

Aislamiento de una cepa de campo de *Babesia bigemina* (Piroplasma: Babesiidae) y establecimiento del cultivo *in vitro* para la producción de antígenos

Roger I. Rodríguez-Vivas¹, Franklin J. Quiñones-Avila¹, Genny T. Ramírez-Cruz¹, David Cruz² & Gale Wagner²

1 Departamento de Parasitología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Tel. (999) 942 32 00; rvivas@tunku.uady.mx

2 Department of Veterinary Pathobiology. College Station. Texas A & M. University.

Recibido 11-XII-2001. Corregido 05-IX-2005. Aceptado 12-V-2006.

Abstract: Isolation of a field strain of *Babesia bigemina* (Piroplasma: Babesiidae) and establishment of *in vitro* culture for antigen production. Bovine babesiosis, caused by *Babesia bigemina*, is a barrier for livestock development; it results in high economic loss to Mexican livestock. Control requires adequate antigens for diagnosis and vaccination programs. However, because of antigenic variation among *Babesia* strains, it is necessary to use antigens prepared from local strains. The purpose of the present study was to isolate a local field strain and to establish the *in vitro* culture of *B. bigemina* by the evaluation of the constituent's concentration of culture media. Thirty engorged female *Boophilus microplus* were collected from cattle suffering clinical babesiosis (*B. bigemina*) in Yucatan state, Mexico. These ticks were sent to the laboratory for detection of *Babesia* sp. vermicules. Eggs were kept at 83-85 % humidity and 27 °C until hatching. Larvae were transferred to an esplenectomized calf (B-1). The resulting nymphs were transferred to an esplenectomized calf (B-2). Twelve days later, *B. bigemina* (local strain) was detected in calf B-2 and its infected blood was frozen in liquid nitrogen to initiate the *in vitro* culture. The Microaerophilus Stationary Phase (MASP) *in vitro* culture method was used to reactivate the parasite. Three different concentrations of culture media (70, 60 and 50 %), serum (30, 40 and 50 %) and uninfected red blood cells (5, 10 and 15 %) were used in order to know the convenient concentrations to obtain the highest percentage of infected red blood cells (PEI). The cultured strain was used to prepare antigens for the Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) and several concentrations of serum and conjugate were tested. Strain isolation was successful; 30 days were needed to obtain a PEI of 1.5 %. The isolated strain was frozen in liquid nitrogen and the parasites were reactivated with the *in vitro* culture MASP method. The concentration of culture media that produced the highest PEI (14 %) ($p < 0.05$) was 30 % serum, 70 % M199 and 5 %. Uninfected Red Blood cells antigens were successfully used in the IFAT and the best dilutions to differentiate between positive and negative controls were serum 1:80 and conjugate 1:80. The isolated *B. bigemina* local strain requires particular conditions of *in vitro* culture by the MASP method to reach high numbers of infected red blood cells, needed to prepare and provide high quality antigens for serological diagnosis of *B. bigemina*. Rev. Biol. Trop. 55 (1): 127-133. Epub 2007 March. 31.

Key words: *Babesia bigemina*, isolation, *in vitro* culture, antigen, percentage, infected red blood cells.

En México, la babesiosis bovina ocasionada por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* produce pérdidas económicas a la ganadería nacional (Rodríguez *et al.* 2000), destacándose los impedimentos para la importación de ganado genéticamente superior al nativo, mermas en los niveles de producción de carne y leche,

incrementos de los costos de producción por tratamiento y pérdidas económicas por mortalidad (Guglielmone 1992, Solís *et al.* 1998).

