

## ESTABLECIMIENTO EN MEXICO DEL CULTIVO

in vitro DE *Babesia bigemina*\*

MARIO MONROY BASILIO \*\*

GUADALUPE ROMERO OCADIZ \*\*

RAMON ABOYTES TORRES \*\*

JESUS ANTONIO ALVAREZ MARTINEZ \*\*

GERMINAL JORGE CANTO ALARCON \*\*

CARLOS AGUSTIN VEGA Y MURGUIA \*\*

### INTRODUCCION

Los parásitos sanguíneos pertenecientes al género *Babesia* que afectan al ganado bovino seleccionan como células hospedadoras a los eritrocitos en apariencia maduros y originan cuadros clínicos de anemia severa, (Smith, 1980). La distribución de estos parásitos es mundial, aunque predomina en las regiones tropicales y subtropicales (McCosker, 1981).

Las especies de importancia económica en bovinos son *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* y *B. major* (FAO, 1978), entre ellas destacan las dos primeras por su gran distribución geográfica y marcada patogenicidad (McCosker, 1981). Se ha estudiado que los eritrocitos proporcionan a *Babesia spp* los requerimientos metabólicos indispensables para su crecimiento y reproducción (Rickard, 1970 a, b;

\* Parte de este trabajo corresponde a las Tesis de Licenciatura de los dos primeros autores.

\*\* Proyecto Hemoprotozoarios, Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología, Sector Pecuario, INIFAP-SARH, Km. 15.5 Carr. México-Toluca, C.P. 05110, México, D. F.

Téc. Pec. Méx. Vol. 25, No. 2 (1987).

Rudzinska, 1976; Erp y col., 1978; Irving y Young, 1979; Momen, 1979 a, b; Levy y Ristic, 1980; Azzar y col., 1983; Conrad, 1983; Barry, 1984), así logra una de las fases de su ciclo biológico, ya que el ciclo completo involucra a un hospedador invertebrado perteneciente al orden *Ixodida* (Smith, 1978; Friedhoff y Smith, 1981; Levine, 1982).

La fase eritrocítica del ciclo biológico de las babesias ha permitido la aplicación de modelos de investigación en el laboratorio dirigidos al estudio de sus propiedades bióticas, lo cual ha estimulado el desarrollo de cultivos *in vitro* (Trager, 1978). Los ensayos experimentales que dieron origen a esta metodología fueron iniciados por Nuttall y Graham-Smith (1908), quienes usaron a *B. canis* como sujeto de estudio al suspender eritrocitos de cánidos infectados en soluciones salinas y observar los cambios morfológicos que demostró el parásito bajo estas condiciones.

Las babesias de roedores (*B. microti* y *B. rodhaini*) han sido las principa-

les especies utilizadas en un sinnúmero de modelos experimentales, entre los que destacan las observaciones de Bautista y Kreier (1979), acerca del mantenimiento de *B. microti* durante periodos cortos.

Jensen y Trager (1977) desarrollaron un método para cultivar *Plasmodium falciparum* en condiciones de velobiosis que permitió iniciar los ensayos con *B. bovis* y establecer en México el crecimiento continuo del parásito por primera vez a nivel mundial (Erp y col., 1978, 1980), este acontecimiento contribuyó a que la técnica fuera perfeccionada por Levy y Ristic (1980) al desarrollar el Sistema Estacionario Microaerofílico (SEMA), que años más tarde fue estandarizado en México para el cultivo de la misma especie (Figueroa y col., 1984; Figueroa, 1984).

Simultáneo a los trabajos de Levy y Ristic, Timms (1980) intentó el crecimiento de *B. bigemina*, *B. bovis* y *B. rodhaini*, con utilización de la técnica descrita por Jensen y Tager (1977), obtuvo resultados positivos pero en periodos en extremo cortos, similares a los observados por Nuttall y Graham-Smith (1908). Después aparecieron comunicaciones relativas al cultivo de *B. equi* (Schein y col., 1981) con especial énfasis en el uso de linfocitos de equino como células hospedadoras.

En 1982, Vayren y Toumi lograron el crecimiento de *B. divergens* con la modificación del sistema diseñado para *P. falciparum*, fue hasta ese año que se inicia el cultivo de babesias grandes, al aplicar el sistema descrito por Erp y col., (1978) al cultivo de *B. canis* (Molinar y col., 1982), y en la actualidad se continúa con el cultivo de *B. bigemina* (Vega y col., 1985 a).

## OBJETIVO

El objetivo del presente estudio fue establecer las condiciones necesarias

para el crecimiento y multiplicación de *Babesia bigemina* en el Centro de Investigaciones de Palo Alto, D.F., México, así como la adaptación de algunos aislamientos de campo al sistema de cultivo *in vitro*.

