportamiento ante el desafío natural de los animales del Grupo III (inmunizados con cepas de Babesia argentina y Babesia bigemina) fué óptimo. Se obtuvo una protección del 100% en términos de mortalidad, con manifestaciones clínicas sólo evidentes a nivel de laboratorio por la caída del hematocrito y sólo en el período de replicación de la Babesia argentina. En el período de replicación de la Babesia bigemina no se manifestaron síntomas clínicos de ninguna clase. Esta protección tan completa podía explicarse por el

nivel de títulos de anticuerpos tan elevados para los dos hemoparásitos antes del período prepatente, los cuales mostraron diferencias significativas respecto a los sistemas monovalentes usados en este experimento. Callow (1976) reporta los beneficios de reforzar los animales vacunados con descargas antigénicas heterólogas, antes de ser expuestos a la infección natural. Este concepto explicaría la efectiva protección obtenida en los animales del Grupo III.

Los animales de los tres grupos experimentales inmunizados con Anaplasma marginale y que resistieron la descarga natural de las Babesias, en el período prepatente y replicativo del Anaplasma marginale, presentaron una óptima protección contra la anaplasmosis. El período infectivo transcurrió sin manifestaciones clínicas de ningún tipo. Lo anterior corrobora la efectividad del método de la dosis mínima infectiva reportado por González, et. al., (1976).

En base a la alta mortalidad presentada por los animales no protegidos contra el complejo morbosos denominado "fiebre de garrapatas" por Velásquez (1938), y la óptima protección de los animales inmunizados contra la babesiosis y anaplasmosis bovina, con los diferentes sistemas de inmunización realizados en este trabajo, no resulta difícil determinar si hace falta o no la vacunación para proteger el ganado bovino importado o trasladado de regiones libres de estas entidades clínicas a zonas endémicas, cuando las pérdidas por la movilización de estos animales oscila entre un 50 a 70% de los bovinos no protegidos. Decidir cual sistema de inmunización utilizar aún en zonas de inestabilidad enzoótica, es algo riesgoso todavía, especialmente en países en desarrollo donde no se ha realizado una identificación exacta del hemoparásito o hemoparásitos causantes de pérdidas importantes, ya que las similitudes morfológicas entre la Babesia

bigemina y la Babesia argentina y la falta de experiencia en interpretar los ciclos epidemiológicos contribuyen a que se llegue a diagnósis incorrectas. Aún en países desarrollados, bovinos susceptibles protegidos por diferentes métodos de inmunización, cuando han sido expuestos por primera vez a un desafío natural (B. microplus), han muerto como consecuencia de las garrapatas "per se", atribuyendo el fracaso a los métodos de vacunación. Esto mismo sucedió en Bolivia, cuando 80 Herefords importados murieron de anemia aguda a raíz de una repentina y fuerte infestación de garrapatas (Callow, 1976).

Los resultados de esta investigación indican que de los 3 sistemas de vacunación utilizados en este experimento, el que mayores ventajas reportó, tanto en el período de inmunización como en el desafío natural, fué el sistema monovalente con Babesia argentina. Dada la seguridad que ofreció en la vacunación, al no presentar reacciones pos-vacunales severas, como los otros dos sistemas que requirieron tratamiento quimioterapéutico para evitar una alta mortalidad, presentando al mismo tiempo un grado de protección aceptable en el desafío natural.

En nuestro país, como resultado de exhaustivas investigaciones, podríamos asumir por evidencias epidemiológicas, experiencias de campo y laboratorio, y la corroboración que en la naturaleza la primera infección que afecta a los animales es la determinada por Babesia argentina, que este organismo es el principal patógeno de la entidad clínica conocida como babesiosis. La comprobación experimental de poseer una cepa atenuada de Babesia argentina por González et. al. (1978) y los conocimientos epidemiológicos actuales, abrigan la esperanza de emprender programas de control prácticos, luego de comprobar la efectividad de la vacuna atenuada en otras regiones del país.

6. RESUMEN

Un total de 40 terneros Holstein-Friessian de un año de edad aproximadamente, procedentes de zonas libres de garrapatas, fueron utilizados para evaluar varios sistemas de inmunización contra babesiosis y anaplasmosis bovina con vacunas o estabilizados a base de organismos vivos. Los animales fueron divididos en 3 grupos experimentales y uno control, de 10 animales cada uno. Grupo I: 10 terneros se inmunizaron con Anaplasma marginale y Babesia argentina. Grupo II: 10 terneros se inmunizaron con Anaplasma marginale y Babesia bigemina. Grupo III: 10 terneros inmunizados con Anaplasma marginale, Babesia argentina y Babesia bigemina. Grupo IV: 10 terneros controles (sin protección).