Las estrategias de control de la babesiosis se han enfocado al manejo del vector, quimioprofilaxis, uso de ganado resistente e inmunización empleando antígenos aislados de

infecciones naturales o de cepas aisladas y cultivadas *in vitro* utilizando el Sistema Estacionario Microaerofílico (SEMA) (Rodríguez-Vivas 1992, Rodríguez-Vivas y Domínguez 1993, Solorio y Rodríguez-Vivas 1997). El SEMA ha facilitado el estudio del diagnóstico, inmunidad, detección de epítopes y quimioterapia de la babesiosis bovina. Debido a las variaciones antigénicas que se presentan en distintas cepas de *B. bigemina* es necesario que cada región cuente con antígenos locales para la realización de estudios seroepidemiológicos y de inmunización (Ramírez *et al.* 1998, Solorio *et al.* 1999).

El objetivo del presente trabajo fue aislar una cepa de campo local y el establecer el cultivo *in vitro* de *B. bigemina*, mediante la evaluación de las concentraciones de los constituyentes del medio de cultivo que permitan la mayor producción de antígenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Se realizó un estudio experimental en el Estado de Yucatán, México. Esta región se caracteriza por presentar un clima Aw (cálido subhúmedo). Se emplearon las instalaciones y facilidades de la Unidad de Diagnóstico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Aislamiento de la cepa: Se recolectaron 30 garrapatas *Boophilus microplus* (hembras repletas en estado adulto) de un animal clínicamente enfermo de babesiosis (*B. bigemina*) y se transportaron al laboratorio para determinar la presencia de kinetos de *Babesia* sp. (Cen *et al.* 1998); los huevos de una garrapata positiva fueron incubados hasta su eclosión para transferir las larvas emergidas a un becerro esplenectomizado (B-1), posteriormente las garrapatas en estadio de ninfa fueron transferidas a otro becerro esplenectomizado (B-2) para lograr la infección con *B. bigemina*. Una vez transferidas las ninfas, el animal B-2 fue monitoreado diariamente mediante frotis

sanguíneos teñidos con Giemsa al 10 % para detectar la infección por *B. bigemina*. Además, se determinó el hematocrito y se midió la temperatura rectal del animal. Doce días después de transferidas las ninfas al animal B-2 se colectaron 120 ml de sangre en un frasco estéril con perlas de vidrio. La sangre fue des-fibrinada mediante movimientos rotatorios del frasco durante 10 minutos. Se eliminó la capa flogística y se obtuvo 40 ml de glóbulos rojos los cuales fueron mezclados con 40 ml de PVP (Polivinilpirrolidona, Sigma chemical, USA) al 20 % para proceder a la congelación de la cepa en nitrógeno líquido (crioviales de 1 ml) según la técnica descrita por Vega *et al.* (1985).

Preparación de los medios de cultivo e inicio del cultivo *in vitro*: Para alimentar los cultivos celulares se utilizó un medio de cultivo con distintas proporciones de Medio-199 (M199) (Sigma chemical, USA), suero y eritrocitos de bovino. Los sueros y eritrocitos se obtuvieron de un bovino adulto (donador) proveniente de una zona libre de garrapatas y previamente probado como donador en la Universidad de Texas, USA (Holman y Wagner 1994).

Para iniciar el cultivo *in vitro* de *B. bigemina* se utilizó el SEMA descrito por Holman y Wagner (1994) empleando un medio de cultivo con M199 (60 %) y suero del donador (40 %).

La cepa aislada y congelada fue reactivada de acuerdo al método descrito por Holman y Wagner (1994). Para ello, el cultivo celular se trabajó en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar tipo II. Se utilizó una placa de cultivo de 24 pozos donde se depositó en cada pozo 1 ml del medio de cultivo, 10 % de eritrocitos del donador y 0.25 ml de la cepa congelada. La placa de cultivo fue transferida a una cámara húmeda con una mezcla especial de gases (93 % N₂, 2 % O₂ y 5 % CO₂) y conservada en una incubadora a 37 °C y humedad del 80 %. Cada 24 h, 0.90 ml del medio sobrenadante fue eliminado de los cultivos y se adicionó la misma cantidad de M199 (60 %) y suero del donador (40 %). Para conocer el porcentaje de eritrocitos infectado (PEI) se procedió a realizar diariamente un

frotis teñido con Giemsa al 10 % de cada pozo de cultivo.

