AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT
WASHINGTON, D. C. 20523

BIBLIOGRAPHIC INPUT SHEET

FOR AID USE ONLY
0165

1. SUBJECT CLASSIFICATION

A. PRIMARY: Agriculture — AL72-0000-G518

B. SECONDARY: Pests of animals--Colombia

2. TITLE AND SUBTITLE

Determinacion de anticuerpos de babesia por la tecnica de la fijacion del complemento (ganado)

3. AUTHOR(S)

Todorovic,R.A.; Vizcaino G.,Otoniel; Adams,L.G.

4. DOCUMENT DATE	5. NUMBER OF PAGES	6. ARC NUMBER
1971	22p.	ARC

7. REFERENCE ORGANIZATION NAME AND ADDRESS

Tex.A&M

8. SUPPLEMENTARY NOTES *(Sponsoring Organization, Publishers, Availability)*

(In Revista ICA,v.6,no.3,p.213-233)

9. ABSTRACT

10. CONTROL NUMBER

PN-RAA- 114

11. PRICE OF DOCUMENT

12. DESCRIPTORS

Babesiasis
Colombia
Complement fixation
Antibodies

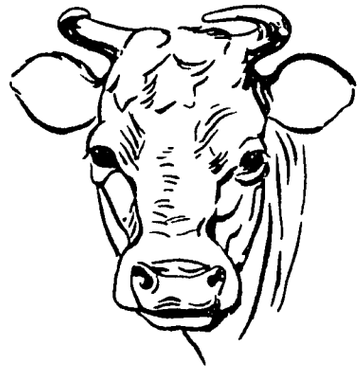
13. PROJECT NUMBER

14. CONTRACT NUMBER

CSD-1947 Res.

15. TYPE OF DOCUMENT

AID 590-1 (4-74)



Radmilo A Tadorovic
Otoniel Vizcaíno G
L.G. Adams

determinación de anticuerpos de babesia por la técnica de la fijación del complemento

SEPARATA DE LA REVISTA ICA

VOLUMEN VI NUMERO 3 SEPTIEMBRE 1971

DETERMINACION DE ANTICUERPOS DE BABESIA POR LA TECNICA DE LA FIJACION DEL COMPLEMENTO*

Radmilo A. Todorovic
Otoniel Vizcaíno G.
L.G. Adams**

1. INTRODUCCION

Desde hace mucho tiempo ha existido preocupación por desarrollar una técnica serológica para el diagnóstico de la babesiosis. Lo más deseable sería un método práctico que permita detectar los anticuerpos para el diagnóstico rápido de la enfermedad durante las varias fases de infección, cuando los parásitos no se encuentran fácilmente en las extensiones sanguíneas.

A pesar de las muchas tentativas que se han hecho, ningún procedimiento práctico ha sido satisfactorio para el diagnóstico serológico de la babesiosis, particularmente en la forma latente de la enfermedad.

En esta revisión se hace un resumen y se discuten los avances recientes en la serodiagnosis de la babesiosis, con atención especial a las técnicas serológicas usadas en el Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias para determinar los anticuerpos de *Babesia* en el ganado infectado.

---

* Contribución de la Texas A&M University en Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical y del Departamento de Ciencias Veterinarias del Instituto Colombiano Agropecuario.

** Respectivamente: Profesor Asociado, "Institute of Tropical Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, Texas. Patólogo Asociado, Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV), ICA, Apartado Aéreo 29743, Bogotá y Profesor Asistente, Institute of Tropical Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University.

2. REVISION DE LITERATURA

Durante más de setenta años la babesiosis se ha reconocido como una entidad infecciosa específica y como severa amenaza económica para la industria ganadera en muchas áreas del mundo; sin embargo, la naturaleza de la interacción inmune huésped-parásito no está bien esclarecida (28).

Una característica notable de la infección por *Babesia*, es la de que los animales que se recuperan de una infección aguda se convierten en portadores del respectivo hemoparásito. Estos animales portadores no se pueden descubrir en extensiones sanguíneas por ninguno de los métodos de coloración actuales. En este caso, para identificar los animales portadores fue necesario desarrollar métodos serológicos para descubrir anticuerpos específicos, en lugar de los propios parásitos.

