

INSUFICIENTE INMUNIDAD CRUZADA EN BOVINOS POR *Babesia bigemina* Y/O *Babesia bovis* DERIVADAS DEL CULTIVO *in vitro*^a

Carlos Agustín Vega y Murguía^b
Julio Vicente Figueroa Millán^b
Edmundo Enrique Rojas Ramírez^b
Juan Alberto Ramos Aragón^b
Germinal Jorge Cantó Alarcón^c

RESUMEN

Vega y M C A, Figueroa M J V, Rojas R E E, Ramos A J A, Cantó A G J. *Téc. Pec. Méx.* Vol 37 No 1 1999 pp 13-22. El presente estudio se orientó a verificar en bovinos la posible protección cruzada, conferida por cepas de *Babesia bigemina* o *Babesia bovis* derivadas de cultivo *in vitro*, preparadas como un inmunógeno fresco. Se utilizaron 16 novillos, serológicamente negativos a *Babesia spp.*, procedentes de una zona libre de la garrapata común del ganado. Cuatro animales en cada grupo, fueron inoculados intramuscularmente como sigue: Grupo I, 10¹⁰ Eritrocitos no infectados (En); Grupo II, 10⁷ eritrocitos infectados (Ei) con *B. bigemina*; Grupo III, 10⁷ Ei con *B. bovis* y Grupo IV, 10⁷ Ei con *B. bovis* y 10⁷ Ei con *B. bigemina*, como inóculo mixto. Cuatro meses después de la inmunización, los animales fueron trasladados a una zona endémica de babesiosis. El desafío se realizó en forma natural, al introducir el ganado en los potreros infestados con la garrapata *Boophilus microplus*, sin tratamiento garrapaticida durante 39 días. El monitoreo de los animales incluyó: observación de signos clínicos de la enfermedad, medición de temperatura rectal, determinación del valor del volumen celular aglomerado y la medición del porcentaje de eritrocitos parasitados. Al desafío se observó que todos los animales se infectaron con ambas especies de *Babesia*. Adicionalmente, todos los bovinos pertenecientes al Grupo I, tres del Grupo II y uno del Grupo III, enfermaron de babesiosis clínica aguda, de forma tal que fue necesario el tratamiento específico. Otro animal del Grupo III sufrió hemoglobinuria. Los animales restantes, no padecieron clínicamente la enfermedad, obteniéndose una protección de 0, 25, 50, y 100% respectivamente, en contra de cepas de *Babesia* transmitidas por garrapatas. Estos resultados muestran que la protección cruzada por las cepas de *Babesia* derivadas del cultivo, es insuficiente. Se concluye para obtener una sólida inmunidad en bovinos que sean introducidos a una zona de riesgo de babesiosis, se requerirá administrar ambas especies de *Babesia* derivadas de cultivo *in vitro* en un inmunógeno combinado.

PALABRAS CLAVE: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, Inmunidad cruzada, Inmunógeno.

INTRODUCCION

La babesiosis bovina es una de las enfermedades que produce elevadas pérdidas económicas a la ganadería bovina en las regiones tropicales y subtropicales del país (1). La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en México (2), tanto en el litoral del Océano Pacífico como

en los del Golfo de México y el Mar Caribe, es un importante obstáculo para la introducción de razas mejoradas en estas áreas. Se ha planteado que la alternativa ideal para el control de la babesiosis es el uso de métodos inmunoprolácticos (3). De los diversos tipos de vacunas que se han estudiado, las vacunas vivas atenuadas se encuentran disponibles comercialmente únicamente en países como Australia, Argentina, Colombia, Israel, Uruguay y Venezuela; mostrando una efectividad aceptable.

En México, se realizaron algunos ensayos preliminares utilizando una clona irradiada de *B. bovis*, con la intención de emplearla

a Recibido el 10 de noviembre de 1998 y aceptado para su publicación el 12 de febrero de 1999.

b Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria / INIFAP-SAGAR. Km.11.5. Carr. Federal Cuernavaca-Cuautla, Col. Progreso. C.P. 62500, Jiutepec, Morelos.

c Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Fisiología y Mejoramiento Animal / INIFAP-SAGAR Apdo. Postal # 2-29. Querétaro, C.P. 76280, Querétaro.