El experimento se realizó en una primera fase evaluando la descarga pos-vacunal en términos de morbilidad y mortalidad de los sistemas mono y bivalentes de vacunación contra la babesiosis con cepas de Babesia argentina y Babesia bigemina aisladas en Montería (Colombia) con 23 y 16 pasajes por terneros esplenectomizados respectivamente. En la segunda fase se evaluó el grado de protección de los diferentes sistemas de vacunación al exponer los animales a una descarga natural de garrapatas (Boophilus microplus) en una finca del Valle del Cauca (Colombia).

Los resultados de este trabajo en su primera fase demuestran que el uso de estabilizados o vacunas a base de parásitos vivos de Babesia argentina, Babesia bigemina y Anaplasma marginale con las cepas mencionadas, presentaron reacciones pos-vacunales severas sólo cuando fué incluida la Babesia bigemina. Los Grupos II y III desarrollaron una infección aguda que fué controlada quimioterapéuticamente. Las respues-

tas pos-vacunales del Anaplasma marginale y la Babesia argentina se manifestaron por una caída del hematocrito con incremento de la temperatura sin desencadenar síntomas agudos por lo cual no se utilizó el control quimioterapéuticamente.

En la segunda fase del experimento, a las 8 semanas de exposición natural, se encontraron los siguientes resultados: Grupo I: alcanzó una protección del 80% de los animales. [Las muertes presentadas fueron desencadenadas por Babesia argentina.] Grupo II: logró una protección del 90%. [La muerte producida fué causa de la asociación de Babesia argentina y Babesia bigemina.] Grupo III: presentó una protección del 100% de los animales. El Grupo IV (Control): presentó una mortalidad del 80%, [tratándose quimioterapéuticamente el 20% restante de los animales contra babesiosis y anaplasmosis para evitar mayor mortalidad.]

Estos resultados indican que las cepas de Anaplasma marginale y Babesia argentina, usando una dosis mínima infectiva, no presentaron reacciones de pos-vacunación severas, comportándose con una efectiva seguridad, al contrario de lo sucedido con la cepa de Babesia bigemina, que se mostró muy patógena. [Este comportamiento patógeno de la Babesia bigemina fué desarrollado a causa de los pasajes realizados con ella en terneros esplenectomizados por lo cual no se recomienda su uso para la preparación de vacunas.]

En su aspecto protectivo los resultados indican, que en las condiciones subtropicales del Valle del Cauca, la protección obtenida por los sistemas mono y bivalentes de vacunación con Babesias, es efectiva para prevenir una alta mortalidad de animales susceptibles que vayan a ser trasladados de zonas libres a zonas endémicas de babesiosis y anaplasmosis bovina. La protección conferida por los sistemas mono-

valentes de vacunación con Babesia argentina y Babesia bige-
mina corroboran los fenómenos de protección cruzada observa-
dos en otras investigaciones.

7. SUMMARY

Forty Holstein-Friessian calves approximately a year of age, coming from tick free areas, were used to evaluate several immunization systems to prevent babesiosis and anaplasmosis, using vaccines or stabilates with live organisms. Animals were divided in four groups with ten animals each. Group I: Ten calves immunized against Anaplasma marginale and Babesia argentina. Group II: Ten calves immunized against Anaplasma marginale and Babesia bigemina. Group III: Ten calves immunized against Anaplasma marginale, Babesia argentina and Babesia bigemina. Group IV: Ten control calves (without protection).

The experiment was carried out in two stages. In stage one, the animals were evaluated using the post-vaccinal challenge and using morbidity and mortality to measure resistance against babesiosis. Strains of Babesia argentina and Babesia bigemina isolated both from Montería (Colombia) were used. They had 23 and 16 passages through splenectomized calves respectively. In the second phase of the experiment, the degree of protection was evaluated, exposing the animals to a natural challenge using Boophilus microplus ticks in a private farm in the Valle del Cauca (Colombia).

The first stage of the work showed that, there were only severe post-vaccinal reactions when Babesia bigemina was included using live organisms. Group II and III developed acute infection that was controlled with chemotherapy. The reactions for Anaplasma marginale and Babesia argentina were evident by a drop in hematocrit and increase temperature without any acute symptoms. As a consequence no chemotherapy was utilized.