En las dos últimas décadas algunos conocimientos fundamentales relacionados con la inmunoserología de las varias especies de *Babesia* han conducido al desarrollo de procedimientos serodiagnósticos, los cuales suministran valiosa información al estudio de la patogenesis de la babesiosis y la detección de animales con infección subclínica. Los antígenos usados en estos procedimientos se han obtenido ya sea de A. eritrocitos parasitados (4,5,7,9,12,19) B. de suero o plasma de animales con babesiosis aguda (3,11,15,26) y se utilizaron respectivamente en rigurosas pruebas serológicas.

A. Antígenos de eritrocitos parasitados usados en pruebas serológicas para el diagnóstico de anticuerpos de *Babesia*.

Fijación del Complemento (FC): La reacción de la fijación del complemento constituyó una de las primeras pruebas para el diagnóstico de la babesiosis (9). Una reacción específica de la fijación del complemento para *Babesia*, ha demostrado ser útil para descubrir anticuerpos fijadores del complemento en el suero de animales con babesiosis crónica (10). Sin embargo, la aplicación práctica de la prueba de la fijación del complemento no se ha demostrado de una manera concluyente.

Hirato y Colaboradores (7) informaron por primera vez la posibilidad de aplicar la prueba de FC para el diagnóstico de la babesiosis equina. El antígeno estaba constituído de estroma de eritrocitos de caballos agudamente infectados con *Babesia caballi*. Por medio de la fijación del complemento se encontró que los anticuerpos aparecían en la sangre de 11 a 15 días después de empezar la parasitemia y en un caso persistieron por 100 días.

Mahoney (9) preparó antígenos de sangre de bovinos con infección aguda de *Babesia bigemina* y de *Babesia argentina*, respectivamente. En los sueros de los terneros con infección pura de estos parásitos, se

desarrollaron anticuerpos homólogos fijadores del complemento 7 a 21 días después de la infección. Los anticuerpos se detectaron en todas las fases desde el principio de una parasitemia demostrable en extensiones sanguíneas gruesas, hasta cuando los parásitos fueron muy escasos para encontrarlos en el examen microscópico. Los antígenos poseen un grado de especificidad de especie y muestran solamente reacción limitada con anticuerpos heterólogos. En 1964 Mahoney (10) publicó el uso de la prueba de la fijación del complemento en los estudios epidemiológicos de la babesiosis bovina. En este estudio se usaron antígenos de *B. bigemina y B. argentina.* Durante la infección inicial la reacción fue positiva en 94 o/o al 100 o/o de todos los casos estudiados. Sin embargo, después de cuatro a cinco meses, el número de positivos a la prueba, descendió por debajo del 50 o/o. Lo mismo se observó en terneros nacidos en áreas endémicas, excepto que el porcentaje de la reacción descendió considerablemente.

Las reacciones homólogas fueron consistentes y confiables (74o/o) los primeros meses después de la infección, pero la reacción positiva disminuyó hasta el 8 o/o después de varios meses de infección con *B. argentina.* Con antígenos de *B. Bigemina* el 95 o/o reaccionó al tercer mes de infección, pero bajó al 20 o/o al séptimo mes.

Schindler y Denning (19) estudiaron la reacción de la fijación del complemento en animales infectados con *Babesia rodhaini y Babesia canis.* Prepararon un antígeno para la fijación del complemento de eritrocitos de perro agudamente infectado con *B. canis* por medio de inmuno-hemólisis, o exponiendo los eritrocitos a la acción de la saponina al 0,3 o/o. Los eritrocitos con *B. rodhaini* se lisaron con agua destilada y el sobrenadante, después que se centrifugó para remover el estroma de eritrocitos, sirvió como antígeno para la fijación del complemento. No se observaron reacciones positivas de fijación del complemento en ratones infectados con *B. rodhaini,* porque los animales posiblemente sucumbieron antes de que los anticuerpos pudieran ser demostrados. Se demostraron anticuerpos de *B. canis* en perros 11 a 36 días después de la infección y también se encontraron en animales que habían albergado parásitos por años. Usando el antígeno de *B. canis* no se observó reacción serológica cruzada entre *B. rodhaini y B. canis.* Se encontró que la liofilización es un medio eficiente para preservar por mucho tiempo el antígeno.