Parcialmente financiado por: PAIEPEME, A.C.

como inmunógeno (4). Actualmente, se dispone de cepas atenuadas de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* de reducida virulencia. La clona BOR-1 de *B. bovis* fue originalmente clonada, irradiada y mantenida en cultivo *in vitro* (5); ha sido aplicada en animales susceptibles y ha mostrado potencial inmunoprotector (6) cuando los animales son confrontados bajo condiciones controladas, con organismos virulentos de *B. bovis*. Con relación a *B. bigemina* se dispone de una cepa la cual se ha mantenido en cultivo *in vitro* por un número indefinido de pases (7) y ha presentado características biológicas de reducida virulencia a la inoculación de animales susceptibles. Además, esta cepa ha inducido protección al desafío con cepas virulentas de *B. bigemina* transmitidas por garrapatas infectadas (8) o por pases de sangre infectada (9) y fue denominada BIS-1.

Sin embargo, se desconoce si la aplicación de un inmunógeno conteniendo solamente una especie de las líneas de *Babesia* atenuadas, derivadas de cultivo *in vitro* pudiera conferir a los bovinos inmunizados, suficiente protección cruzada contra la babesiosis clínica, durante un desafío natural.

MATERIAL Y METODOS

Inóculos. Los inóculos fueron preparados a partir de suspensiones de eritrocitos al 10% v/v en medio de cultivo completo. Se utilizaron la clona BOR-1 de *Babesia bovis* (6) y la cepa BIS-1 de *Babesia bigemina* (9), ambas derivadas del cultivo *in vitro*; éstas fueron mantenidas en el laboratorio de acuerdo a las metodologías para cultivo ya publicadas (5,7). La dosis fue determinada por la observación del

porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) en frotis teñidos con el colorante de Giemsa y por el conteo en fresco de los eritrocitos totales utilizando un hemocitómetro. Para su traslado, los cultivos fueron diluidos 1:2 ó más, en solución de VyM para ajustar el volumen sin exceder de 1 ml por dosis. Después del envasado en el laboratorio del CENID – Parasitología Veterinaria en Jiutepec, Morelos, los inóculos fueron inmediatamente transportados en condiciones de refrigeración a 4 C, hasta Amazcala, en Querétaro, para su aplicación el mismo día.

Fase de Inmunización de los bovinos. Se utilizaron 16 novillos de 14 meses de edad, procedentes de una región libre de garrapatas en el estado de Chihuahua y serológicamente negativos a *Babesia spp.* por la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (10). Durante la inmunización, los animales se alojaron en el rancho “GB”, municipio de Amazcala, Querétaro, en el altiplano mexicano, también reconocido como libre de la garrapata transmisora. Los animales se distribuyeron al azar, en cuatro grupos de cuatro novillos cada uno. Los animales del Grupo I fungieron como testigo susceptible y recibieron, por vía intramuscular, 10^{10} eritrocitos no infectados (En). Los animales de los grupos II y III recibieron un inóculo simple en dosis de 10^7 eritrocitos infectados (Ei), respectivamente de *B. bigemina* y *B. bovis*. Los animales del Grupo IV recibieron un inóculo combinado en fresco con dosis de 10^7 Ei con cada una de las especies: *B. bovis* y *B. bigemina* (Cuadro 1).

Fase de Desafío en campo. Cuatro meses post-inmunización, el lote de animales

experimentales fue trasladado al Campo Experimental Pecuario "La Posta", en Paso del Toro, Veracruz y liberado inmediatamente en potreros infestados con la garrapata *Boophilus microplus*, sin aplicar ningún tipo de tratamiento para el control de esta plaga.

Seguimiento clínico de los animales. Durante la inmunización, así como en el desafío, los animales fueron sujetos a un seguimiento clínico individual, registrando diariamente la temperatura rectal (T), obtención de sangre por punción de la vena caudal para medir el valor del volumen celular aglomerado (VCA) por el método del microhematocrito (H) y obtención de sangre de la punta de la cola para la identificación directa de los parásitos en frotis teñidos con colorante de Giemsa; esto último permitió además conocer el PEP ó parasitemia. El seguimiento se continuó hasta los días 102 post-inmunización y 39 post-introducción al potrero infestado.