## MATERIAL Y METODOS

Se diseñaron cinco experimentos por duplicado, cada uno elaborado bajo los patrones generales del SEMA.

Con base en la metodología establecida por la estandarización del SEMA para *B. bovis* (Levy y Ristic, 1980; Figueroa y col., 1984, Figueroa, 1984) y *B. bigemina* (Vega y col., 1985 a), se utilizó un bovino Holstein-Friesian de tres años, libre de anticuerpos contra *Anaplasma marginale*, *Babesia spp*, *Brucella spp* así como el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina, que se asignó como donador de células sanas y suero fresco. Los eritrocitos del donador fueron lavados tres veces en la solución de Vega y Martínez (SVyM) pH: (6, 3-6, 5) a 1000 g/4°C durante 15 min y se diluyeron en la misma (1:1 v/v) para formar los bancos de células sanas, las que se almacenaron a 4°C hasta su uso (Vega y col., 1985 a).

El aislamiento de campo ("Texcco") del parásito fue obtenido de un bovino Charolais x Hereford de alrededor de 18 meses de edad, infectado en forma natural. El diagnóstico clínico se comprobó mediante la observación al microscopio de trofozoitos maduros en la que se obtuvo un porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) de 3.0% en frotis teñidos con Giemsa al 20%.

El material sanguíneo infectado se colectó en condiciones de esterilidad, en tubos vacutainer heparinizados por punción de la vena yugular. El paquete eritrocítico infectado se lavó en SVyM a 1000 g/4°C durante 15 min, con eliminación completa de la capa flogística.

Experimento I. Las siembras se realizaron en placas para cultivo de 24 pozos ( $\varnothing$  1.5 cm/pozo) con un volumen fijo de 1005  $\mu$ l (altura = 5 mm) y una concentración de eritrocitos del 10% (dilución 1:1 v/v eritrocitos sanos/parasitados) en medio de cultivo completo (30% suero bovino) con la adición de TES 25 mM y NaHCO<sub>3</sub> 24 mM. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C bajo una presión constante de 5 kg/cm<sup>2</sup> mediante el suministro de una mezcla de gases con baja tensión de oxígeno (5% CO<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub>, 93% N<sub>2</sub>) en una microatmósfera saturada de humedad. Los cambios de medio se efectuaron cada 24 h con eliminación de 800  $\mu$ l.

Los cultivos fueron expuestos a las siguientes variables: a) Efecto de dos tipos de medio (M-199 y RPMI-1640); b) Tres períodos de suministro de la mezcla de gases (5% CO<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub>, 93% N<sub>2</sub>) que fueron de: 15, 30 y 60 min.

CUADRO 1 DISEÑO EXPERIMENTAL	
TIPO DE MEDIO	PERIODOS DE SUMINISTRO DE GASES (minutos)
M-199	15
	30
	60
RPMI-1640	15
	30
	60

Las lecturas de PEP se realizaron cada 24 h en microscopio óptico de frotis teñidos con Giemsa al 20%.

Experimento II. Efectos de diferentes sales tampon. Este experimento se realizó con la utilización de botellas de

\* Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.

cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y placas de cultivo de 24 pozos (pozos  $\varnothing$  1.5 cm) en cada una, con cinco tratamientos: a) testigo/sin sal tampon; b) ACES\* (N-/2-Acetamido/-2-aminoethanesulfonic acid; pKa: 6.88); c) BES\* (N,N-bis/2-Hidroxyethyl /2-aminoethanesulfonic acid; pKa: 7.15); d) HEPES\* (N-2-Hydroxyethyl piperazine -N<sup>1</sup>-2-ethanesulfonic acid, pKa: 7.55) y e) TES\* (N-tris/Hydroxymethyl/-2-aminoethanesulfonic acid, pKa:7.50), en concentraciones de 25 mM. La técnica de cultivo se siguió con base en las observaciones del Experimento I, el uso de sales tampon fue eliminado seis días antes y se inició con un PEP = 0.1.

Experimento III. En esta fase se efectuó la adición de las siguientes concentraciones de NaHCO<sub>3</sub> (0, 6, 12, 24 y 48 mM) ante una concentración constante de la mejor sal tampon del Experimento II (25 mM). El pH basal fue de 6.8 $\pm$ 0.01 y la rutina del experimento exigió la medición del pH del medio sustraído cada 24 h, así como la práctica de subcultivos cada 72 h en ambas fases.

El análisis estadístico consideró un diseño con bloques al azar.

