

## CULTIVO in vitro DE Babesia bovis: ESTABLECIMIENTO Y CONDICIONES OPTIMAS DE MULTIPLICACION \*

JULIO VICENTE FIGUEROA MILLÁN<sup>1</sup>  
GERMINAL JORGE CANTÓ ALARCÓN<sup>1</sup>  
JESÚS JUÁREZ FLORES<sup>1</sup>  
FELIPE RUIZ LÓPEZ<sup>2</sup>

### Resumen

El objetivo del presente estudio fue establecer el cultivo *in vitro* de *Babesia bovis*, bajo el sistema estacionario microaerofílico, así como determinar las condiciones más apropiadas para obtener un porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP más elevado de acuerdo con las condiciones medioambientales de la ciudad de México.

Fueron utilizados 18 tratamientos con un arreglo factorial  $3 \times 3 \times 2$ ; 3 concentraciones de glóbulos rojos (5%, 7.5% y 10%), 3 niveles de fluido (4 mm, 6 mm y 8 mm), e incubación en 2 atmósferas (5% CO<sub>2</sub> en aire y 2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 93% N<sub>2</sub>).

Se presentan datos relativos al establecimiento del cultivo de *Babesia bovis*, destacando que después de permanecer 33 días *in vitro*, la dilución acumulativa resultante de los subcultivos practicados fue aproximadamente de  $55.9 \times 10^{12}$ .

Promedios de porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) obtenidos en cultivos con diferentes tratamientos utilizados durante 8 días son presentados. PEP promedio de cultivos incubados en 5% CO<sub>2</sub> en aire (3.26) resultó ser estadísticamente superior ( $P < 0.05$ ) al obtenido en aquellos incubados en 2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 93% N<sub>2</sub>.

Recibido para su publicación el 17 de enero de 1984.

\* Proyecto parcialmente Financiado por CONACYT.

<sup>1</sup> Departamento de Hemoprotozoarios, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SARH, Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, D.F., C.P. 05110.

<sup>2</sup> Departamento de Genética, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SARH, Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, D.F., CP. 05110.

(2.17). El mejor promedio de porcentaje de eritrocitos parasitados fue logrado en el tratamiento Núm. 10 (5.13), en el cual, 5% de glóbulos rojos, 4 mm de nivel de fluido e incubación en elevada tensión de oxígeno (5% CO<sub>2</sub> en aire), fueron utilizados; siendo estadísticamente diferente ( $P < 0.01$ ) al resto de los tratamientos.

### Introducción

Los protozoarios pertenecientes al género *Babesia* son parásitos obligados intraeritrocíticos transmitidos por garrapatas que causan la entidad clínica denominada babesiosis (McCosker, 1981). La babesiosis causada por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* tiene su principal influencia sobre el desarrollo de la ganadería en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Ristic y Arellano, 1981).

Los conocimientos y acciones encaminados hacia la prevención de la babesiosis se ven obstaculizados por la ausencia de métodos para la producción de antígenos en cantidades elevadas; ya que hasta recientemente la única fuente de parásitos era el hospedador bovino infectado (Gravely *et al.*, 1979); (Smith, James y Ristic, 1981), lo cual limita severamente la población de microorganismos disponibles para estudio (Vega *et al.*, 1980). Este problema puede resolverse logrando el desarrollo de métodos que permitan el crecimiento y la propagación continua *in vitro* de los organismos del género *Babesia*, los cuales proporcionan antígeno suficiente que puede utilizarse como agente inmunizante o bien para la realización de pruebas inmunológicas (Gravely, *et al.*, 1979); (James y Levy,

(1980); (James, Levy y Ristic, 1981); (Ristic y Arellano, 1980); (Smith, James y Ristic, 1981); (Vega, *et al.*, 1980a); (Vega, *et al.*, 1980b).