RESULTADOS

Inmunización. Durante la fase de inmunización se observó un incremento en la temperatura corporal en todos los grupos (Figura 1). La máxima temperatura promedio determinada en los animales del grupo II fue de 39.8 C en los días cinco y seis post-inmunización (Pi). La temperatura alcanzó ≥ 40 C en los animales del grupo III del día cinco al ocho y en los del grupo IV, los días cinco y seis Pi. Entre el día 10 y el 12 Pi se presentó un descenso en el VCA, el cual llegó hasta un valor de 26% en el Grupo II, 32% en el Grupo III y 28% en el Grupo IV. Sin embargo, estos cambios se consideraron como respuesta a la inmunización ocasionada por la multiplicación *in vivo* de los organismos

inoculados, y no fueron lo suficientemente significativos como para requerir tratamiento específico. Con lo cual, se demuestra así, la característica de reducida virulencia de los agentes inmunizantes.

Desafío. Con respecto al desafío de campo con aislados virulentos, los datos de temperatura corporal y algunos valores hematológicos obtenidos se presentan en el Cuadro 2.

Todos los animales de los Grupos I y II presentaron períodos febriles prolongados en promedio de por lo menos siete días, mientras que los animales de los Grupos III y IV solamente tuvieron fiebre por cuatro y tres días respectivamente.

Todos los animales del grupo I, dos animales del grupo II y un animal del grupo III, mostraron decremento en el VCA de más del 50% con respecto al valor basal. Se observa que todos los animales se infectaron con ambas especies de *Babesia*, presentando parasitemia por varios días consecutivos, entre 11 y 17 días post-desafío (Pd) (Figura 2). En contraste, el período tan prolongado de parasitemia (17 días) en ausencia de manifestación clínica aguda de babesiosis en todos los animales del grupo IV, es una indicación de la protección conferida a éstos por el inmunógeno mixto.

Clínicamente todos los animales del grupo I, tres animales del grupo II y un animal del grupo III, se mostraron severamente afectados (Cuadro 3), por lo que se hizo necesario aplicar el tratamiento babesicida, a pesar del cual, murieron dos animales por babesiosis; uno del Grupo I ó testigo y otro del Grupo II, al cual se le inoculó con el inmunógeno simple de *B. bigemina*. Dos animales del Grupo I y dos del grupo III presentaron hemoglobinuria.

Cuadro 1. Diseño Experimental: Todos los animales fueron inoculados el día 0 y desafiados por exposición a garrapatas infestadas, a partir del día 120.

GRUPO	N° de Animales	Inóculo	Vía
I	4	10 ¹⁰ Eritrocitos no infectados	i.m.
II	4	10 ⁷ Eritrocitos infectados <i>Babesia bigemina</i> Cepa BIS-1	i.m.
III	4	10 ⁷ Eritrocitos infectados <i>Babesia bovis</i> Clona BOR-1	i.m.
IV	4	10 ⁷ Eritrocitos infectados <i>Babesia bigemina</i> Cepa BIS-1 +	
		10 ⁷ Eritrocitos infectados <i>Babesia bovis</i> Clona BOR-1	i.m.

Cuadro 2. Valores de temperatura corporal y hematológicos durante el desafío de campo de animales testigo ó inoculados con *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* ó una combinación de ambas.

GRUPO (n=4)	Fiebre ≥ 39.5C			Volumen Celular Aglomerado*					PARASITEMIA (días)		
	#§	Promedio en días	Grupo	Animal	Valor mínimo por ≥50%	Máxima caída	#§	%	DPI	Total	big.
I	4	9	7.5	12	14.7	4	57.1	18	11	4.0	6.2
II	4	8	7.0	12	20.7	2	39.6	18	14	4.2	5.5
III	3	5	4.0	10	19.5	1	43.1	25	17	10.2	6.5
IV	3	0	3.0	18	22.5	0	34.3	27	17	7.5	3.5

* = Valor basal promedio = 34.25%; § = número de animales; DPI = Días post-introducción al potrero.