BIBLIOTECA AGRPECUARIA
DE COLOMBIA

In the second phase of the experiment, the following results were obtained, 8 weeks after the natural challenge. Group I: there was an 80% protection of the animals. Deaths were a consequence of Babesia argentina infection. Group II: a 90% protection was obtained. Deaths were due to the association of Babesia argentina and Babesia bigemina. Group III: 100% protection was obtained. Group IV: (Control): a mortality of 80% was obtained. The remaining 20% of the animals were treated against babesiosis and anaplasmosis to prevent more losses.

The results indicate that the Anaplasma marginale and Babesia argentina strains did not show a severe post-vaccinal reaction using a minimum infective dose in contrast with Babesia bigemina strain that appeared highly pathogenic. It is possible that the pathogenicity of the Babesia bigemina strain was intense due to the passage through splenectomized calves. This strain is not recommended for using in vaccines.

The results also indicate that in the conditions of the subtropical areas of the Valle del Cauca the protection given by the mono and bivalente Babesia vaccines, are equally effective in preventing high mortality in susceptible animals. This is especially important in animals that are going to be moved from free zones to endemic zones for babesiosis and anaplasmosis. The protection obtained in the monovalent vaccination with Babesia argentina from Babesia bigemina agree with the cross protection phenomena observed in other investigations.

BIBLIOGRAFIA

1. AMERAULT, T.E. and ROBY, T.O. A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. *J.A.V.M.A.* 153: 1828-1834. 1968.
2. ARAGON, R.S. Bovine babesiosis. A review. *Veterinary Bulletin.* 46: 903-917. 1976.
3. BABES, V. Sur L'Hemoglobinuria Bacterienne de Boeufs. *Comp. Rend. Acad. Sci., T-07*: 692-698. 1888.
4. BISHOP, J.P.; THOMPSON, K.C. y CORRIER, D.E. Aislamiento y preservación de Babesia bigemina del Valle del Sinú. *Memorias del VIII Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Cucuta, Colombia.* 1971.
5. _____. and ADAMS, L.G. Combination thin and thick blood films for the detection of Babesia parasitemia. *Am. J. Vet. Res.* 34: 1213-1214. 1973.
6. _____. and ADAMS, L.G. Babesia bigemina: immune response of cattle inoculated with irradiated parasites. *Exp. Parasit.* 35: 35-43. 1974.
7. BLOOD, D.C. y HENDERSON, J.A. *Medicina Veterinaria.* 2a. Ed. México, Editorial Interamericana, S. A. pp. 624-628. 1965.
8. BRAM, R. Enfermedades del ganado transmitidas por las garrapatas y sus vectores. *Rev. Mundial de Zootecnia.* 16: 1-5. 1975.
9. BROCKLESBY, D.W.; PURNELL, R.E. and SELLWOOD, S. A. The effect of irradiation on intraerythrocytic stages of Babesia mayor. *Br. Vet. J.* 120: 3-5. 1972.
10. CALLOW, L.L. and MELLORS, L.T. A new vaccine for Babesia argentina infection prepared in splenectomized calves. *Aust. Vet. J.* 42: 464-465. 1966.
11. _____. and TAMMEMAGI, L. T. Vaccination against bovine babesiosis. Infectivity and virulence of blood from animals either recovered or reacting to Babesia argentina. *Aust. Vet. J.* 43: 249-256. 1967.

12. CALLOW, L.L. Sterile immunity, coinfectious immunity and differences in Babesia bigemina infections. Parasitology, 57: 455-465. 1967.
13. _____.; QUIROGA, Q. C. and MACCOSKER, P.J. Serological comparison of Australian and South American strains of Babesia argentina and Anaplasma marginale. International Journal for Parasitology. 6(4): 307-310. 1976.
14. CORRIER, D.E. A clinical, serological and pathological study of concurrent anaplasmosis and babesiosis in experimentally infected calves. M.S. Thesis, Texas A&M University, College Station, Texas.
15. _____. The epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in the lowland tropics of Colombia. Memorias del Seminario de Hemoparásitos, CIAT, Marzo 17-22. 1975.
16. _____. and GONZALEZ, E.F. Protocol for the preparation of Anaplasma and Babesia stabilates. Protocolo Interno, Sección de Salud Animal, CIAT. 1975.
17. _____.; GONZALEZ, E.F. and BETANCOURT, A. Current information on the epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Colombia. Sci. Proc. Conference on tick borne diseases and their vectors. University of Edinburg, Scotland. 1976.
18. _____. Comunicación personal. 1977.
19. _____. and GUZMAN, S. The effect of natural exposure to Anaplasma and Babesia infections on native calves in an endemic area of Colombia. Trop. Anim. Hlth. Prod. 9: 47-51. 1977.
20. COX, H.W.; MILAR, R. and PATTERSON, S. Serologic cross-reactions of serum antigens associated with acute plasmodium and Babesia infections. Am. J. Trop. Med. Hyg. 17: 13-18. 1968.
21. CURNOW, J.A. In vitro agglutination of bovine erythrocytes infected with Babesia argentina. Nature, Lond. 217: 267-268. 1968.
22. DENEV, I. and KYURTOV, N. The complement fixation test in haemosporidial infections of cattle. I. Babesia bigemina antigen and its use for testing for piroplasmosis. Vet. Med. Nauki, Sof. 4(5): 93-97. 1967.