Con base en lo anteriormente citado, se han desarrollado y modificado sistemas para cultivar *B. bovis* bajo condiciones *in vitro*. Ante el hecho de que es posible cultivar satisfactoriamente *Plasmodium falciparum in vitro* en condiciones de velobiosis (Trager y Jensen, 1976); (Jensen y Trager, 1977) y dado que *B. bovis* comparte algunas características semejantes con dicho parásito, se consideró que *B. bovis* podría reproducirse bajo condiciones similares, sin embargo, los intentos que se realizaron con este método tuvieron poco éxito (Erp *et al.*, 1978); (Timms 1980). No obstante, Erp *et al.* (1978) desarrollan un método que permite el crecimiento a corto plazo de *B. bovis* en el sistema denominado matraces de agitación magnética, incubando el cultivo en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire. Más tarde, se encontró que disminuyendo el pH del medio de cultivo se logra un crecimiento continuo de *B. bovis* (Erp *et al.*, 1980). El porcentaje de eritrocitos parasitados, relativamente bajo, los grandes volúmenes de cultivo requerido, así como el excesivo manejo proporcionado a los matraces en este sistema limitan su aplicación (Levy Ristic, 1980).

Levy y Ristic (1980) utilizando el método llamado sistema microaerofílico estacionario logran dar un gran paso al permitir la multiplicación continua de *B. bovis* en eritrocitos de bovino sedimentados en placas de microtitulación de 96 pozos con fondo plano, e incubando el cultivo a 37 C o 38 C en 5% CO<sub>2</sub> en aire. Este sistema ha sido refinado por Palmer, Buening y Carson (1982). Recientemente, Rodríguez (1983) presentó una modificación al sistema, en el cual ha sido posible aislar *B. bovis* a partir de animales portadores y más significativo el hecho de que este sistema ha sido usado para clonar *B. bovis*.

El presente estudio se llevó a cabo con el objeto de establecer el cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* en nuestro país, utilizando el sistema microaerofílico estacionario

descrito por Levy y Ristic (1980) con las modificaciones proporcionadas por Palmer, Buening y Carson (1982) y Rodríguez (1983); así como las condiciones óptimas de multiplicación de *B. bovis* bajo las condiciones medioambientales de la ciudad de México.

## Material y métodos

Se obtuvo sangre infectada a partir de un becerro Holstein intacto de aproximadamente un año de edad, el cual se infectó con una cepa de *B. bovis*,\* que estuvo criopreservada en dimetil sulfoxido a -196 C. El vial de 3 ml se descongeló en baño María a 37 C y posteriormente se administró por vía endovenosa (yugular). En el día 11 postinoculación al observarse una parasitemia del 1%, se procedió a la obtención de material infectante mediante punción de la vena yugular colectándose la sangre en un matraz estéril con perlas de vidrio. Una vez defibrinada la sangre, fue centrifugada a 1500 g × 15' a 4C; posteriormente, eliminados el suero y la capa flogística, los eritrocitos se concentraron al 5% en una solución consistiendo de 60% medio 199 y 40% suero normal de bovino (medio completo). El medio fue amortiguado con TES (2 (2-Hidroxi-1,1-Bis(Hidroximetil) etil amino)-etano ácido sulfónico), y el pH se ajustó a 6.9 con HCl 1N.

En forma similar, se colectó sangre de un donador Holstein adulto. El sobrenadante (suero) obtenido una vez que se centrifugó la sangre, se congeló a -20C para su posterior utilización en la preparación de medio de cultivo completo. El sedimento (eritrocitos) se colocó en solución de Puck G + \*\* y se refrigeró a 4C para utilizarlo como banco de glóbulos rojos normales. Preparadas las suspensiones al 5%, se depositaron 20 ml de glóbulos rojos infectados × 40 ml de eritrocitos normales

\* Cepa Texas, gentilmente proporcionada por el Dr. Zeferino García, Centro Nacional de Parasitología Animal.

\*\* Solución salina de Puck suplementada con glucosa (Palmer, Buening y Carson, 1982).

en una botella de cultivo celular con capacidad de 650 ml la cual se incubó a 37C en una atmósfera de baja tensión de oxígeno (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 93% N<sub>2</sub>). Se permitió la sedimentación de las células, y el medio de cultivo sobrenadante se reemplazó cada 24 hs. Se hicieron pases de los parásitos a una suspensión de eritrocitos no infectados en diluciones de 1:2 a 1:60 cada 48 o 72 hs dependiendo del porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) que se observó en el frotis del sedimento; para esto se practicaron frotis del cultivo diariamente, los que fueron secados al aire y fijados en metanol durante 5 minutos para después teñirlos con colorante en Giemsa al 20% durante 45 minutos.

