

# PREVALENCIA DE BABESIOSIS BOVINA EN EL SECTOR CUATRO (PLAYA BONITA) DEL MUNICIPIO MARA

## Prevalence of bovine babesiosis in Sector Cuatro (Playa Bonita), Mara County

David A. Simoes Campos\*  
 Angel R. Chirinos Rodríguez\*  
 Nelly S. Martínez de Chirinos\*  
 Osiris Castejón\*  
 José P. Avila\*\*

\* Facultad de Ciencias Veterinarias  
 Universidad del Zulia  
 Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

\*\* Ministerio de Agricultura y Cría  
 SASA- Zulia  
 Maracaibo, Venezuela

### RESUMEN

Se seleccionaron al azar 9 fincas con una población bovina de 3.395. Se analizaron muestras séricas mediante la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta y se comparó el diagnóstico con la observación de frotis teñidos con Diff Quick Stain. De 128 sueros bovinos 69 (53,9%) resultaron positivos para *Babesia bigemina* y 66 (51,6%) positivos para *Babesia bovis*, mientras que con frotis teñidos se observó 38 (29,6%) y 31 (24,2%) casos positivos, respectivamente. El análisis estadístico revela que existen diferencias altamente significativas ( $P < 0,001$ ) entre los dos métodos utilizados, diferencia que está a favor del método de Inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos indican la magnitud de la enfermedad en la zona norte del Estado Zulia y señalan la necesidad de desarrollar y utilizar las técnicas serológicas en la determinación de la Prevalencia de la Babesiosis bovina, para obtener de esta forma mayor protección y control contra la enfermedad.

**Palabras claves:** Babesia, babesiosis, prevalencia.

### ABSTRACT

Nine farms were selected at random with 3.395 bovines. Sera samples were analyzed through the Indirect Immunofluorescence Technique and the diagnostic was compared with the observation of dyeing smear with Diff Quick Stain. From 128 bovines sera 69 (53,9%) were positives to

*Babesia bigemina* and 66 (51,6%) positives to *Babesia bovis*, while with dyeing snerv were observed 38 (29,6%) and 31 (24,2%) positives cases respectively differences ( $P < 0,001$ ) between both used methods, difference at favor of the Inmunefluorescence method. The obtained results show the disease's magnitude at the northern of Zulia State and sign the necessity of the development and utilize the serologic techniques to the determination of the Prevalence of Bovine Babesiosis in order to obtain higher protection and control against the disease.

**Key words:** Babesia, babesiosis, prevalence.

### INTRODUCCIÓN

La Babesiosis es una enfermedad producida por un protozooario perteneciente al género *Babesia* del cual en nuestro medio existen dos especies de interés para el ganado vacuno. *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, agentes hemotrópicos que parasitan los eritrocitos de los bovinos infestados donde se multiplican, dando origen a una serie de procesos patológicos caracterizados por fiebre, anorexia, ictericia, hemoglobinuria, anemia, postración y muerte de los animales.

Desde el punto de vista epidemiológico, las Babesias están interrelacionadas con la garrapata *Boophilus microplus* quien es el único vector de la enfermedad en nuestro país. La Babesiosis está ampliamente difundida en los rebaños bovinos de las zonas tropicales y sub-tropicales donde prevalece la garrapata tropical del bovino [12,24,26,27], ocasionando grandes

pérdidas económicas debido a la disminución de la producción láctea, retardo en el crecimiento y engorde de los animales afectados, muerte de los animales, así como gastos extras en atención veterinaria y control de la enfermedad.

El diagnóstico de la Babesiosis a nivel de campo, en la mayoría de los casos, está basado en la sintomatología clínica y en la observación del parásito mediante frotis de sangre periférica y capilar, teñidos con Wright-Giemsa y últimamente, a través de la observación de frotis sanguíneos teñidos con Diff Quick Stain que permite efectuar la coloración del frotis sanguíneo en menor tiempo, efectuando así el diagnóstico mucho más rápido en la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, existen pruebas serológicas indirectas más sensibles, las cuales permiten determinar si un animal ha estado expuesto a estos parásitos sanguíneos, pruebas estas que se basan en la detección de los niveles de anticuerpos presentes en el suero bovino.