Experimento IV: Se usaron tres tipos de inóculos: 1) Inóculos frescos de aislamientos de campo, 2) Inóculos criopreservados de aislamientos de campo y 3) Inóculos criopreservados de cepas ya antes adaptadas al cultivo *in vitro*.

Los inóculos frescos fueron lavados tres veces en SVyM 1000 g/4°C durante 15 min y liberados de la presencia de glóbulos blancos. Las células criopreservadas fueron descongeladas de -178°C a 37°C en baño María y lavados en SVyM a 1000 g/4°C durante 10 min. Este tipo de inóculos fueron descongelados a los 30, 60, 90, 120, 140 y 560 días postcongelación.

Los cultivos fueron mantenidos en placas de cultivo de 24 pozos (pozos  $\varnothing$  1.5 cm) bajo condiciones de cultivo por 60 días. Los aislamientos de campo

empleados fueron: "Texcoco" (Edo. de México), "Aldama" (Edo. de Tamaulipas), "Ixcuintla" (Edo. de Nayarit) y "Zacazonapan" (Edo. de México); las cepas adaptadas al cultivo que se utilizaron fueron: cepa "III-Seed", cepa "Puerto Rico" y cepa "St. Croix".

Experimento V: Un grupo de cinco animales Hereford-Charolais cuyo rango de edad fue de 14-16 meses, libres de anticuerpos contra **Babesia spp** y **Anaplasma marginale** fue dividido en tres lotes: lote A testigo, con dos animales (1 y 2), lote B inoculado, con dos animales (3 y 4) y lote C inoculado por pase, un animal (5).

El lote A fue inoculado con  $1 \times 10^8$  eritrocitos sanos por vía IM mantenidos en condiciones de cultivo *in vitro*, el lote B se inoculó con  $1 \times 10^8$  eritrocitos parasitados con la cepa "III-Seed" de **B. bigemina** por vía IM. Los parámetros del experimento se registraron desde 10 días antes de la inoculación hasta 30 días postinoculación (PI) y fueron:

observación clínica, temperatura, microhematocrito (vena auricular) y PEP cada 24 h, además de la cuantificación de anticuerpos contra el parásito cada  $72 \pm 10$  h mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

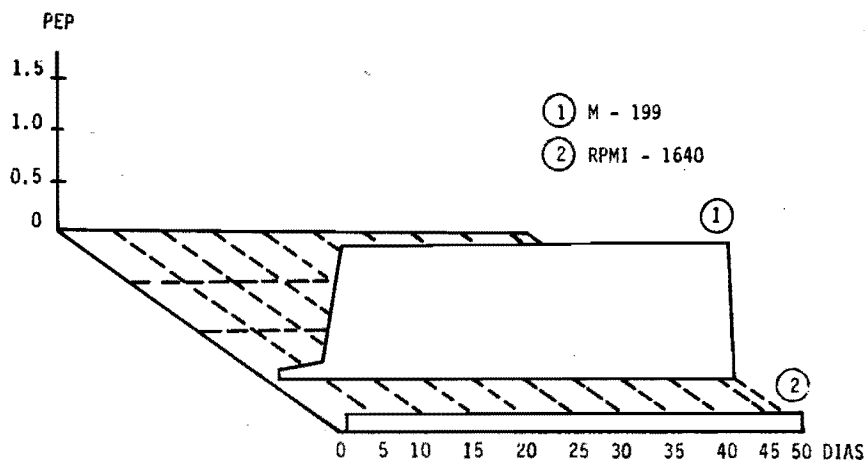
Al bovino No. 5 correspondiente al lote C, se le inoculó por vía subcutánea una mezcla de sangres de los animales (3 y 4) del lote B con 250 ml de volumen total (día 30 PI). En forma simultánea  $50 \mu\text{l}$  del paquete eritrocítico de cada uno de esos animales, se aprovecharon como inóculo para cultivos *in vitro*; el PEP fue calculado cada 24 h a partir del primer subcultivo. Las observaciones del lote C fueron regidas por los parámetros antes citados, fue inoculado un último cultivo con eritrocitos lavados del animal No. 5 a los 30 días PI y se siguió la misma rutina de cultivo otros 30 días.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Experimento I. El PEP estimado en los

GRAFICA 1

COMPORTAMIENTO DEL CRECIMIENTO DE **B. bigemina** EN LOS MEDIOS DE CULTIVO USADOS BAJO EL EFECTO DE VARIABLES SIMILARES EN PLACAS DE CULTIVO DE 24 POZOS \*

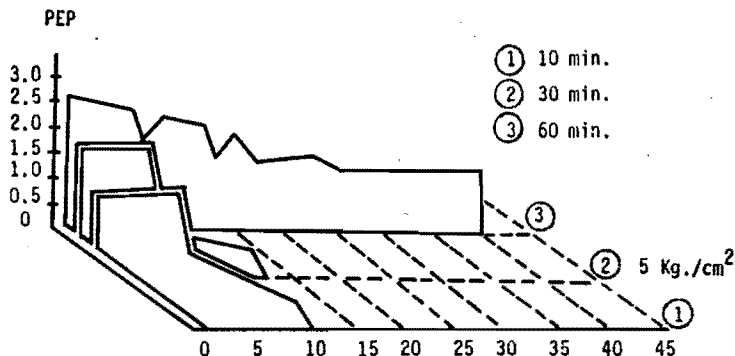


PEP = PORCENTAJE DE ERITROCITOS PARASITADOS.