Diseño del experimento: Después de 30 días de iniciar la reactivación de la cepa en congelación se inició el diseño para conocer las condiciones óptimas del cultivo. La decisión de realizar subcultivos de cada pozo (Holman y Wagner 1994) se realizó de acuerdo a los resultados obtenidos. Para ello se hicieron nueve tratamientos con cinco repeticiones cada uno (Cuadro 1).

Diariamente en cada pozo se eliminó 1.0 ml del medio de cultivo sobrenadante y se le adicionó la misma cantidad de medio de cultivo nuevo sin perturbar el sedimento celular, se tomó una muestra de 0.03 ml del sedimento para hacer un frotis en un portaobjetos. Los frotis fueron teñidos con Giemsa al 10 % y se obtuvo el PEI (Holman y Wagner 1994).

Análisis de los datos: Los PEI registrados de cada una de las cinco repeticiones de cada tratamiento fueron analizados mediante la

prueba de análisis de varianza de mediciones repetidas. Como variable independiente se consideró el día en que se realizó el cultivo celular y como variable dependiente el PEI. Se determinó el PEI acumulado de los tratamientos que presentaron crecimientos estadísticamente significativos ($p < 0.05$), mediante la medición de cuatro pases sucesivos. Posteriormente a través de un análisis estadístico de diferencias entre medias de los PEI de cada tratamiento se determinó su significancia ($p < 0.05$).

Producción de antígenos: El mejor tratamiento fue usado como fuente de antígeno para desarrollar la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) mediante el método descrito por Goff *et al.* (1982). Se hicieron 50 repeticiones de cinco sueros controles positivos y cinco negativos donados por la Red Internacional de Hemoparásitos de la FAO. Los sueros y conjugado tuvieron diluciones de 1:40, 1:80 y 1:120. El diagnóstico se realizó utilizando un microscopio de epifluorescencia (Goff *et al.* 1982).

CUADRO 1

Proporciones de suero bovino, medio M199 y eritrocitos para el cultivo in vitro de una cepa de B. bigemina (BbigYUC-2002)

TABLE 1

Proportions of bovine serum, medium M199, and red blood cells to grow a B. bigemina strain by in vitro culture (BbigYUC-2002)

Tratamiento	Proporción del medio de cultivo	Volumen de eritrocitos
a1b1	a1: 30 % SB + 70 % M199	b1: 5 %
a2b1	a2: 40 % SB + 60 % M199	b1: 5 %
a3b1	a3: 50 % SB + 50 % M199	b1: 5 %
a1b2	a1: 30 % SB + 70 % M199	b2: 10 %
a2b2	a2: 40 % SB + 60 % M199	b2: 10 %
a3b2	a3: 50 % SB + 50 % M199	b2: 10 %
a1b3	a1: 30 % SB + 70 % M199	b3: 15 %
a2b3	a2: 40 % SB + 60 % M199	b3: 15 %
a3b3	a3: 50 % SB + 50 % M199	b3: 15 %

SB: Suero bovino de un donador

M199: Medio M199 (Sigma chemical, USA)

a: Concentración del medio de cultivo (suero bovino + M199)

b: Volumen de eritrocitos.

RESULTADOS

Aislamiento de la cepa: Una cepa de *B. bigemina* proveniente de una teleogina de *B. microplus* fue aislada en el estado de Yucatán, México. Kinetos de *Babesia* sp. fueron observados al día nueve post-recolección de la teleogina. *B. bigemina* fue detectada (BbigYUC-2002) en el animal B-2 el día 12 posterior a la transferencia de las ninfas recolectadas del animal B-1 (Fig. 1). Cinco días posteriores a la aparición de los primeros merozoítos de *B. bigemina* en sangre se alcanzó un PEI de 1.5 % y se procedió a la colección y congelación de la cepa, ya que el animal B-2 se encontraba en condiciones cercanas a la muerte, manifestando signos clínicos característicos de la infección (anemia, ictericia, fiebre, hemoglobinuria).