Schindler y Colaboradores (20) estudiaron la reacción inmunológica y serológica de la infección de *B. canis* aplicando en ambas las pruebas de fijación del complemento y la prueba indirecta de Coon. Los animales habían sido inmunizados contra la infección con *B. canis* viva o con antígenos solubles de *B. canis.* La inmunidad se adquirió después de la infección con *B. canis* viva. Esta resistencia permaneció después de la desaparición de los anticuerpos fijadores del complemento. Los perros vacunados con antígenos solubles de *B. canis* produjeron anticuerpos fijadores del complemento, pero no inmunidad protectiva. Mahoney (12)

encontró que los antígenos más sensibles a la FC para *B. bigemina* y para *B. argentina* fueron suspensiones crudas de los parásitos preparadas lisando los eritrocitos infectados con agua destilada y concentrando por centrifugación. En pruebas con sueros obtenidos de ganado no expuesto a *B. bigemina y a B. argentina,* no se observaron reacciones inespecíficas de FC a bajas diluciones del suero. Se encontraron más reacciones (4,5o/o) cuando se usó el antígeno de *B. argentina* en comparación con el antígeno de *B. bigemina* (1,6o/o). Las reacciones inespecíficas para *B. argentina* se evitaron por absorción del suero con una suspensión de estroma eritrocítico de bovino normal. Las pruebas de absorción cruzada indicaron que la reacción de FC de la *B. argentina* y de la *B. bigemina* consistían cada una de un componente mayor de especie -específico y un componente menor de grupo -específico. Estos resultados sugirieron que las sustancias asociadas con *B. argentina* fueron las responsables de las diferencias en la especificidad, más bien que el material contaminado de origen bovino en las suspensiones crudas.

Mahoney (13,14) reportó la aplicación de la prueba de la fijación del complemento, para evaluar la resistencia contra la babesiosis bovina producida por vacunación con *B. argentina* muerta, o por inmunización pasiva de los terneros contra la *B. argentina.* Los animales inoculados con *B. argentina* muerta reaccionaron formando anticuerpos fijadores del complemento. Estas respuestas de anticuerpos fijadores del complemento durante el curso de la infección con *Babesia* muerta, se usaron como una guía que indicó que un adecuado estímulo antigénico, es determinado por la producción de inmunidad protectiva contra la babesiosis. La falta del suero convalesciente que contenía un alto nivel de anticuerpos fijadores del complemento para dar protección, sugiere que estos anticuerpos no eran importantes en la reacción inmune. Por lo tanto, ninguna correlación positiva entre la capacidad protectiva y el título de la fijación del complemento del suero pudo ser demostrada. Los anticuerpos fijadores del complemento no parecen estar relacionados con la resistencia inmunológica a la *B. argentina.*

Frerichs y Colaboradores (4,5) prepararon un antígeno de eritrocitos infectados con *B. caballi.* La sangre se colectó en el momento de mayor parasitemia (3,0 a 7,0o/o) y los eritrocitos infectados se mezclaron con 10 volúmenes de agua destilada fría y se lisaron en el término de ocho horas a 4oC. El lisado se centrifugó en una centrífuga refrigerada, dos a cuatro litros por hora, a 2,8 kg de presión de aire por cm^2. El residuo formado en la pared del cilindro de la centrífuga consistía de parásitos y estroma de eritrocitos, éste se mezcló con solución salina de veronal buferada, se filtró, liofilizó y almacenó a 20oC. Las reacciones serológicas de 15 caballos se estudiaron por medio de la prueba de la fijación del complemento. El título de la FC permaneció por mayor tiempo que la capacidad de transmitir la enfermedad en 14 de los caballos y éste fue un