Cuadro 3. Datos clínicos* durante el desafío de campo de animales testigo ó inoculados con *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* ó una combinación de ambas.

GRUPO (n=4)	Período§		Signos Nerviosos	Hemo-globinuria	Mal Estado General	Quimioterapia	RIP
	Pre-patente big.	bov.					
I	14	11	1	2	4	4	1
II	14	11	1	0	3	3	1
III	14	13	0	2	1	1	0
IV	16	13	0	0	0	0	0

* = Número de animales; § = días; RIP = Muertos.

INMUNIDAD CRUZADA EN LA BABESIOSIS BOVINA

Figura 1. Valores observados en los novillos durante la fase de inmunización.

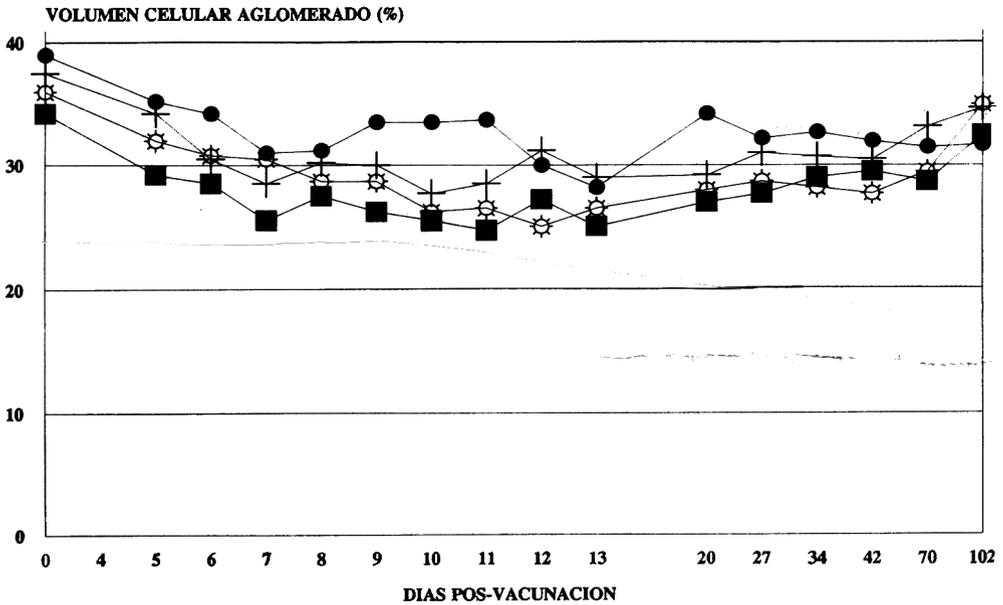
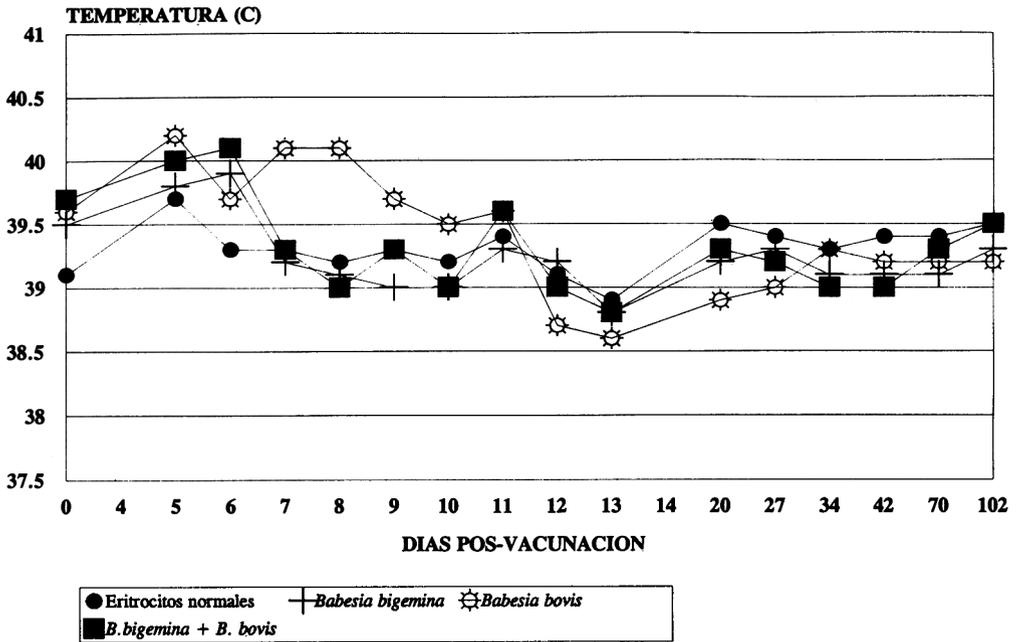
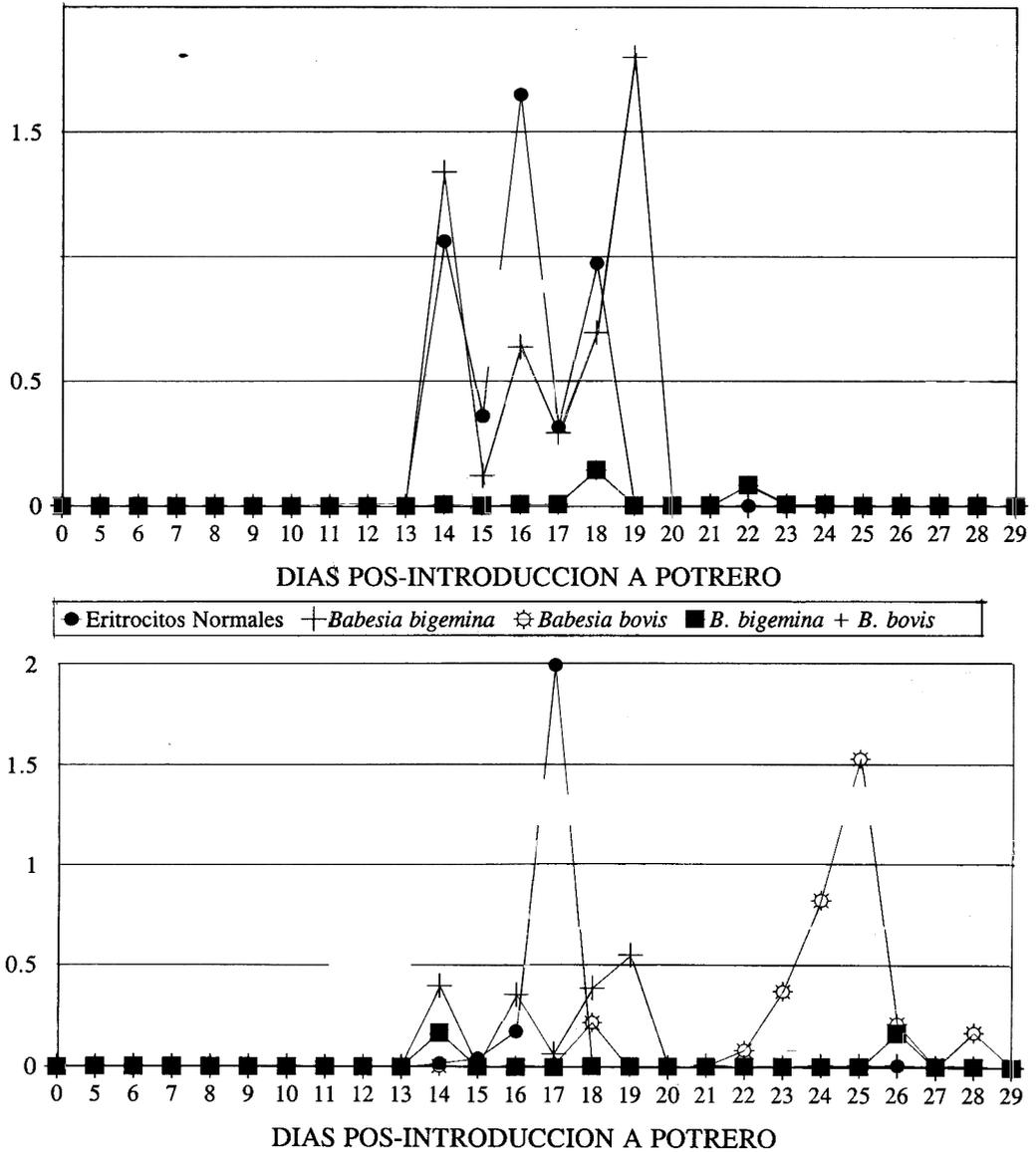


Figura 2. Desafío de campo de animales inoculados con cepas de *Babesia bigemina* Y/O *Babesia bovis*.