23. DURANOV, V.S. Action of ionizing radiation on Babesia ovis in vitro and in the tick vector in "Raboty molodykh uchenykh". Edited by Rostostset, M.F. Moscow IZD. Kolos: 365-370. 1968
24. FRERICHS, W.M.; JOHNSON, A.J and HOLBROOK, A.A. Equine piroplasmosis: attempts to infect laboratory animals with Babesia equi. Am. J. Vet. Res. 30: 1333-1336. 1969.
25. GOLDMAN, M. and ROSENBERG, A.S. Immunofluorescence studies of the small Babesia species of cattle from different geographical areas. Res. Vet. Sci. 16: 351-354. 1974.
26. GONZALEZ, E.F.; TODOROVIC, R.A. y ADAMS, L.G. Ultraestructura de la Babesia bigemina. Revista ICA, 6: 112. 1971.
27. _____.; TODOROVIC, R.A. and THOMPSON, K.C. Immunization against anaplasmosis and babesiosis: Part I. Evaluation of immunization using minimum infective doses under laboratory conditions. Zeitschrift. fur Tropenmedizen und Parasitologie. 27: 427-437. 1976.
28. _____.; TODOROVIC, R.A. and LONG, R.F. Comparación de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta, fijación del complemento y aglutinación en tarjeta para el diagnóstico de Anaplasmosis Bovina. Trabajo presentado en el VIII Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria, Santo Domingo, República Dominicana. 1977.
29. _____.; CORRIER, D.E.; TODOROVIC, R.A. and LOPEZ, G. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in the Cauca River Valley. Revista ICA (accepted). 1978.
30. _____.; TODOROVIC, R.A.; LOPEZ, G. and GARCIA, O. Attenuation of a Babesia argentina isolated of Colombian origin. Scientific Proceedings World Congress of Buiatric, México. 1978.
31. HIRATO, K.; NINOMIYA, N.; UWANO, Y. and KUTIL, T. Studies on the complement fixation reaction for equine piroplasmosis. Japanese Journal of Veterinary Science. 7: 204-205. 1945.

32. JOHNSTON, L.A.; TRUEMAN, K.F. and PEARSON, R. Bovine babesiosis: comparison of fluorescent antibody and Giemsa staining in post-mortem diagnosis of infection. *Australian Veterinary Journal*. 53(5): 222-226. 1977.
33. KUTTLER, K.L.; ADAMS, L.G. and ZARAZA, H. An epidemiological and geographic survey of Anaplasma marginale and Trypanosoma theileri in Colombia. *J. Amer. Med. Ass.* 154: 1398. 1969.
34. LEEFLANG, P. and PERIE, N.M. Comparative immunofluorescent studies on 4 Babesia spp. of cattle. *Res. Vet. Sci.* 13: 342-346. 1972.
35. LEGG, J. A brief review of the piroplasms with special reference to the types found in Australia. *Aust. Vet. J.* 9: 9-14. 1933.
36. LIGNIERES, J. La piroplasmose bovine. Nouvelles recherches et observations sur la multiplicité des parasites, leur involution, la transmission naturelle de la maladie et la vaccination. *Arch. Parasit.* 7: 398. 1903.
37. LOHR, K.F.; ROSS, J.P.J. and MEYER, H. Studies on homologous and heterologous antibody response to infections with Anaplasma marginale and A. centrale using the indirect fluorescent antibody and capillary tube agglutination tests. *Zeits. Chirft. fur Tropenmedizin und Parasitologie.* 34: 86-95. 1973.
38. LOPEZ, G. and TODOROVIC, R. A. Rapid latex agglutination (RLA) test for the diagnosis of Babesia argentina. *Veterinary Parasitology.* 4: 1-9. 1978.
39. LOZANO, A.F. Patogénesis de la babesiosis bovina ocasionada por la Babesia bigemina. M. S. Thesis. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. 1971.
40. LUDFORD, C.G.; HALL, W.T.K.; SULZER, A.J. and WILSON, M. Babesia argentina, plasmodium falciparum: antigenic cross-reactions. *Expl. Parasit.* 32: 317-326. 1972.
41. MAHONEY, D.F. and SAAL, J.R. Bovine babesiosis: thick blood films for the detection of parasitemia. *Aust. Vet. J.* 37: 44-47. 1961.