Reactivación de la cepa local de *B. bigemina*: La cepa BbigYUC-2002 fue reactivada de su estado de congelación en nitrógeno líquido al ser transferida al cultivo *in vitro*. Se requirió 30 días para tener una PEI del 1.5 % e iniciar el diseño experimental para conocer las condiciones óptimas del cultivo.

Mantenimiento de los cultivos y medición del porcentaje de eritrocitos infectados: Los nueve tratamientos realizados permitieron mantener viva la cepa aislada; sin embargo, los tratamientos b1 (5 % de eritrocitos) permitieron alcanzar el mayor PEI ($p < 0.05$), siendo este del 14 %. En cuanto a las proporciones de los constituyentes del medio de cultivo, los niveles de tratamiento a1, a2 y a3, permitieron alcanzar mayores PEI ($p < 0.05$), (Cuadro 2), siendo el tratamiento a1b1 el que presentó el mayor PEI ($p < 0.05$) al día cuatro del cultivo. Al quinto día el PEI descendió, por lo que se decidió hacer los subcultivos cada cuatro días.

Debido a que la concentración de eritrocitos al 5 % (variable b1) en los pozos de cultivo fue el factor decisivo para alcanzar mayores PEI ($p < 0.05$), se realizaron cuatro mediciones adicionales de los tratamientos a1b1, a2b1 y a3b1 para observar la repetibilidad de los datos (Fig. 2).

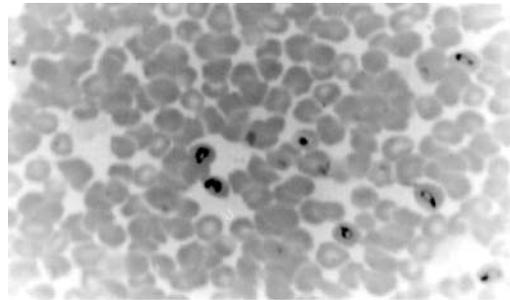


Fig. 1. *B. bigemina* (BbigYUC-2002) en el animal B-2 el día 12 posterior a la transferencia de las ninfas recolectadas del animal B-1 infectado en forma artificial.

Fig 1. *B. bigemina* (BbigYUC-2002) strain detected in calf B-2 twelve days after artificial infection through the nymph stage collected from calf B-1.

Durante 16 días de cultivos continuos de la cepa BbigYUC-2002 el tratamiento a1b1 alcanzó mayor PEI acumulado (44.3 %), siendo significativamente diferente ($p < 0.05$) a los demás tratamientos (a2b1 y a3b1).

Producción de antígenos e implementación de la prueba de IFI: En la implementación de la prueba de IFI, todas las diluciones realizadas permitieron que los controles positivos presentaran fluorescencia al momento de la lectura; sin embargo, la mejor apreciación de la fluorescencia se encontró con las diluciones 1:80 del suero y 1:80 del conjugado.

DISCUSIÓN

La cepa aislada fue congelada y reactivada con éxito. El periodo de reactivación fue de 30 días, coincidiendo con estudios previos donde se registraron 35 días (Monroy *et al.* 1987). Este periodo de adaptación es prolongado si se compara con estudios que inician el cultivo a partir de sangre fresca de un animal infectado, demorando tan solo seis días para iniciar la realización del primer subcultivo (Vega *et al.* 1985).