A) PARASITEMIA PROMEDIO DE *Babesia bovis*
 B) PARASITEMIA PROMEDIO DE *Babesia bigemina*



DISCUSION

El incremento de temperatura observada durante la inmunización en los animales inoculados ya sea con los inmunógenos simples ó mixto, muy probablemente se debió a la reproducción del parásito; sin embargo, el hecho de que los bovinos hayan manifestado fiebre por pocos días y una ligera caída del VCA, es indicativo de que las cepas administradas aún cuando conservan su infectividad, se comportan como atenuadas, lo que demuestra su inocuidad a la dosis empleada. Estos resultados coinciden con trabajos realizados en otros estudios con estas cepas atenuadas derivadas del cultivo *in vitro* administrando la misma dosis en forma fresca, en donde la temperatura se incrementa ≥ 39.5 C solamente en un animal, aproximadamente al día cinco, coincidiendo con la presencia de *B. bigemina* en sangre periférica (9), y al día siete para el caso de *B. bovis*, coincidiendo también con su detección en el frotis (6).

Con respecto a los resultados obtenidos en la fase de desafío, quedó demostrado que la infestación natural con garrapatas, en esta zona endémica, acarrea la infección doble, esto es, en la que participan tanto *Babesia bovis* como *B. bigemina*, apareciendo cada una de ellas de acuerdo a su ciclo de transmisión.

Con relación a la presentación de hemoglobinuria, destaca el hecho de que dos bovinos del Grupo III, inoculados con el inmunógeno simple de *B. bovis*, hayan presentado hemoglobinuria. Esto se debió a que al ocurrir la infección por la cepa de campo de *B. bigemina*, contra la cuál no estaban protegidos, se produjo una

hemólisis intravascular (12,13), debido a que ésta especie de parásito induce una mayor fragilidad de los eritrocitos infectados. Además, la hemoglobinuria se explica porque el sistema de haptoglobulinas que capturan los restos de hemoglobina, está rebasado y esta última atraviesa fácilmente el filtro glomerular. Similarmente, el hecho de que un bovino del grupo II, inmunizado solamente con *B. bigemina* haya presentado signos nerviosos se debió a que, al no estar protegido contra la infección por *B. bovis* de campo, se indujo el adosamiento al endotelio de los capilares del cerebro de los eritrocitos infectados, obstruyendo la circulación y limitando el acceso a los nutrientes. La presentación de signos nerviosos causados por la infección de *B. bovis*, ha sido ampliamente documentada (12,13).

Sin embargo era necesario saber si la administración del inmunógeno simple con las especies atenuadas de *B. bovis* o *B. bigemina* confería protección contra cepas heterólogas ante un desafío de campo. En éste trabajo se observó que, en comparación con el 100% de protección conferida contra el desafío de campo con ambas especies de *Babesia* por el inmunógeno combinado, se obtuvo una protección del 50% en los animales inoculados con el inmunógeno simple de *B. bovis*; y 25% de protección en el grupo de animales inoculados con el inmunógeno simple de *B. bigemina*. Estos resultados indican, por un lado, que animales vacunados con cepas atenuadas de *B. bigemina* adquieren poca o nula inmunidad cruzada en contra de cepas de campo de *B. bovis*, ya que estas son inoculadas inicialmente por la larva de la garrapata *Boophilus microplus*. Secundariamente,

aún cuando protegidos en contra de un ataque inicial por la inoculación de *B. bovis* a través de la garrapata, los animales vacunados con cepas de *B. bovis* derivadas de cultivo *in vitro*, no adquieren una inmunidad 100% efectiva en contra de cepas virulentas de *B. bigemina*, las cuales son transmitidas en el campo por la ninfa y fase adulta de la garrapata *Boophilus microplus*. Por lo cual se concluye que, dada la reducida inmunidad cruzada conferida por los especímenes atenuados de *Babesia* vacunaes en contra de la especie heteróloga, la administración en bovinos susceptibles del inmunógeno combinado, les permitirá a éstos adquirir una protección mayor en contra de cepas virulentas de campo, de ambas especies de *Babesia*.