\* EXPERIMENTO I

**GRAFICA 2**

COMPORTAMIENTO DEL CRECIMIENTO DE *B. bigemina* A DIFERENTES PERIODOS DE SUMINISTRO DE LA MEZCLA DE GASES (5% CO<sub>2</sub> 2% O<sub>2</sub>, 93% N<sub>2</sub>) EN PLACAS DE CULTIVO DE 24 POZOS

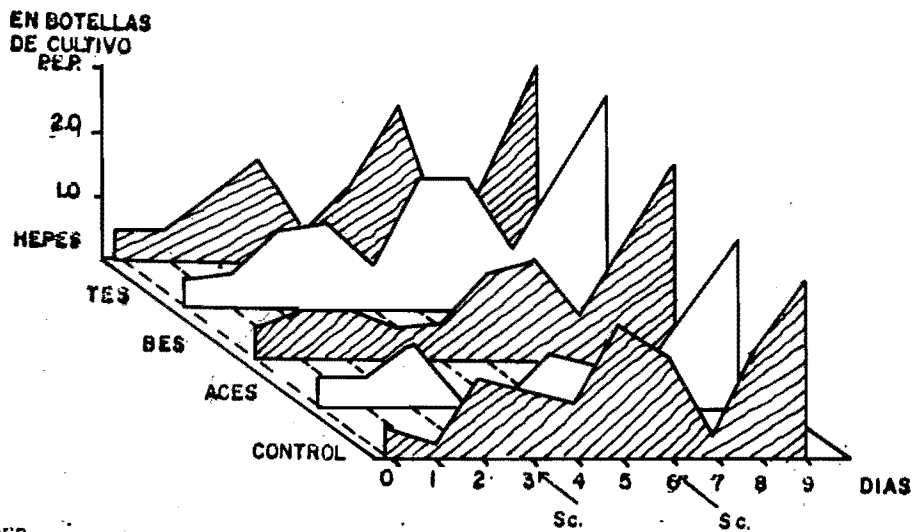


PEP = PORCENTAJE DE ERITROCITOS PARASITADOS.

EXPERIMENTO I

**GRAFICA 3**

EFFECTO DE DIFERENTES SALES TAMPON EN EL CRECIMIENTO DE *Babesia bigemina* EN CONDICIONES DE CULTIVO *in vitro* EN BOTELLAS DE CULTIVO \*



PEP = PORCENTAJE DE ERITROCITOS PARASITADOS

Sc = SUBCULTIVO

\* EXPERIMENTO II

diferentes bloques, fue el indicativo de crecimiento, se observó que el tratamiento bajo la acción de las variables: Medio 199 + 60 min de suministro de la mezcla de gases (5% CO<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub>, 93% N<sub>2</sub>) +  $\bar{X}$ : 18 días bajo condiciones microambientales de laboratorio, permitieron conocer los factores óptimos que **B. bigemina** requiere para multiplicarse *in vitro*. El  $\bar{X}$  del PEP fue de 1.3 a diferencia del calculado para el RPMI-1640 que sólo registró un PEP  $\bar{X}$  = 0.015 bajo el efecto de las mismas variables tal como se aprecia en la Gráfica 1.

Este comportamiento en un principio fue observado por Vega y col., (1985a), con algunas variaciones en la estabilización de células infectadas, aunque las diferencias con **B. bovis** son muy evidentes bajo el mismo sistema, ya que esta última puede registrar PEP

superiores al 30%, (Levy y Ristic, 1980; Figueroa y col., 1984; Figueroa, 1984).