índice confiable de exposición a *B. caballi.* Los autores discuten la gran dificultad en producir el antígeno de *B. caballi,* porque la baja producción del mismo fue causada por el bajo porcentaje de la parasitemia. El uso de caballos esplenectomizados junto con la administración de corticosteroides sintéticos mejoró mucho esta dificultad. La pérdida de especificidad serológica de la *Babesia equi,* después de que se hicieron pases en caballos, fue el mayor problema en la producción de antígenos para la FC. Este problema puede obviarse a) obteniendo aislamiento de cepas frescas, bajo condiciones de campo b) almacenando los parásitos en nitrógeno líquido antes de que se pierda la especificidad.

Prueba de Precipitación en Gel (GP): Ristic y Sibinovic (17) obtuvieron un antígeno del lisado de eritrocitos de caballos infectados en una forma aguda con *B. caballi,* por medio de precipitación con sulfato de protamina. El antígeno se usó para detectar anticuerpos en caballos con babesiosis, por medio de la prueba de difusión doble en gel. La reacción de suero equino en precipitación en gel estuvo correlacionada con la persistencia de la infección latente, demostrada por la transmisión de infección de portadores a caballos susceptibles. La especificidad de la prueba se demostró por la ausencia de reacción con sueros de caballos con otras varias infecciones, incluyendo la anemia viral infecciosa.

Técnica de Anticuerpos Fluorescentes (AF): Ristic y Colaboradores (16) usaron la técnica de anticuerpos fluorescentes, para estudiar el crecimiento de eritrocitos y los estados de desarrollo de la *Babesia caballi* y de la *B. equi,* aislados de caballos en Florida. Por medio de la técnica fluorescente se pudo identificar la estructura morfológica de las especies de *Babesia* en caballos. La *B. caballi* comprende la mayor parte de la población parasítica. Esta especie era más grande que la mitad del diámetro de un eritrocito multiplicado por fisión binaria y aparece sola o en pares en los eritrocitos. Los parásitos de *B. equi* eran menores que la mitad del diámetro de eritrocitos que se multiplicaban por el sistema de división en cuatro células hijas y se presentaban solas en grupos de dos a cuatro y estaban dispuestas de una forma irregular en los eritrocitos.

Ristic y Sibinovic (17) usaron la prueba de inhibición en una etapa, de anticuerpos fluorescentes marcados, en la cual un antígeno reacciona simultáneamente con una mezcla de anticuerpos marcados con fluoresceína, y anticuerpo sin marca, para detectar anticuerpos anti-*Babesia* circulantes. De acuerdo con los autores, la prueba de inhibición en una etapa de anticuerpos marcados con fluoresceína, puede considerarse sólo como una herramienta de investigación que requiere un mayor estudio y evaluación de su precisión y especificidad.

Maden y Holbrook (8) usaron la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes, para detectar anticuerpos en caballos portadores que habían

sido infectados experimentalmente con *B. caballi*. Las reacciones fueron determinadas como específicas. No hubo reacciones cruzadas con sueros de caballos portadores infectados experimentalmente con *B. equi*, cuando se usaron en la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes para *B. caballi*, por lo que la prueba puede usarse para diferenciar las dos infecciones. De acuerdo con los autores el procedimiento involucrado para preparar los reactivos y conducir la prueba fueron más bien directos; sin embargo, la dificultad aparece en la lectura e interpretación de los resultados. La identificación de una reacción altamente positiva es realmente simple, pero la diferenciación entre una reacción débilmente positiva y una negativa, requieren considerable experiencia.

Ross y Löhr (18) desarrollaron una prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes para detectar anticuerpos de *B. bigemina* en suero bovino. La prueba se consideró como altamente específica y precisa y lo suficientemente sensible para detectar reactores infectados dos años antes. Se obtuvieron respuestas clínicas inmunes y susceptibles, cuando los grupos de reactores positivos y negativos a la prueba de fluorescencia indirecta se expusieron a sangre infectada con *B. bigemina*.