Trabajos realizados con anterioridad habían sugerido que la inmunidad cruzada con estas especies de protozoarios tiene variaciones. Se ha insistido que la protección contra *B. bovis*, está íntimamente asociado a la estimulación específica de especie (14). De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se hace evidente que la respuesta protectora fue específica, independientemente de cuál haya sido el mecanismo involucrado, ya que los animales que recibieron como inmunógeno solamente una especie, fueron severamente afectados por la otra especie de protozoario presente y contra la cuál esos animales no estaban protegidos.

Se ha sugerido, para el caso de *B. bovis* (15), que el reconocimiento de antígenos es por la vía de la presentación de antígenos eritrocíticos espurios inducidos en una reacción inflamatoria inespecífica.

Si éste hubiera sido el caso, se supondría que, por ejemplo, los animales inoculados con **En**, hubiesen demostrado algún efecto de resistencia. Por el otro lado, si se argumentase que la resistencia es debida a una reacción inflamatoria no específica, como se explicaría que la respuesta de defensa no haya sido suficiente en los grupos inmunizados con una sola especie, en comparación con aquellos animales inmunizados contra ambas especies, y que resistieron totalmente la doble infección.

En el presente estudio se observó que la protección estuvo más asociada a la inmunestimulación específica, que a la no específica. Ese argumento no es satisfactorio para el presente experimento.

Por otro lado, se ha informado que animales inmunizados utilizando la infección controlada ó fracciones semipurificadas de *B. bigemina*, son capaces de resistir el desafío por *B. bovis* (16). El sesgo aparente de ese estudio está dado por la interpretación de los autores de que un 50% de supervivencia al desafío es indicativo de resistencia, y denominada de alto nivel, basados en que los animales desafiados en forma homóloga con *B. bigemina*, sobrevivieron también en la misma proporción. Los mismos autores manifiestan que sus resultados no concuerdan con lo demostrado por Smith y colaboradores (17), en el que los animales que resistieron la infección de desafío, habían sido previamente inmunizados con la misma especie, sin que se pudiera demostrar algún efecto de inmunidad cruzada.

Finalmente, la conclusión del presente trabajo es que la inmunidad cruzada que

INMUNIDAD CRUZADA EN LA BABESIOSIS BOVINA

podrían inducir los organismos atenuados de *B. bovis* y *B. bigemina* derivados del cultivo *in vitro*, no es suficiente para proteger a los animales contra el desafío heterólogo, por la especie. Desde el punto de vista práctico, la inducción de resistencia en animales que han de ser expuestos al desafío natural en zonas endémicas en México, deberá tomar en cuenta a ambas especies de *Babesia*, para ser realmente efectiva.

INSUFFICIENT CROSS-IMMUNITY IN CALVES CAUSED BY *in vitro* DERIVED *Babesia bigemina* OR/AND *Babesia bovis* IMMUNOGENS

SUMMARY

Vega y M C A, Figueroa M J V, Rojas R E E, Ramos A J A, Cantó A G J. *Téc. Pecu. Méx.* Vol 37 No 1 1999 pp. 13-22. This study was oriented to assess cross-protection among two *Babesia* species, induced by an immunogen prepared with *in vitro* derived *Babesia bigemina* or/and *Babesia bovis* isolates. Sixteen calves free of antibodies against *Babesia* spp. were selected from a tick free area. Animals were allotted at random in groups of four each and intramuscularly inoculated as follows: Group I, with 10^{10} non infected erythrocytes (En), Group II, with 10^7 *B. bigemina* - infected erythrocytes (Ei); Group III, 10^7 *B. bovis* - Ei and Group IV, 10^7 *B. bovis* - Ei and 10^7 *B. bigemina* - Ei as a combined immunogen. All animals were transported to a known *Babesia* endemic area four months after immunization and exposed freely to *Boophilus microplus* ticks for a 39-day period. Five days after exposure to ticks and periodically thereafter, the animals were clinically monitored and rectal temperature, packed cell volume and parasitaemias were recorded. During challenge, all animals became infected with both field *Babesia* species. All animals in Group I, three in Group II and one from Group III were severely ill and required specific treatment. Remaining animals, one in Group II, two in group III and all four in Group IV, did not show significant clinical changes. It was assumed that protection of 0%, 25%, 50% and 100%, was respectively achieved. It was concluded that *in vitro* derived *B. bigemina* alone induces no cross protection, while *in vitro* derived *B. bovis* clone, induces very limited cross- protection