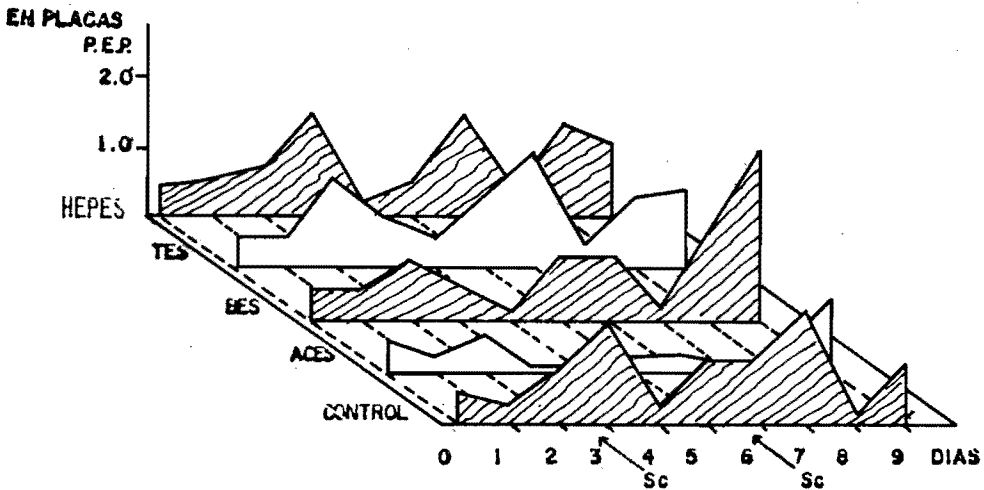
La Gráfica 2 ilustra los requerimientos de presión y períodos de suministro de la mezcla de gases, existe una marcada diferencia entre el período de 60 min -5kg/cm<sup>3</sup> y los otros tratamientos, ya que los cultivos sometidos al efecto de los períodos de suministro de 15 y 30 min decrecieron a partir del segundo subcultivo.

El comportamiento de **B. bigemina** fue por completo distinto al observado bajo las mismas condiciones de laboratorio por **B. bovis** (Figueroa y col., 1984; Figueroa, 1984), lo cual exige considerar un amplio margen de diferencias metabólicas entre ambas especies, al ser sometidas a condiciones microambientales similares.

Experimento II. Las variables asignadas a este experimento fueron encami-

#### GRAFICA 4

EFFECTO DE DIFERENTES SALES TAMPON EN EL CRECIMIENTO DE **Babesia bigemina** EN CONDICIONES DE CULTIVO *in vitro* EN PLACAS DE CULTIVO DE 24 POZOS \*



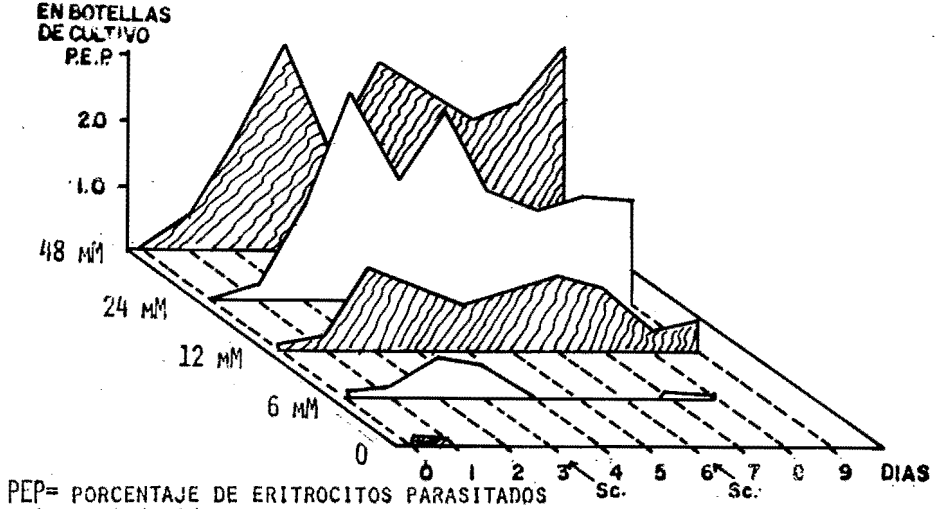
PEP = PORCENTAJE DE ERITROCITOS PARASITADOS