El tratamiento que presentó mayor PEI fue el a1b1 (70 % de M199, 30 % suero y 5 % eritrocitos) alcanzando hasta un 14 % al día 4 del cultivo. Estos resultados son superiores al compararlos con otros estudios realizados en

CUADRO 2
Promedio de eritrocitos infectados (1000 eritrocitos evaluados) observados en el cultivo in vitro de B. bigemina (BbigYUC-2002)

TABLE 2
Mean of infected red blood cells (1000 tested red blood cells) reached with in vitro culture of B. bigemina (BbigYUC-2002)

Tratamiento	N	PEPI (%)	DIA 1	DIA 2	DIA 3 Promedio*	DIA 4	DIA 5
a1b1	5	1.5	19.75 b	62.05 a	105.41 a	143.55 a	120.47 a
a2b1	5	1.5	20.50 b	48.16 b	92.84 a	101.60 b	98.56 ab
a3b1	5	1.5	16.91 b	42.01 bc	86.16 a	99.68 b	92.41 b
a1b2	5	1.5	20.07 b	36.05 dc	39.70 c	39.57 c	38.84 d
a2b2	5	1.5	28.75 a	50.82 ba	63.07 b	51.53 c	51.88 c
a3b2	5	1.5	22.50 ab	30.42 de	35.94 dc	27.85 d	26.10 e
a1b3	5	1.5	16.89 b	26.14 e	23.12 e	20.95 d	23.68 e
a2b3	5	1.5	27.52 a	47.56 b	27.71 e	28.52 d	25.03 e
a3b3	5	1.5	12.21 c	30.22 de	28.66 de	23.41 d	23.93 e

Los promedios con literales distintas difieren significativamente ($p < 0.05$).

Promedio*: Los promedios fueron obtenidos de un total de 1000 eritrocitos evaluados.

N: Número de repeticiones.

PEPI (%): Porcentaje de eritrocitos infectados al inicio del tratamiento.

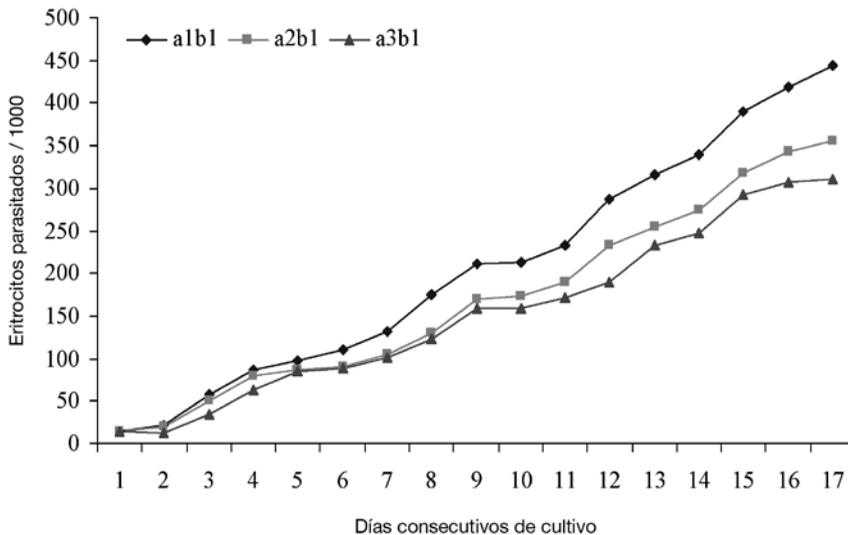


Fig. 2. Porcentaje de eritrocitos infectados acumulado de los tratamientos a1b1, a2b1 y a3b1 para el cultivo *in vitro* de una cepa de *B. bigemina* (BbigYUC-2002). a1b1: Tratamiento con 30 % de suero bovino-70 % de M199, más 5 % de eritrocitos; a2b1: tratamiento con 40 % de suero bovino-60 % de M199, más 5 % de eritrocitos; a3b1: Tratamiento con 50 % de suero bovino-50 % de M199, más 5 % de eritrocitos.

Fig. 2. Cumulative percentage of infected red blood cells of treatments a1b1, a2b1 and a3b1 in the *in vitro* culture of *B. bigemina* (BbigYUC-2002). a1b1: Treatment including 30 % bovine serum, 70 %, medium M199, and 5 % red blood cells. a2b1: treatment containing 40 % bovine serum, 60 % medium M199, and 5 % red blood cells. a3b1: Treatment containing 50 % bovine serum, 50 % medium M199 and 5 % red blood cells.