Al revisar la literatura nacional e internacional nos encontramos que una de las pruebas más sensibles es la I.F.I.<sup>\*</sup>, la cual desde hace varios años ha sido utilizada en el Instituto de Investigaciones Veterinarias permitiendo efectuar estudios epidemiológicos en rebaños bovinos de diferentes regiones ganaderas del país.

Toro y col. [28], estudiaron la seroprevalencia de la Babesiosis en los estados Apure, Aragua, Bolívar, Guárico, Lara, Monagas, Táchira, Yaracuy y Zulia. Empleando la I.F.I. detectaron reactores positivos a *B. bigemina* en un 56% y en un 41.5% para *B. bovis*.

Varios autores han realizado estudios de prevalencia de la enfermedad en diferentes países [1,2,3,4,5,7,8,9,10,11,14, 17]. Kuttler y col. [16] en un estudio comparativo de la técnica de I.F.I. con la prueba de fijación del complemento para la detección de anticuerpos de Babesia bovina, determinó que la técnica de I.F.I. es más sensible, obteniendo 95-100% de positividad, mientras que con la fijación de complemento, se obtuvo del 40% al 95% de positividad.

Madrugá y col. [18] en Brasil, utilizando la técnica de I.F.I., elaboraron antígenos de *B. bigemina* y *B. bovis* a partir de cepas autóctonas, determinando un 100% de positividad para *B. bigemina* y 97,9% para *B. bovis*.

Alonso y col. [3] en La Habana, Cuba, efectuaron un estudio comparativo con la técnica de I.F.I. y frotis teñidos de sangre periférica en rebaños, parasitados o no, por garrapatas. En dicho estudio detectaron 35% de positividad para *B. bigemina* y 29% para *B. bovis*, mientras que en frotis sanguíneos teñidos se determinó un 3% de positividad para *B. bigemina* y 2% para *B. bovis*. Así mismo en los rebaños no afectados por garrapatas se obtuvo un 4% de positividad para *B. bigemina* y 1,5% para *B. bovis* con el frotis sanguíneo.

Actualmente en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, el

\* Inmunofluorescencia Indirecta

diagnóstico de rutina de las Babesiosis se realiza a través de la observación de frotis sanguíneo teñidos con la coloración de Wright-Giemsa y la utilización de técnica rápida de frotis teñidos con Diff Quick Stain.

La finalidad del presente trabajo es la de determinar la prevalencia de la babesiosis bovina, en fincas del Sector Cuatro (Playa Bonita) Parroquia Luis D'Vicente del Municipio Mara del Estado Zulia, Venezuela, mediante un estudio comparativo, a través de la observación de frotis sanguíneos teñidos con Diff Quick Stain y la detección de los niveles de anticuerpos séricos utilizando la Técnica de Inmunofluorescencia indirecta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Descripción de la zona en estudio

El área de estudio está constituida por fincas ubicadas en el Sector Cuatro, conocido como Playa Bonita, de la Parroquia Luis D'Vicente del Municipio Mara; específicamente lo constituyen nueve fundos seleccionados de un total de 237 fincas, existentes en el municipio antes mencionado, el cual está situado en la zona norte del Estado Zulia, FIG. 1.

La zona se caracteriza, según estudios climatológicos de Galué [14], y Fernández [13], por que la precipitación media anual es de 706 m.m, con una mayor intensidad durante los meses de Septiembre (117 m.m), Octubre (160 m.m) y Noviembre (97 m.m), aun cuando las lluvias son irregulares. De allí que se clasifica el año en: época seca, comprendida entre los meses de Enero-Abril; época semi-lluviosa, de Mayo-Agosto; y una época lluviosa, de Septiembre y parte de Diciembre. De acuerdo a Perozo [22]. La temperatura media anual de 24.5°C, con una máxima media anual de 27.8°C. El mes con mayor registro, Agosto, muestra la temperatura media más alta (28.7°C) y la temperatura media menor se presenta en Enero (26.5°C). El tipo de explotación es extensivo, con suelos bajos, planos, con un sistema de riego en la mayoría de las fincas, gracias a la inundación de potreros, con agua de los ríos Gua-sare, Socuy y Limón. La vegetación existente consiste en pastos artificiales y algunas leguminosas nativas.