Sc = SUBCULTIVO

\*EXPERIMENTO II

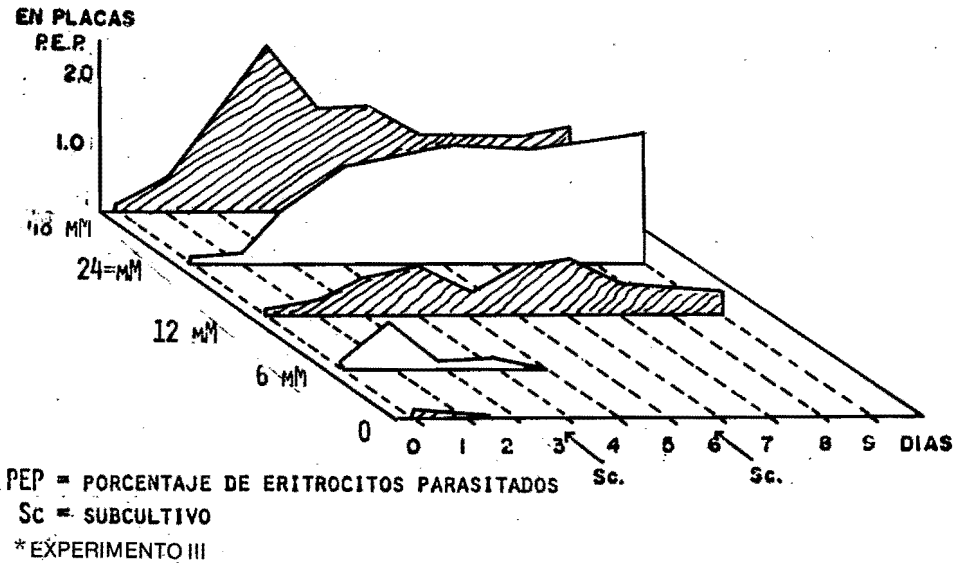
**GRAFICA 5**

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BICARBONATO DE SODIO EN EL CRECIMIENTO DE *Babesia bigemina* EN CONDICIONES DE CULTIVO *in vitro* EN BOTELLAS DE CULTIVO \*



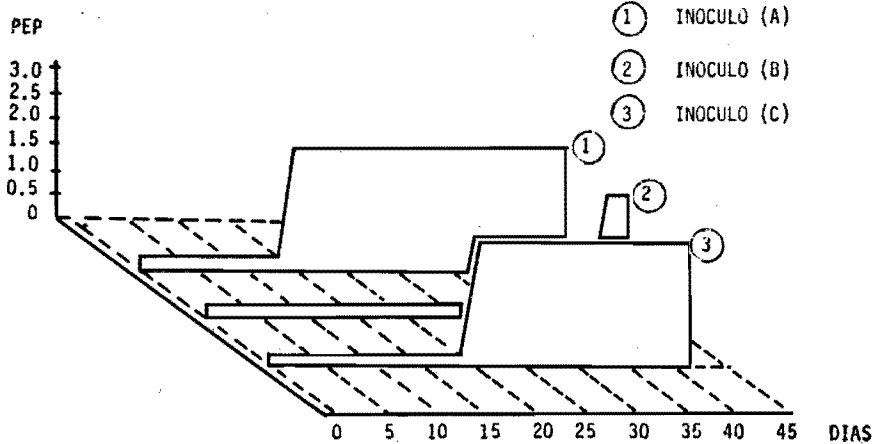
**GRAFICA 6**

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BICARBONATO DE SODIO EN EL CRECIMIENTO DE *Babesia bigemina* EN CONDICIONES DE CULTIVO *in vitro* EN PLACAS DE CULTIVO DE 24 POZOS \*



## GRAFICA 7

ESTANDARIZACION DE LOS PERIODOS DE CRECIMIENTO DE *B. bigemina* in vitro  
EN PLACAS DE CULTIVO DE 24 POZOS CON EL USO DE  
DIFERENTES INOCULOS \*



PEP = PORCENTAJE DE ERITROCITOS PARASITADOS.

### \*EXPERIMENTO IV

nadas a conocer el efecto del pH sobre el crecimiento y multiplicación de *B. bigemina* al ser regulado con sustancias que observan diferentes pKa, con lo cual se definió al TES como la sal amon de elección ( $\bar{X}$  PEP= 2.1 y rango de pH de 7.17-7.66). Las diferencias entre los PEP logrados en los diversos tipos de recipientes usados se aprecia en las Gráficas 3 y 4.

El TES es un estabilizador de pH óptimo para el cultivo de *B. bigemina*, punto concordante con las observaciones de Vega y col., (1985a) aunque no existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos suministrados ( $P > 0.05$ ).

Experimento III. El incremento en la concentración del bicarbonato de sodio favoreció el desarrollo de mejores parasitemias, comportamiento que puede ser observado en las Gráficas 5 y 6; la adición de  $\text{NaHCO}_3$  presupone la función nutritiva que esta sustancia pudiera proporcionar al parásito bajo condiciones de laboratorio.

Las concentraciones 24 mM y 48 mM de  $\text{NaHCO}_3$  presentaron una  $\bar{X}$  de pH de  $7.27 \pm 0.01$  y  $7.65 \pm 0.01$  en forma respectiva. El estudio estadístico demostró que no existió diferencia significativa entre estos tratamientos ( $P > 0.05$ ).