México, donde los PEI obtenidos no llegaron al 3 % (Vega *et al.* 1985, Monroy *et al.* 1987), a pesar de tener las mismas condiciones de cultivo del presente estudio. Es posible que la cepa local aislada (BbigYUC-2002) tenga una mayor capacidad para invadir eritrocitos que se refleja en una mayor patogenicidad.

Los tratamientos a1b1, a2b1 y a3b1 (con 5 % de eritrocitos) presentaron PEI superiores al 9 %, mostrando con esto que el factor que permitió mayor reproducción de *B. bigemina* en el cultivo *in vitro* fue la concentración de eritrocitos. En el presente estudio la concentración de suero del donador no fue un factor decisivo para favorecer la reproducción de *B. bigemina*, aunque Monroy *et al.* (1982) encontraron que *B. bigemina* puede crecer eficientemente en concentraciones de suero que varían de 20 a 50 % en el medio de cultivo.

El tiempo requerido para efectuar los subcultivos (cuatro días) en el presente estudio fue similar a lo reportado en otros estudios (Monroy *et al.* 1982, Kellermann *et al.* 1989). En 16 días de cultivo, el tratamiento a1b1 acumuló 44.3 % de eritrocitos parasitados, siendo este una buena fuente de antígenos para estudios serológicos y producción de vacunas.

Los eritrocitos infectados con *B. bigemina* producidos mediante el cultivo *in vitro* mostraron ser una buena fuente de antígeno para estudios serológicos, ya que en la prueba de IFI se pudo observar numerosos parásitos con fluorescencia definida para diferenciar los controles positivos de los negativos. La mejor apreciación de la fluorescencia se observó con las diluciones 1:80 (suero y conjugado). Resultados similares han sido obtenidos en diversos lugares donde se ha empleado esta técnica con antígenos producidos *in vitro* (Kellermann *et al.* 1989, Ramírez *et al.* 1998, Solís *et al.* 1998, Regassa *et al.* 2003, Mtshali *et al.* 2004). Este método de producción de antígenos elimina las reacciones inespecíficas de la respuesta humoral que ocurre con antígenos provenientes de la infección *in vivo*, principalmente cuando se usa la prueba de IFI.

Aunque los alcances prácticos del cultivo *in vitro* del presente estudio se limitaron

únicamente a la producción de antígenos para la técnica de IFI, la investigación realizada deja la puerta abierta para la producción de inmunógenos en estudios posteriores y al estudio molecular y fisiológico de *B. bigemina*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la International Foundation for Science de Suecia (B/2789-1) por el financiamiento del presente estudio. Asimismo se agradece a Iván Osorio Avilés por el apoyo en el manejo de animales y durante los cultivos celulares.

RESUMEN

La babesiosis bovina ocasionada por *Babesia bigemina* produce grandes pérdidas a la economía pecuaria Mexicana. Debido a las variaciones antigénicas que presenta *B. bigemina* es necesario contar con antígenos locales para la realización de estudios epidemiológicos y de inmunización. Se recolectaron 30 garrapatas *Boophilus microplus* de un bovino adulto clínicamente enfermo de babesiosis (*B. bigemina*) en Yucatán, México. En laboratorio se produjeron larvas, ninfas y una cepa congelada. El aislamiento de la cepa se realizó con éxito y se necesitó 30 días en el cultivo *in vitro* para obtener un PEI del 1.5 %. La cepa fue congelada en nitrógeno líquido y reactivada en el cultivo celular. La concentración del medio que permitió el mayor PEI (14 %, $p < 0.05$) fue: 30 % de suero bovino, 70 % de M199 y 5 % de volumen de eritrocitos. Los antígenos producidos fueron usados exitosamente en la prueba de IFI y la dilución que permitió diferenciar los positivos de los negativos fue suero 1:80 y conjugado 1:80.