## METODOLOGÍA

### Toma de muestra

La población bovina, específicamente, la constituyen fundos seleccionados al azar de un total de 237 fincas existentes en el Municipio Mara, el cual está situado en la zona norte del Estado Zulia; del total de una población bovina de 3.395 animales, TABLA I, se seleccionaron 128 bovinos mayores de un año\*, a los cuales se les extrajo muestras de sangre de la

\* Seleccionadas al azar en nueve fincas del sector objeto de estudio, ver TABLA I, utilizando la Tabla de Números Aleatorios y, basados en el diseño muestral expresado por Morales, G. y Pino de Morales, A. [21] y Wayne, D. [30].

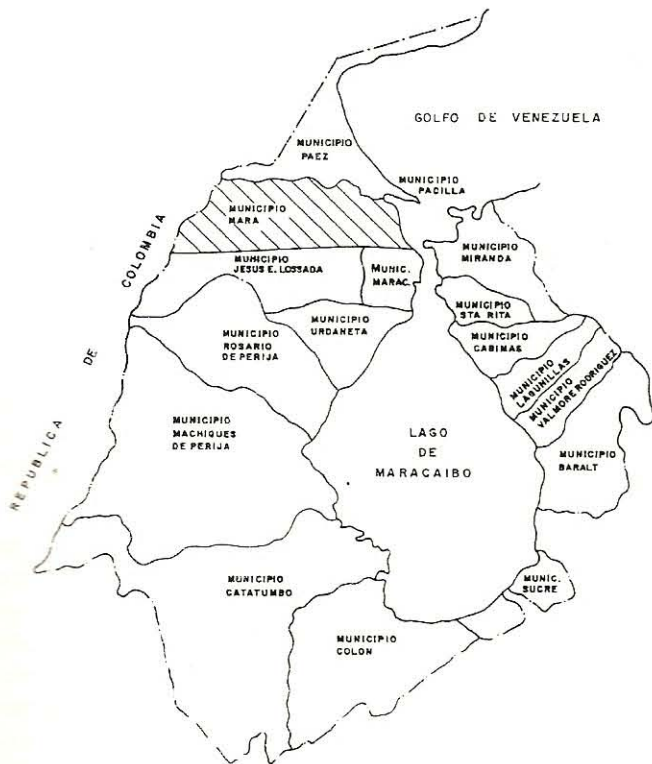


Figura 1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA ZONA EN ESTUDIO.

TABLA I

POBLACION BOVINA Y NUMERO DE MUESTRAS PROCESADAS EN EL SECTOR CUATRO DEL MUNICIPIO MARA - ESTADO ZULIA

Finca	No. de bovinos muestreados	No. de muestras
1	39	2
2	98	6
3	165	7
4	190	9
5	239	6
6	434	15
7	570	14
8	810	43
9	850	26
Total 9	3.395	128

vena yugular, mediante tubos de sangría al vacío, tipo vacutainer sin anticoagulante, de donde se obtuvo el suero destinado para el diagnóstico.

El análisis estadístico fue realizado en base a una prueba de independencia y asociación del número de resultados positivos evaluados con los dos métodos (Inmunofluorescencia y Frotis Sanguíneos) a través de la prueba de Ji-Cuadrado en tablas de contingencia de 2x2 [30].

Las muestras séricas fueron tomadas en forma aleatoria simple en las fincas seleccionadas a partir de bovinos en estudio, se les extrajo 15cc de sangre de la vena yugular, sometida a centrifugación, a fin de separar el suero destinado para el diagnóstico serológico de la Babesia, mediante la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta. Cada muestra fue identificada con el número del animal correspondiente y de la finca, las cuales se conservaron y transportaron en refrigeración, para luego ser analizadas en el Laboratorio de Hematozoarios del Instituto de Investigaciones Veterinarias (I.I.V. - CENIAP - FONAIAP) en Maracay [17].