La diferencia entre el uso de placas y botellas de cultivo fue evidente en ambos experimentos, ( $\bar{X}$  PEP = 2.4 botellas vs  $\bar{X}$  PEP= 1.9 placas) con lo cual se aduce que la microatmósfera formada en el interior de las botellas de cultivo favorece el desarrollo de mejores porcentajes de eritrocitos parasitados.

Experimento IV. La cuantificación de los periodos de incubación de las diferentes cepas empleadas asignó una  $\bar{X}$  de 18 días de inóculo tipo "A", pues aunque las lecturas fueron positivas a partir del cuarto día de la inoculación del cultivo, los PEP decrecieron en forma gradual y severa hasta que entre los días 16 a 20 se observó la presencia



de formas anulares; los cultivos del inóculo tipo "B" registraron un  $\bar{X}$  de 40 días, lo que sugiere la presentación del fenómeno de clonación, cuya velocidad de crecimiento es lenta de acuerdo a las clasificaciones de los tipos de clonas que se han descrito para **B. bovis** (Rodríguez y col., 1983) y para **B. bigemina** (Vega y col., 1985b). Los inóculos tipo "C" cubrieron una  $\bar{X}$  de 15 días, lo que corrobora la capacidad de adaptación a las condiciones de laboratorio inducida con anterioridad.

La Gráfica 7 describe el comportamiento del desarrollo de los diferentes tipos de inóculos.

Los inóculos criopreservados en polivinil pirrolidona (PVP) 20% en SVyM fueron viables a los 30,60,90,120, 240 y 560 días postcongelación, esto apoya las recomendaciones que algunos investigadores han hecho sobre las propiedades criopreservativas del PVP, (Palmer y col.,1982; Vega y col.,1985b).

Experimento V. El lote "B" mostró fiebre los días 17 a 19 PI (40.6), en ningún caso hubo anorexia. El PEP fue positivo desde el día 4 al 14 ( $\bar{X} = 0.15$ ), los demás indicadores cayeron dentro de los rangos normales y no difirieron del lote "A". El lote "C" no sufrió alteraciones.

La prueba IFI detectó anticuerpos contra **Babesia bigemina** en los animales de los lotes "B" y "C" con títulos hasta 1:5,130. Los cultivos inoculados con eritrocitos parasitados extraídos de los animales de los lotes "B" y "C" registraron un PEP ( $\bar{X} = 0.04$ ) hasta el día 22 postsiembra, esto sugiere la presentación de un cuadro asintomático en el lote "C".

Estas observaciones pronostican el uso del cultivo *in vitro* para el aislamiento de cepas puras apatógenas o de baja patogenicidad, así como para la atenuación de cepas de marcada virulencia procedentes de áreas endé-

micas, que pueden considerarse como un paliativo en los programas de control de la enfermedad en las áreas de riesgo.

La técnica de cultivo *in vitro* de **B. bigemina** contempla múltiples aplicaciones, sobre todo dentro del área inmunológica pues constituye una nueva estrategia para el control de la babesiasis a nivel mundial al producirse antígeno de mayor calidad para la elaboración de inmunógenos y reactivos diagnósticos.

#### LITERATURA CITADA

AZZAR, G., GNENO, R., LAURENT, N., MOREAU, Y., GOT, R., 1983. Marguage de protéine a la 1<sup>er</sup> S1-L-méthiline dans les sirnageants de culture *in vitro* de **Babesia canis**. 2nd. International Conference on malaria and babesiosis. Annecy, France.

BARRY, D.N., 1984. Metabolism of **Babesia microti** *in vitro*. Change in adenylate energy and infectivity of **Babesia rodhaini** infected erythrocytes. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* p. 62.

BAUTISTA, C.R. and KREIER, J.P., 1979. Effect of immune serum on the growth of **Babesia microti** in hamster erythrocytes in short term cultivation. *Inf. Imm.* 25:470.

CONRAD, P.A., 1983. Incorporation of tritiated nucleic acid precursors by **Babesia bovis** *in vitro*. 2nd. International Conference on Malaria and Babesiosis. Annecy, France.

ERP, E.E., GRAVELY, S.M., SMITH, R.D., RISTIC, M., OSORNO, B.M. and CARSON, C.A., 1978. Growth of **Babesia bovis** in bovine erythrocyte cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27:1061.

ERP, E.E., SMITH, R.D., RISTIC, M. and OSORNO, B.M., 1980. Continuous *in vitro* cultivation of **Babesia bovis**. *Am. J. Vet. Res.* 41:1141.

FAO, 1978. Report of the Second FAO Expert Consultation of Research on Tick-borne Diseases and their vectors. Rome, Italy, 1977.