42. MAHONEY, D.F. Bovine babesiosis: diagnosis of infection by a complement fixation test. Aust. Vet. J. 38: 48-52. 1962.
43. _____. Circulating antigens in cattle infected with Babesia bigemina or Babesia argentina. Nature, 211(5047): 422. 1966.
44. _____. Immune response to hemoprotozoa. Immunity to animal parasites. Edited by Soulsby, E.J. New York and London, Academic Press. pp. 370-380. 1972.
45. _____. and GOODGER, V.B. Babesia argentina. Immunogenicity of plasma from infected animals. Experimental Parasitology. 32: 71-85. 1972.
46. _____. and ROSS, D.R. Epizootiological factor in the control of bovine babesiosis. Aust. Vet. J. 48: 298. 1972.
47. _____. Babesiosis of cattle. Australian Meat Research Committee Review. 12: 1-21. 1973.
48. McCOSKER, P.J. Control of piroplasmosis and anaplasmosis in cattle. A practical manual. pag. 64. Roma, FAO. Sanidad Animal, Bolivia. 1975.
49. MERINO, N.; RODRIGUEZ, O.; TORROELLA, E. and RENAUD, J. Histopatología del hígado en la anaplasmosis y la babesiosis bovina. Rev. Cub. Cienc. Vet. 7: 9-14. 1976.
50. MOTT, L.O. and GATES, D. Production of an antigen for anaplasmosis complement-fixation tests. Vet. Med. 44: 296-299. 1949.
51. RIEK, R.F. The development of Babesia spp. and Theileria spp. in ticks, with special reference to those occurring in cattle. In "Biology of Parasites" (E.J.L. Soulsby, Ed.). N. Y. Academic Press, 15-32. 1966.
52. _____. Babesiosis: In "Infectious Blood Diseases of Man and Animals". Vol. 1, 2a. Edición. Edited by Weinman and Ristic. New York, Academic Press. pp. 219-268. 1969.
53. RISTIC, M.; OPPERMAN, J.; SIBINOVIC, S. and PHILLIPS, T.N. Equine piroplasmosis: a mixed strain of Piroplasma caballi and Piroplasma equi isolated in Florida and studies by the fluorescent antibody technique. Am. J. Vet. Res. 25: 15-23. 1964.

54. RISTIC, M. Immunity to parasitic animals. New York. Edited by Jackson, J. B.; Herman, R. and Singer, I. Published by Appleton Century. Crofts. Meredith Co. Vol. 2: 831-870. 1970.
55. _____. Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on the use of the attenuated Anaplasma marginale vaccine. Seminario sobre hemoparásitos, CIAT, Marzo 17-22, Cali, Colombia. 1975.
56. _____. Immunologic systems and protection in infections caused by intracellular blood protista. Veterinary Parasitology. 2: 31-47.
57. ROMAN, G. Premunición en bovinos contra infecciones por hemoparásitos. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (Colombia). 14: 1-32. 1944.
58. ROGERS, R.J. Observations on the pathology of Babesia argentina infections in cattle. Aust. Vet. J. 47: 242-247. 1971.
59. ROSS, J.P.J. and LOHR, K.F. Serologic diagnosis of Babesia bigemina infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. Res. Vet. Sci. 9: 557-562. 1968.
60. SCHALM, O.W. Veterinary Hematology. 2a. Ed. Philadelphia. Edited by Lea and Febriger. pp. 34-87. 1967.
61. SEDDON, H.R. Diseases of domestic animals in Australia. Part. 4. Protozoan and Viral Diseases. Sev. Publ. Comm. Dept. Hlth. Aust. No. 8. 1952.
62. SERGENT, E.; PARROT, L. and DONATIEN, A. Une question of terminologie: Immunizer et premunir. Bull. Soc. Path. Exot. 17: 37-38.
63. _____. Latent infection and premunition. Some definitions of microbiology and immunology. In "Immunity to protozoa". Oxford. Edited by P.C.C. Garnham, A. E., Pierce and I. Roitt. pp. 39-47. 1963.
64. SIBINOVIC, S.; SIBINOVIC, K.H. and RISTIC, M. Equine babesiosis: Diagnosis by bentonite agglutination and passive hemagglutination tests. American Journal of Veterinary Research. 30: 691-695. 1969.