Al lograrse el crecimiento continuo *in vitro* de *B. bovis* en la botella de cultivo celular y alcanzando un PEP del 4% se procedió a llevar a cabo un estudio para determinar la existencia de las mejores condiciones de multiplicación o bien el tratamiento ideal para obtener una cosecha de parásitos más elevada de acuerdo con las condiciones medioambientales imperantes en el laboratorio.

Para tal efecto, el diseño experimental utilizado consistió en un arreglo factorial 3 × 3 × 2 con 2 observaciones, por medio del cual se apreció el comportamiento del parásito bajo los diferentes tratamientos (Cuadro 1).

Se utilizaron 18 placas de microtitulación de 24 pozos con fondo plano (1 caja por tratamiento). La suspensión de eritrocitos infectados preparada a las distintas concentraciones (5%, 7.5% y 10%), se obtuvo a partir del cultivo de la botella. Los diferentes volúmenes a utilizar: 800 µl, 1,200 µl y 1,600 µl, que corresponden a niveles de fluido de 4 mm, 6 mm y 8 mm respectivamente, consistieron de 50% glóbulos rojos infectados por 50% de eritrocitos normales, de tal manera que en todos los pozos existía un 2% de eritrocitos parasitados al iniciarse el cultivo.

Se utilizaron 2 pozos por placa bajo el siguiente manejo: Reemplazo de sobrenadante y frotis diariamente, subcultivo cada 48 hs, con diluciones 1:2 a 1:5 dependiendo del PEP alcanzado, éste se determinó

CUADRO 1

Cultivo *in vitro* de *B. bovis*.  
Tratamientos utilizados.

Incubación	Eritrocitos (%)	Altura (mm)
5% CO <sub>2</sub> , 2% O <sub>2</sub> , 93% N <sub>2</sub>	5	4
		6
		8
	7.5	4
		6
		8
5% CO <sub>2</sub> en aire	10	4
		6
		8
	5	4
		6
		8
7.5	4	
	6	
	8	
10	4	
	6	
	8	

contando 10 campos del frotis examinado microscópicamente a 1,000 X, para lo cual se midió la longitud del frotis y se marcaron 10 círculos siguiendo una línea diagonal con el objeto de obtener un PEP homogéneo en todos los casos.

Los datos fueron analizados por medio de un diseño de bloques al azar: donde los efectos A (gas), B (% de eritrocitos), C (nivel de fluido) y D (días), se consideran bloques fijos. El modelo al cual es atribuible la variación fue:

$$Y_{ijklm} = \mu + D_i + A_j + DA_{ij} + B_k + DB_{ik} + AB_{jk} + DAB_{ijk} + C_l + DC_{il} + AC_{jl} + DAC_{ijl} + B_{ckl} + DBC_{ikl} + ABC_{jkl} + DABC_{ijkl} + E_{(ijkl)m}$$

Donde  $Y_{ijklm}$  es la m-ésima observación de la l-ésima altura del k-ésimo porcentaje del j-ésimo gas del i-ésimo día.  $\mu$  es la poblacional  $D_i$  el efecto del i-ésimo día bloque.  $A_j$ ,  $B_k$  y  $C_l$  es el efecto del j-ésimo gas, del k-ésimo porcentaje y de la l-ésima altura respectivamente considerados efectos fijos. Dobles, triples y cuádruples interacciones también están involucrados.  $E_{(ijkl)m}$  es el error aleatorio NID (0,  $\sigma^2$ ).

## Resultados y discusión

En lo que respecta al establecimiento del cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* en la botella de cultivo celular, se observó, como lo mencionan Levy y Ristic (1980), que no existió un período de adaptación o selección por parte del parásito en su nuevo medio ambiente, ya que a las 24 horas de incubación se duplicó el porcentaje de eritrocitos infectados (2%) en relación con la parasitemia presentada al inicio del cultivo; encontrándose casi un 100% de parásitos intracelulares maduros (piriformes) lo que indica que el parásito es más capaz de madurar o reinvasar células hospederas en contraposición a las formas jóvenes (anulares) que se observaron en escasa cantidad, tal como lo menciona Rodríguez (1983).