Los sueros fueron evaluados según la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, descrita por Mark A. James y col., [15] y observada en un microscopio de la luz ultravioleta.

En los sueros positivos, las Babesias fluorescen de un color verde manzana brillante, cuya intensidad varía de acuerdo al grado de dilución; en los sueros negativos, las Babesias aparecen de un color verde opaco, muy tenue. El título del suero viene dado por la mayor dilución en la cual se observa una fluorescencia definida, razón por la cual se consideraron como positivos (portadores) los sueros cuyos títulos obtenidos, fueron mayores del 1:40.

Simultáneamente, de cada animal se tomaron muestras de sangre de la vena marginal de la oreja y punta de la cola, para la elaboración de frotis sanguíneos, realizados mediante el método de extensión y coloreados gracias a la técnica rápida (Diff Quick Stain) [6], siendo observados al microscopio óptico de luz.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA I se observa el número de fincas, la población bovina y el número de muestras examinadas mientras que los resultados de la prueba serológica mediante la Técnica I.F.I. y Frotis Sanguíneos Teñidos con Diff Quick Stain, se muestran en la TABLA II.

En relación a la prueba de I.F.I. se observan que, de 128 sueros de bovinos, 69 (53.9%) resultaron positivos para *Babesia bigemina* y 66 (51.6%) positivos para *Babesia bovis*, mientras que con la técnica de Frotis Teñidos se diagnosticaron 38 (29.6%) y 31 (24.2%) casos positivos respectivamente, TABLA II.

TABLA II

**PREVALENCIA DE BABESIOSIS BOVINA A LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (I.F.I.) Y A FROTIS SANGUINEOS TEÑIDOS (DIFF QUICK STAIN)**

Sueros +	<i>B. bigemina</i>	I.F.I.		Frotis teñidos				
		%	<i>B. bovis</i>	%	<i>B. bigemina</i>	%	<i>B. bovis</i>	%
128	65	53.90%	66	51.56%	38	29.68%	31	24.21%
Sueros -								
128	59	46.09%	62	48.43%	90	70.31%	97	75.78%

*Babesia bigemina*.  $\chi^2 = 15.43$ .  $P < 0.0001$

*Babesia bovis*.  $\chi^2 = 20.33$ .  $P < 0.001$

Estos resultados corroboran las investigaciones anteriores del Toro y col. [25,26,27,29], quienes aplicando la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta y utilizando sueros bovinos procedentes de rebaños del Estado Zulia, encontraron 43.3% de reactores positivos, para la especie *Babesia bigemina*.

En relación a la prevalencia obtenida, TABLA II, se detectó mediante la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, 53.9% para la especie *Babesia bigemina* y 51.6% para *Babesia bovis*, evidenciándose con el frotis sanguíneo, valores de 29.7 y 24.2%, para *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, TABLA II.

Rivas y col. [22] realizaron un diagnóstico serológico de babesiosis donde comprobaron que mediante la utilización de los métodos de serodiagnóstico era posible detectar un porcentaje significativo de reactores positivos causada por *B. argentina* y un porcentaje aún mayor de *B. bigemina*; sin embargo, la parasitemia detectada microscópicamente por el método de Giemsa fue insignificante para *Babesia argentina* y muy escasa para *Babesia bigemina* por lo que dichos autores establecen, que las pruebas de Inmunofluorescencia muestran especificidad y valor diagnóstico por la persistencia de anticuerpos de *Babesia* detectables. Akimboade y Dipeolu [2], señalaron la necesidad de utilizar las Técnicas Serológicas en la determinación de la prevalencia de agentes hemotrópicos, representados en este caso por protozoarios del género *Babesia*.