FIGUEROA, M.J., CANTO, A.G., JUAREZ, F.J. y RUIZ, L.F., 1984. **Babesia bovis**: Establecimiento y condiciones óptimas de multiplicación. *Tec. Pec. Méx.* 46:46.

- FIGUEROA, M. J., 1984. Cultivo *in vitro* de **Babesia bovis**: Establecimiento del sistema fase estacionaria microaerofílica y condiciones óptimas de multiplicación. Tesis de Licenciatura, Esc. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Méx.
- FRIEDHOFF, K.T. and SMITH, R.D., 1981. Babesiosis: Transmission of **Babesia** by ticks, Babesiosis. Edited by Ristic M. and Kreier, J. P. Academic Press, Inc., New York, U.S.A.
- IRVING, A.D. and YOUNG, E.R., 1979a. Further studies on the uptake of triated nucleic acid precursors by **Babesia spp** of cattle and mice. *Int. J. Parasitol.* 9:109.
- IRVING, A.D. and YOUNG, E.R., 1979b. Introduction and multiplication of bovine **Babesia** in human cells. *Res. Vet. Sci.* 25:245.
- JENSEN, J.B. and TRAGER, W., 1977. **Plasmodium falciparum** in culture: Use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J. Parasitol.* 63 (5):883.
- LEVINE, N.D., 1982. Apicomplexa. Synopsis and classification of living organisms. McGraw Hill Co. Inc. p. 571.
- LEVY, M.G. and RISTIC, M., 1980. **Babesia bovis**. Continuous cultivation in a Microaerophilus Stationary Phase Culture. *Science.* 207:1218.
- MCCOSKER, P.J., 1981. Babesiosis: The global importance of Babesiosis. Edited by Ristic, M. and Kreier, J.P. Academic Press, Inc. New York, U.S.A.
- MOLINAR, E., JAMES, M.A., KAKOMA, I. HOLLAND, C. and RISTIC, M., 1982. Antigenic and Immunogenic Studies on cell culture-derived **Babesia canis**. *Vet. Parasitol.* 10:29.
- MOMEN, H., 1979a. Biochemistry of intraerythrocytic parasites III. Comparative studies in carbohydrate metabolism. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 73:117.
- NUTTALL, G.H., GRAHAM-SMITH, G.S., 1908. The development of **Piroplasma canis** in culture. *Parasitol.* 1:243.
- PALMER, D.A. BUENING, G.M and CARSON, C.A., 1982. Cryopreservation of **Babesia bovis** for *in vitro* cultivation. *Parasitol.* 62:221.
- RICKARD, M.D., 1970a. **Babesia rodhaini**: Carbohydrate metabolism and infectivity for rats of cells freed from host erythrocytes. *Exp. Parasitol.* 27:136.
- RICKARD, M.D., 1970b. Carbohydrate metabolism in **Babesia rodhaini**: Investigations with <sup>14</sup>C-labeled substrates and enzyme assays. *Exp. Parasitol.* 28:512.
- RODRIGUEZ, S.D., BUENING, G.M., GREEN, T.J., 1983. Cloning of **Babesia bovis** by *in vitro* cultivation. *Infect. Immun.* 42:15.
- RUDZINSKA, M.A., 1976. Ultrastructure of intraerythrocytic **Babesia microti** with emphasis on the feeding mechanism. *J. Protozool.* 23 (2):224.
- SCHEIN, E., REHBEIN, G. and VOIGT, W.P., 1981. **Babesia equi**: Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmed. Parasit.* 32:223.
- SMITH, R.D., 1978. Ciclo biológico de **Babesia** en la garrapata. *Cienc. Vet.* 2:233.
- SMITH, R.D., 1980. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis II Inter-American meeting of directors of animal health. Edited by Inter-American Institute of Agricultural Sciences OAS. San José, Costa Rica.
- TIMMS, P., 1980. Short-term cultivation of **Babesia** species. *Res. Vet. Sci.* 29:102.
- TRAGER, W., 1978. Cultivation of parasites *in vitro*. *Am. J. Trop. Med.* 27 (2):216.
- VAYRYNEN, R. and TOUMI, J., 1982. Continuous *in vitro* cultivation of **Babesia divergens**. *Acta. Vet. Scand.* 23:471.
- VEGA, C.A., BUENING, G.M., GREEN, T.J., CARSON, C.A., 1985a. *In vitro* cultivation of **Babesia bigemina**. *Am. J. Vet. Res.* 46 (2):416.
- VEGA, C.A., BUENING, G.M., RODRIGUEZ, S.D., CARSON, C.A. and McLAUGHLIN, K., 1985b. Cryopreservation of **Babesia bigemina** for *in vitro* cultivation. *Am. J. Vet. Res.* 46:421.