65. SNEDCCOR, G. and COCHRAN, W. Statistical methods. 6th Ed. Iowa State University Press. pp. 170-182. 1967.
66. SPRENT, J.F.A. Parasitism. Univ. Queensland Press, Brisbane, Australia. pp. 31-33. 1963.
67. SUTER, E. and RAMSEIR. Cellular reactions in infection. *Advances Immun.* 4: 117.
68. TALIAFERRO, W.H. and STAUBER, L.A. Immunology to protozoan infections. In "Research in Protozoology". New York, Edited by T.T. Chen. 3: 506-564. 1969.
69. TODOROVIC, R.A.; ADAMS, L.G. and ROBERTS, D. A study of bovine babesiosis in Colombia, South America. *Sci. Proc. 106th AVMA. Annual Meeting, Minneapolis, Minn., Journal Am. Vet. Med. Ass.* 154: 1399. 1969.
70. _____.; GONZALEZ, E.F.; MATEUS, V.G. and ADAMS, L.G. Simultaneous control of hemotropic and intestinal parasites. *Rev. de Med. Vet. y Zootecnia de la Universidad Nacional.* 33: 47-58. 1971.
71. _____.; VIZCAINO, O.G. and ADAMS, L.G. Determinación de anticuerpos de *Babesia* por la técnica de la fijación del complemento. *Revista ICA.* 6: 213-233. 1971.
72. _____ and KUTTLER, K.L. A babesiosis card agglutination test. *Am. J. Vet. Res.* 35: 1347-1350. 1974.
73. _____ and GONZALEZ, E.F. a. Inmunización contra babesiosis bovina con vacuna a base de parásitos muertos. *Revista del Instituto Agropecuario.* 10: 87-99. 1975.
74. _____ and GONZALEZ, E.F. b. Inmunización contra babesiosis bovina con vacunas a base de parásitos vivos. *Revista del Instituto Colombiano Agropecuario.* 10: 243-254. 1975.
75. _____ y TELLEZ, C.H. The premunition of adult cattle against babesiosis and anaplasmosis in Colombia, South America. *Trop. Anim. Health and Prod.* 7: 125-131. 1975.
76. _____ and LONG, R.F. Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) test for diagnosis of *Babesia* spp. infections in Colombian cattle. *Zeitschrift fur Tropenmedizin und Parasitologie.* 27: 169-181. 1976.

77. THOMPSON, K.C.; TODOROVIC, R. A. and HIDALGO, R. J. Antigenic variation of Babesia bigemina. Research in Veterinary Science. 23: 51-54. 1977.
78. UHR, J.W. La membrana del linfocito. Tribuna Médica. 56(256): 1-6. 1977.
79. USDA. A microtiter technique for the complement fixation test for anaplasmosis. Animal and Plant Health Inspection Service, Beltsville, Maryland. 1974.
80. UTTERBACK, W.W.; STEWART, L.M. y FRANTI, C.E. Epidemiologic aspects of anaplasmosis in northern California cattle. Proceedings of U.S. Animal Health Assoc. pp. 73-79. 1976.
81. VIZCAINO, O.G. Caracterización de los antígenos de Babesia argentina, Babesia bigemina, por los métodos de fijación del complemento, inmunodifusión, inmunoelectroforesis e inmunidad cruzada. M.S. Thesis, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. pp. 96-133. 1974.
82. VELASQUEZ, J.Q. Contribución al estudio de la piroplasmosis de los animales domésticos en Colombia. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Colombia. 72: 67-108. 1938.
83. ZWART, D.; VAN DEN ENDE, M.C.; KOVWENHOVEN, B. and BUYS, J. The difference between B. bigemina and Dutch strain of B. major. Tijdschrift voor Diergeneeskunde. 93: 126-140. 1968.