Toro y col. [28], utilizando la Técnica de Inmunofluorescencia, determinaron la Seroprevalencia de Babesiosis en rebaños bovinos de diferentes zonas de Venezuela, obteniéndose una prevalencia del 56% para *Babesia bigemina* y 41.5% para *Babesia bovis*. Estos resultados coinciden con nuestras observaciones, tanto para *Babesia bigemina*, como para *Babesia bovis* en la Parroquia Luis D'Vicente.

En La Habana, Cuba, Alonso y col. [3] realizaron un estudio en rebaños parasitados por garrapatas para comparar la Técnica de Inmunofluorescencia con Frotis Teñido, encontrando valores de 35% de positividad para *Babesia bigemina* y 29% para *Babesia bovis*. Se detectó para frotis sanguíneos 3% casos positivos para la *Babesia bigemina* y 2% para la *Babesia bovis*.

Las investigaciones de Toro y col. [25] señaladas anteriormente, y los resultados obtenidos en el presente estudio confirman, que la Babesiosis bovina está ampliamente diseminada en el país, y en nuestra región zuliana.

En estudios de prevalencia de la enfermedad en otros países se destacan un conjunto de investigaciones de diversos autores [1,2,3,4,5,7,8,9,10,11,14,17]. Kuttler y col. [16] se destacan quienes realizaron un estudio en U.S.A. para detección de antígeno de Babesiosis comparando la Técnica de Inmunofluorescencia con la prueba de fijación de complemento, determinando que la Técnica de Inmunofluorescencia es más sensible, obteniéndose, de 95 a 100% de seropositividad, mientras que con la prueba de fijación de complemento, se obtuvo del 40 a 90% de reaccionantes positivos. Esta elevada sensibilidad fue puesta de manifiesto en nuestros resultados comparados con la técnica tradicional.

Todorovic R. [24], en su trabajo de revisión realizado en U.S.A. de los diagnósticos serológicos de la Babesiosis afirma, que las últimas tres décadas han sido encaminadas para el desarrollo de técnicas serológicas de tal forma que éstas contribuyan al estudio de las patogénesis de las babesiosis y su posterior identificación, en animales con infecciones sub-clínicas; lo cual se evidencia en el presente estudio.

En Guyana, Applewhaite y col. [4] determinaron la prevalencia serológica mediante la Técnica de Inmunofluorescencia y la fijación de complemento contra *Babesia bigemina*, arrojando valores de 80% y 40%, y contra *Babesia bovis*, 61% y 16%, respectivamente, en los sueros colectados.

En Brasil, Madruga y col. [18], utilizando antígeno de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* a partir de cepas autóctonas, mediante la aplicación de la técnica de Inmunofluorescencia, detectaron un 100% de positividad para *Babesia bigemina* y 97.9% para la especie *Babesia bovis*.

Es oportuno señalar el hecho del incremento en el número de focos de *Babesiosis bovina* en Venezuela [19,20], destacando que para el año 1980 solo se presentaban 49 casos de Babesiosis, mientras que para el año 1990, esta cifra había alcanzado la suma de 220 focos; sin embargo, la prevalencia real de la enfermedad en el país todavía no se conoce,

debido a la ausencia de estudios sistemáticos y estadísticos por lo que no se dispone de datos concretos sobre distribución y prevalencia, de allí que con el presente estudio estamos ampliando el conocimiento de la prevalencia de la *Babesiosis bovina* a nivel nacional.

## CONCLUSIONES

- 1 Se estableció una prevalencia del 53.9% para la especie *Babesia bigemina* y 51.6% para *Babesia bovis*, mientras que con la técnica de frotis teñidos, los valores obtenidos fueron de 29.6% para *Babesia bigemina* y 24.2% para *Babesia bovis*.
- 2 Se determinó que existen diferencias altamente significativas ( $P < 0.0001$ ) entre los métodos utilizados, diferencias que están a favor del método de Inmunofluorescencia Indirecta.
- 3 La técnica de I.F.I. es efectiva en el diagnóstico de Infecciones por Babesiosis, mostrando una gran sensibilidad en la detección de anticuerpos.
- 4 De acuerdo a los resultados obtenidos, que reflejan una alta prevalencia, se concluye que hay la necesidad de desarrollar y evaluar métodos de Inmunoprofilaxis que nos permitan dar protección a un mayor número de bovinos contra la enfermedad.
- 5 En la zona de estudio existe inestabilidad enzootica, ya que una proporción importante de vacunos llega a presentar brotes de Babesiosis, durante épocas favorables para la abundancia del vector.