Palabras clave: *Babesia bigemina*, aislamiento, cultivo *in vitro*, antígeno, porcentaje, eritrocitos infectados.

REFERENCIAS

- Cen, A.J.F., R.I. Rodríguez-Vivas, A.J.L. Domínguez & G. Wagner. 1998. Studies on the effect of infection by *Babesia* sp. on the oviposition of *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 78: 253-257.
- Goff, W.L., G.G. Wagner & T.M. Craig. 1982. The bovine immune response to tick-derived *Babesia bovis* infection. Serological studies of isolated immunoglobulins. *Vet. Parasitol.* 11: 109-120.

- Guglielmo, A.A. 1992. Long term study of incidence and financial losses due to cattle babesiosis in an Argentinian dairy farm. *Prev. Vet. Med.* 12: 307-312.
- Holman, P. & G. Wagner. 1994. *In vitro* cultivation of *Babesia species*: A review. Texas A & M University, Dallas, Texas, EEUU. p. 1-26.
- Kellermann, K., R. Tsang & I. Kakoma. 1989. Advances in the *in vitro* cultivation of *Babesia* species. In *Babesiosis of domestic animals and man*. Miodriag Ristic. CRC, Boca Raton, Florida, EEUU. p. 255.
- Monroy, M., G. Romero, R. Aboytes, A. Alvarez y J.C. Vega. 1987. Establecimiento en México del cultivo *in vitro* de *Babesia bigemina*. *Téc. Pec. Méx.* 25: 141-150.
- Mtshali, M.S., D.T. De Waal & P.A. Mbat. 2004. A sero-epidemiological survey of blood parasites in cattle in the north-eastern Free State, South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 71:67-75.
- Ramírez, G., T. Jones, C. Brown, J. Domínguez & N. Honhold. 1998. Bovine babesiosis in dual purpose calves in the state of Yucatan, Mexico. *Trop. An. Hlth. Prod.* 30: 45-52.
- Regassa, A., B.L. Penzhorn & N.R. Bryson. 2003. Attainment of endemic stability to *Babesia bigemina* in cattle on a South African ranch where non-intensive tick control was applied. *Vet. Parasitol.* 116: 267-74.
- Rodríguez-Vivas, R.I. 1992. *In vitro* culture of *Babesia bovis*: enzymatic characterization, drug susceptibility and the selection of a drug adapted line. Tesis de maestría, University of Liverpool, Liverpool, Inglaterra. 91 p.
- Rodríguez-Vivas, R.I. & A.J.L. Domínguez. 1993. Cultivo *in vitro* de *Babesia bovis*: una revisión. *Rev. Biomed.* 4: 185-193.
- Rodríguez-Vivas, R.I., A.J.L. Domínguez & G.L. Cob. 2000. Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de Parasitología de la FMVZ-UADY (1984-1999). *Rev. Bioméd.* 11: 277-282.
- Solís, C.J.J., R.I. Rodríguez-Vivas & A.A. Dájer. 1998. Monitoreo de IgG e IgM a *Babesia bigemina* (Haemosporidia: Babesiidae) en becerros del trópico mexicano. *Rev. Biol. Trop.* 46: 1123-1128.
- Solorio, R.J., R.I. Rodríguez-Vivas, E. Pérez & G. Wagner. 1999. Management factors associated with *Babesia bovis* seroprevalence in cattle from eastern Yucatan, Mexico. *Prev. Vet. Med.* 40: 261-269.
- Solorio, R.J. & R.I. Rodríguez-Vivas. 1997. Epidemiología de la Babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. *Rev. Biomed.* 8: 95-105.
- Vega, C., M. Buening, S. Rodríguez, C.A. Carson & C.K. McLaughlin. 1985. Cryopreservation of *Babesia bigemina* for *in vitro* cultivation. *Am. J. Vet. Res.* 46: 412-420.