En el Cuadro 2 se presentan los resultados obtenidos en la botella de cultivo celular después de permanecer 33 días en incubación donde se aprecia el número de diluciones practicadas, los porcentajes de eritrocitos infectados, así como la máxima dilución acumulativa de los subcultivos, la cual fue del orden de  $55.9 \times 10^{12}$  en el día 33, dato sobresaliente, ya que denota el potencial reproductivo del parásito sin

que éste se vea afectado a pesar de diluirse en gran escala. Los porcentajes de eritrocitos infectados relativamente bajos encontrados en este estudio —en comparación con los que informan Levy y Ristic (1980), Palmer Buening y Carson (1982) y Rodríguez (1983)— quizá se deben al procedimiento utilizado para obtener los porcentajes de parasitemia, ya que el mayor número de círculos marcados en el frotis que se evaluaba (8) correspondía al centro o aproximaciones a él (evaluándose de 2,000 a 4,000 células) en comparación con los 2 círculos contados en los márgenes del frotis; zona donde, debido al mayor peso específico que adquiere la célula infectada se observa la mayor cantidad de eritrocitos parasitados.

En el Cuadro 2 se observan los promedios de PEP obtenidos durante 8 días de cultivo. Se puede apreciar que el PEP promedio de los cultivos incubados en 5% CO<sub>2</sub> en aire (3.26) fue estadísticamente superior ( $P < .05$ ) al promedio obtenido en las cajas mantenidas en una atmósfera de baja tensión de O<sub>2</sub> (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 93% N<sub>2</sub>) que fue del 2.17%.

Esto probablemente fue debido al hecho de que el cultivo se inició con una parasitemia del 2%; Rodríguez (1983) menciona que cultivos iniciados con 0.5% PEP o

CUADRO 2

*Babesia bovis*: cultivo continuo en el sistema microaerofílico estacionario

Días <i>in vitro</i>	Subcultivo No.	Dilución	Dilución acumulativa	Parasitemia %
2	1	1:2	2	2.43
4	2	1:6	12	5.75
6	3	1:3	36	4.0
8	4	1:4	150	6.49
10	5	1:2	300	3.78
12	6	1:5	1500	7.2
14	7	1:6	9000	3.38
17	8	1:2	$18 \times 10^3$	4.71
19	9	1:2	$36 \times 10^3$	4.25
21	10	1:60	$216 \times 10^4$	5.42
23	11	1:60	$129 \times 10^6$	0.90
25	12	1:60	$777 \times 10^7$	1.03
27	13	1:2	$155 \times 10^8$	1.24
31	14	1:60	$933 \times 10^9$	1.08
33	15	1:60	$55.9 \times 10^{12}$	0.16

**CUADRO 3**  
**Promedio del porcentaje de eritrocitos parasitados con Babesia bovis,**  
**bajo diferentes condiciones de cultivo durante 8 días - bloques**

Altura	(2% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , 93% N <sub>2</sub> )			$\bar{X}$	(5% CO <sub>2</sub> en aire)			$\bar{X}$
	5% G R	7.5% G R	10% G R		5% G.R.	7.5% G.R.	10% G.R.	
4 mm	2.87 bcde	2.43 abcd	2.12 abc		5.13 g	4.49 g	3.31 def	
6 mm	2.28 abc	2.28 abc	2.23 abc		3.40 ef	3.00 cdef	2.28 abc	
8 mm	1.98 abc	1.69 a	1.69 a		3.58 f	2.30 abcd	1.88 ab	
				2.17				3.26 *

Valores con diferente literal son diferentes estadísticamente a ( $P < .01$ ).

\* Significativo a ( $P < 0.05$ ).

más pueden ser fácilmente establecidos en una atmósfera con elevada tensión de oxígeno (5% CO<sub>2</sub> en aire), en cambio con PEP menores al 0.5% no llegan a establecerse los cultivos incubados bajo esa atmósfera. Sin embargo, en este estudio no se realizaron intentos por definir el efecto que resulta del iniciar cultivos con diferentes porcentajes de eritrocitos infectados.