Es necesario destacar el hecho de que en época de verano, se observa un incremento de los casos de babesiosis, ya que se entiende que los animales durante esta época disminuyen la ingesta de forraje por la carencia de éstos, trayendo como consecuencia desmejoramiento en los rebaños.

## RECOMENDACIONES

- 1 Vigilancia epidemiológica más estricta y Educación Sanitaria en cuanto al control en la movilización de animales, rotación y manejo de potreros.
- 2 Evaluación de las actuales situaciones de riesgo e incorporar la enfermedad en los programas oficiales del Ministerio de Agricultura y Cría.
- 3 Control de la garrapata, fuera y sobre el Hospedador.
- 4 Prevención en animales importados, seguido de un control terapéutico con drogas específicas.
- 5 Implementar sistemas de diagnósticos más efectivos, desarrollando métodos más confiables con la incorporación de las técnicas serológicas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Acha, P.N. y Szyfres, B. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles comunes al hombre y a los animales. OSP-OMS. Washington D.C. 20037. E.U.A. Pág. 25 al 28. 1987.
- [2] Akimboade, O.A. and Dipeolu. O.O. Comparison of blood smear and Indirect fluorescent antibody Techniques in detection of haemoparasit infection in Trade cattle in Nigeria. Vet. Parasitology. 14: 95-104. 1984.
- [3] Alonso, M.; Blandino, T.; Larramendy, T.; Jiménez, T. y Mesa, J. Inmunofluorescencia Indirecta en el diagnóstico de la Babesiosis bovina en Cuba. Rev. Salud Anim. 10: 197-203. 1988.
- [4] Applewhaite, L.M., Graig, T.M., and Wagner, G. Serological prevalence of bovine Babesiosis in Guyana. Trop. Anim. Health. Prod. 13: 13-18. 1981.
- [5] Benavides, O.E. Control Integral de Ecto y Hemoparasitos en la Ganadería bovina en el trópico. I.C.A. División de Salud Animal. Pág. 1-17. 1990.
- [6] Benjamín, M. Manual de Patología Clínica Veterinaria. México. Editorial Limusa. Pág. 33-53: 1984
- [7] Blewett, D.A. and Adam, K.A. Serological survey for Babesia in cattle in Scotland. III The rates of acquisition and loss of antibody to babesia and their effects on observed levels of antibody incidence. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 72. Pág. 26. 1978.
- [8] Bundy, D.A.P.; Hylton, G.A. and Wagner, G.G. Bovine Haemoparasitic disease in Jamaica. Tropical Animal Health and Production. 15 (1) 47-48. 1983.
- [9] Burrigem, M.J. and Kimber, C.D. Detection of antibodies to *Babesia bigemina* in dried blood samples using the indirect fluorescent antibody test. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 67: 191-195. 1973.
- [10] Chirinos, A y D'Pool, G. Aspectos Parasitológicos de Babesia y Trypanosoma. Curso de Actualización en Enfermedades por Agentes hematópicos del Bovino. F.C.V. - L.U.Z. División de Post-grado. Pág. 10. 1984.
- [11] Díaz Ungría, C. Parasitología de los Animales Domésticos en Venezuela. CONDES. Maracaibo. Universidad del Zulia. 1: 625. 1971.
- [12] Espósito, C. y Gómez, A.A. Programa de Control de Babesiosis y Trypanosomiasis. Facultad de Ciencias Veterinarias L.U.Z. Curso medio de salud Animal. 1986.
- [13] Fernández, W. Estudio de Suelos semidetallado Baja Guáajira. Sector Carrasquero - Copetamana Los Melones.