against virulent *Babesia* isolates in the field and in order to attain full protection, a combined immunogen with both *in vitro* attenuated *Babesia* agents is required.

KEY WORDS: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, Cross-immunity, Immunogens.

REFERENCIAS

1. Anónimo. Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. *Bull. Off. Intl. Epizoot.* 1981; 49: 903
2. Alvarez M J A, Cantó A G J. Epidemiología de la babesiosis. En: Soc. Méx. Parasitol. A.C. (Eds.) *Parasitología*. Vol. Conmemorativo. México, D.F., 1985: 54-72.
3. F.A.O., Review of strategies for the control of ticks and tick-borne diseases and their vectors FAO expert consultation. Rome, Italy. 1989:1-15.
4. Salas T E, García G J, Ramos A J, Rodríguez R E, Aboytes T R, Buening G M, Vega y M C A. Patogenia de una clona irradiada de *Babesia bovis* obtenida de cultivo *in vitro*. *Téc. Pecu. Mex.* 1988; 26:36.
5. Rodríguez, S.D., 1985. *Babesia bovis* clones: Biochemical characterization. PhD. Thesis, University of Missouri-Columbia, USA.
6. Cantó A G J, Figueroa M J V, Alvarez M J A, Ramos A J A, Vega y M C A. Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de cultivo *in vitro*. *Téc. Pecu. Mex.* 1996; 34(3):127.
7. Vega C A, Buening G M, Green T J, Carson C A. *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am. J. Vet. Res.* 1985; 48:416.
8. Hernández O R, Alvarez M J A, Buening G M, Cantó A G J, Ramos A J, Vega y M C A. Infectividad de diferentes aislamientos de *Babesia bigemina* a garrapatas *Boophilus microplus* y su transmisibilidad a bovinos adultos. *Téc. Pecu. Méx.* 1990; 28 (2):63.
9. Figueroa M J V, Cantó A G J, Alvarez M J A, Lona G R, Ramos A J A, Vega y M C A. Capacidad protectora en bovinos de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro*. *Téc. Pecu. Mex.* 1998; 36(2): 95.
10. Goldman M, Pipano E, Rosemberg A S. Fluorescent antibody tests for *Babesia bigemina* and *Babesia berbera*. *Res. Vet. Sci.* 1972; 13:77.

11. Jain N C. Schalm's Veterinary Hematology 4th. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986: 41.
12. Soulsby E J L. Parasitología y Enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7^a. Ed. México, D.F.: Interamericana 1982:
13. Quiroz R H. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. 1^a. Ed. México D.F.:LIMUSA 1984: 187.
14. Mahoney D F, Kerr J D, Goodger B V, Wright I G. The immune response of cattle to *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). Studies on the nature and specificity of protection. Int. J. Parasitol. 1979; 9:297.
15. Cox F E G. Spurious *Babesia* antigens. Nature 1986; 321:384.
16. Wright IG, Goodger BV, Leatch G, Aylward JH, Rode-Bramanis K, Waltisbuhl DJ. Protection of *Babesia bigemina*-immune animals against challenge with virulent *Babesia bovis*. Infec.Immun. 1987; 55:364.
17. Smith RD, Molinar E, Larios F, Monroy J, Trigo F, Ristic, M. Bovine babesiosis: Pathogenicity and heterologous species immunity of tick-borne *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infections. Am.J.Vet.Res. 1980; 41:1957.