Se pudo apreciar también que, en la medida en que se elevó la concentración de glóbulos rojos, los promedios de PEP tendieron a disminuir, dato que se observa en los 3 diferentes niveles de fluido bajo las 2 diferentes atmósferas de incubación aplicadas, este efecto pudo ser debido a que en los cultivos que poseen un bajo hematocrito, las células infectadas tienen un acceso más uniforme a los nutrientes y gases disueltos en comparación con los que tienen un 10% de Ht como lo menciona Rodríguez (1983). Es importante hacer notar que a medida que se elevó el nivel de fluido en los cultivos, el porcentaje de eritrocitos infectados fue, de igual forma, disminuyendo apreciablemente.

Los mejores promedios de PEP se obtuvieron en cultivos con un 5% de glóbulos rojos, pero con mayor ventaja en los mantenidos en 5% CO<sub>2</sub> en aire. Asimismo, los porcentajes promedio más elevados se observan en las placas con un nivel de fluido de 4 mm. En particular, el cultivo tratado con un 5% de glóbulos rojos, con un nivel de fluido de 4 mm y mantenido en elevada tensión de oxígeno (5% CO<sub>2</sub> en aire) con un promedio de 5.13% de eritrocitos infectados resultó ser estadísticamente superior ( $P < .01$ ) a los tratamientos restantes. El tratamiento que obtuvo la menor respuesta fue el que contaba con 10% de eritrocitos, con 8 mm de altura incubado en baja tensión de oxígeno (1.67%).

El Cuadro 4 muestra el análisis de varianza practicado, donde se observan diferencias altamente significativas ( $P < .01$ ) entre los tratamientos utilizados, así como en la interacción tratamientos y días.

Finalmente se puede concluir que, dado que uno de los principales objetivos del cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* es el de obtener la máxima cosecha de parásitos

CUADRO 4

**Análisis de varianza para el cultivo in vitro de Babesia bovis**

Origen de la variación	G. L.	Cuadrados medios
Días (Bloques)	7	14.8
Error de restricción	0	—
Tratamiento	17	4.8**
Días por tratamiento	119	0.63**
Error	144	0.22

\* ( $P < 0.01$ ).

posible (disponible para su uso como antígeno para pruebas inmunológicas, como inmunógeno así como para estudios en detalle de las características del microorganismo), y bajo las condiciones que se presentan en el laboratorio, se considera que lo adecuado es utilizar incubadora con 5% CO<sub>2</sub> en aire, y cultivos con 5% de hematocrito y con una altura de 4 mm; sin embargo, se tienen muchas probabilidades de que se eleve el porcentaje de eritrocitos parasitados, lo cual quizá se logre haciendo uso de cultivos con diferente hematocrito.

**Agradecimientos**

Los autores expresan su agradecimiento a la Dra. María Roldán de Gordon, así como al personal del Departamento de Investigación en Producción, por las facilidades proporcionadas para la realización del presente trabajo.

De igual manera se agradece la participación del biólogo Carlos Vázquez Peláez del Depto. de Genética INIP-SARH por la labor realizada en el análisis estadístico.

**Summary**

The purpose of the present study was to establish a microaerophilic stationary phase culture for *Babesia bovis* and to determine the optimal conditions in order to obtain a high percent parasitized erythrocytes under our environmental conditions.

18 different treatments were utilized by

means of a  $3 \times 2 \times 2$  factorial arrangement in which 3 different erythrocyte concentrations (5%, 7.5% and 10%), 3 fluid level (4 mm, 6 mm and 8 mm), and 2 atmospheric conditions (5% CO<sub>2</sub> in air and 2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 93% N<sub>2</sub>) were tested.

Results of the establishment of the *in vitro* culture for *B. bovis* are presented. *B. bovis* was maintained *in vitro* for 33 days. The cumulative dilution resulting from subculture was  $55.9 \times 10^{12}$  approximately.