- Distrito Páez. Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables. División de Información e Investigación. Serie Informes Científicos. Zona 5. Pág. 19-23. 1980.
- [14] Galué, P.B. Informe Sobre el Estudio Edafológico de los Suelos del Area Playa Bonita - Tulé del Futuro Sistemático de Riego "Río Limón". Ministerio de Obras Públicas. División de Información e Investigación. Zona 5. Pág. 3-13. 1966.
- [15] James, M.A.; Kenneth, L., Michael, G.; Miodrag, R.; Kuttler, R.; Levy, M.G., and Ristic, M. Antibody kinetics in response to vaccination against *Babesia bovis*. American Journal of Veterinary Research. 42:1999 - 2001. 1985.
- [16] Kuttler, K.L., Adams, L.G., Todorovic, R.A. Comparisons of The Complement fixation and Indirect fluorescent antibody Reactions in The detection of Bovine Babesiosis. Am. J. Vet. Res. 38 (2): 153-156. 1986.
- [17] León, E. Curso de Técnicas de Inmunofluorescencia aplicada a la Parasitología (*B. bovis*; *B. bigemina*, *A. marginales*) FONAIAP-CENIAP: 12-19. 1985.
- [18] Madruga, C.; Kesler, A.H.; Jesús, E.F. and Sete, A.J. Indirect Inmunofluorescence of The Serological diagnosis of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*: production of antigenic stock isolated in the state of Mato Grosso de Sui and preliminary evaluation of the tres pesquisa in Amdamiento. Embrapa. 32: 1-14. 1986.
- [19] Ministerio de Agricultura y Cría. Boletín Anual. Situación Zoonitaria reportadas por las Oficinas de Fomento Pecuario y Sanidad Animal, Dirección General de Desarrollo Ganadero, Dirección de Sanidad Animal. Unidad de Estadística. Pág. 40. 1980.
- [20] Ministerio de Agricultura y Cría. Boletín Anual. Situación Zoonitaria reportadas por las Oficinas de Fomento Pecuario y Sanidad Animal, Dirección General de Desarrollo Ganadero, Dirección de Sanidad Animal. Unidad de Estadística. Pág. 59. 1990.
- [21] Morales, G. y Pino de Morales, A. Parasitología Cuantitativa. Editorial Acta Científica. pp. 19. 1989.
- [22] Perozo, N.L. Producción de leche en la región de Río Limón del Estado Zulia. Boletín Divulgativo (2) FONAIAP - CIARZU. Pág. 15 - 20. 1976.
- [23] Rivas, A., Rodríguez, O.N., y Espainel, L. Evaluación Epizootológica de los métodos de serodiagnósticos de la babesiosis y anplasmosis bovinas. Revista Cubana de Ciencias Veterinarias. 8: 1-11. 1977.
- [24] Todorovic, R.A. Serological Diagnosis of Babesiosis. A review. Trop. Animal. Health. Prod. 7: 1-14. 1975.
- [25] Toro, M. Evaluación de la técnica de Inmunofluorescencia en el diagnóstico de Babesiosis bovina. 5:719-724. 1982.
- [26] Toro, M., López, R., León, E., Ruiz, A. y García, J. Resultado de un muestreo serológico sobre bovinos portadores de babesia mediante Inmunofluorescencia Indirecta. Veterinaria Tropical. 5: 3-88. 1980.
- [27] Toro, M., León E. and López, R. Epidemiologic and Control Features of Bovine Babesiosis in Venezuela. I.I.V. CENAIP - FONAIAP - Maracay. Pág. 1-11. 1983.
- [28] Toro, Manuel. Seroepidemiología de la hemoparasitosis en Venezuela. Veterinaria Tropical. 4: 1-13. 1990.
- [29] Toro, M., León, E., Pallota, F., López, G., García, J y Ruiz A. Prevalencia de las hemoparasitosis en bovinos del Estado Guárico. Veterinaria Tropical. 8: 21-35. FONAIAP - Maracay. 1990.
- [30] Wayne, D. Bioestadística. Capítulo VI. Editorial Limusa. México. Pág. 50-55. 1982.