Means of the percentage of parasitized erythrocytes (PPE) obtained in cultures with different treatments during 8 days are presented. Cultures incubated in 5% CO<sub>2</sub> in air had 3.26 PPE. Significant differences ( $P < 0.05$ ) were found between these cultures and the cultures incubated in 2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 93% N<sub>2</sub> which got 2.17 PPE.

The best PPE was gotten in treatment # 10 in which 5% RBC, 4 mm of fluid level and high oxygen tension incubation were utilized, showing a ( $P < 0.01$ ) over the rest of the treatments.

### Literatura citada

- ERP, E.E., S.M. GRAVELY, R.D. SMITH, M. RISTIC, B.M. OSORNO and C.A. CARSON, 1978. Growth of *Babesia bovis* in bovine erythrocyte cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27:1061.
- ERP, E.E., R.D. SMITH, M. RISTIC and B.M. OSORNO, 1980. Continuous *in vitro* cultivation of *Babesia bovis*. *Am. J. Vet. Res.* 41:1141.
- GRAVELY, S.M., R.D. SMITH, E.E. ERP, G.J. CANTO, M. AIKAWA, B.M. OSORNO and M. RISTIC, 1979. Bovine babesiosis: Partial purification and characterization of blood culture-derived *Babesia bovis*. *Int. J. Parasit.* 9:591.
- JAMES, M.A., and M.G. LEVY, 1980. Introduction of protective and sterile immunity against babesiosis with MASP culture-derived antigens and *in vitro* inactivation of *Babesia* merozoites by immune serum. Proc. Review of Research, Progress in bovine anaplasmosis and babesiosis. Mexico City, México, Feb. 26-28. p. 76-80.
- JAMES, M.A., M.G. LEVY and M. RISTIC, 1981. Isolation and partial characterization of culture-derived soluble *Babesia bovis* antigens. *Inf. and Imm.* 31:358.
- JENSEN, J.B. and W. TRAGER, 1977. *Plasmodium falciparum* in culture: Use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J. of Parasitol.* 63(5):883.
- LEVY, M.G. and M. RISTIC, 1980. *Babesia bovis*: Continuous cultivation in a microaerophilus stationary phase culture, *Science.* 207:1218.
- MCCOSKER, P.J., 1981. Global importance of babesiosis. Babesiosis, edited by M. Ristic and J.P. Kreier, *Academic Press Inc.* New York, New York, p. 2-24.
- PALMER, D.A., G.M. BUENING and C.A. CARSON, 1982. Cryopreservation of *Babesia bovis* for *in vitro* cultivation, *Parasitol.* 62:221.
- RISTIC, M. and C. ARELLANO, 1980. Research and training program in hemotropic diseases of cattle, synopsis of accomplishments, Proc. Review of Research, Progress in bovine anaplasmosis and babesiosis. Mexico City, México, Feb. 26-28, p. 2-7.
- RODRÍGUEZ, S.D., 1983. Development of a modified *in vitro* cultivation technique for *Babesia bovis* and its adaptation for cloning. M.Sc. Thesis, University of Missouri, Columbia, Missouri.
- SMITH, R.D., M.A. JAMES and M. RISTIC, 1981. Bovine Babesiosis: Protection of cattle with culture derived soluble *Babesia bovis* antigen, *Science.* 212:335.
- SNEDECOR, C.W. and W.G. COCHRAN, 1980. Statistical method, 7th edition, *The Iowa State University Press,* 215-223.
- TIMMS, P., 1980. Short term cultivation of *Babesia* species, *Rest. Vet. Sci.* 29:102.
- TRAGER, W. and J.B. JENSEN, 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 193:673.
- VEGA, C., E.E. ERP, R.D. SMITH, M. RISTIC and B.M. OSORNO, 1980a. Continuous *in vitro* cultivation of *Babesia bovis* by spinner flask method, Prog. Review of Research, Progress in bovine 26-28 p. 8-13.
- VEGA, C., E.C. MURILLO, I. GONZÁLEZ, E.E. ERP and B.M. OSORNO, 1980b. Quantitation of *Babesia bovis* from spinner flask cultures utilizing a DNA assay, Proc. Review of Research, Progress in bovine anaplasmosis and Babesiosis, Mexico City, México. Feb. 26-28 p. 17-23.