Por este medio fue posible demostrar confiabilidad en la prueba, interrelación entre anticuerpos protectores y aquellos detectables por inmunofluorescencia. Las respuestas serológicas a la inoculación de la sangre infectada con *B. bigemina* se midieron por la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes y se encontraron títulos que alcanzaban su máximo a los 21 días (1:1280) después de la infección, disminuyendo gradualmente de allí en adelante, pero todavía por encima de los niveles mínimos al final de un período de seis meses. Se produjo alguna evidencia que indicó una tendencia descendente continuada con respuestas positivas mínimas a la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes, aún fáciles de detectar 18 a 24 meses después de la infección experimental.

Prueba de Aglutinación: Curnow y Curnow (1) reportaron una prueba de hemoaglutinación indirecta (HI), para el diagnóstico de la infección de *B. argentina* en el ganado. Eritrocitos de oveja formalinizados y tratados con ácido tánico, se sensibilizaron con un extracto de la mezcla de estroma de eritrocitos parasitados, usada como antígeno en la prueba de la fijación del complemento para *B. argentina*. Este antígeno también se usó para inhibir la reacción en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Un antígeno preparado de estroma de eritrocitos bovinos de sangre no infectada, se usó para inhibir la prueba de hemoaglutinación indirecta y para absorber los sueros antes de utilizarlos en la fijación del complemento. Haciendo esto fue posible remover algunas de las reacciones inespecíficas. La sensibilidad y especificidad de las pruebas de HI y FC fueron similares.

Todorovic y Colaboradores (23) reportaron una prueba de hemoaglutinación para la titulación de anticuerpos en ratas infectadas con

B. rodhaini. Se colectó sangre con heparina de ratas no infectadas, para proveer eritrocitos para la prueba y se usó una suspensión al 2 o/o de eritrocitos tripsinizados. Se prepararon diluciones seriadas de suero en soluciones salinas fisiológicas. La prueba positiva estaba representada por un aglutinado simple, que no se rompió fácilmente por la agitación manual. Las hemoaglutininas se detectaron por primera vez al sexto día después de la infección con un alto título en el día 12, coincidiendo éstos con la mayor parasitemia.

Curnow (2) reportó una prueba de aglutinación para detectar anticuerpos específicos de *B. argentina,* usando eritrocitos bovinos altamente parasitados como antígeno. La reacción resultó ser altamente específica para cada cepa de *B. argentina.*

Sibinovic y Colaboradores (22) usaron antígeno polisacárido termoestable, extraído de eritrocitos de un equino infectado con *B. caballi y B. equi.* Este antígeno se utilizó para la titulación de anticuerpos en el suero de caballos infectados con babesiosis, por medio de pruebas de aglutinación, bentonita y hemoaglutinación pasiva. Las pruebas de aglutinación con bentonita y hemoaglutinación pasiva requieren menos antígeno y dan resultados más rápidos, en comparación con la reacción de precipitación en gel.

B. Antígenos de suero de animales portadores usados en pruebas serológicas para detectar anticuerpos de *Babesia.*

Sibinovic y Colaboradores (21) observaron una reacción de precipitación en gel en una prueba de difusión doble, cuando el suero de un caballo agudamente infectado con *Babesia caballi y B. equi* reaccionó con suero de un caballo convalesciente. Se encontraron anticuerpos contra los antígenos del suero a los tres meses después de la infección y persistieron en niveles variables durante siete meses. El antígeno desapareció del suero de caballos infectados aproximadamente un mes después de la infección.

Mahoney (11) encontró un antígeno circulante en la fase aguda de la infección con *B. bigemina* y con *B. argentina,* por medio de la técnica de difusión en gel.

Los antígenos del suero aislado de perros con infección aguda de *B. canis* se absorbieron con partículas de látex (0,81 micras de diámetro), de acuerdo con el método descrito por Todorovic y Colaboradores (26) para absorción de antígenos explasmodiales. Estas partículas sensibilizadas de látex se usaron como aglutinógenos en una prueba de aglutinación en los sueros de perros infectados con *B. canis* (28). La detección más pronta de los anticuerpos en la prueba de ALT fue aproximadamente 15 días después de la infección; dos meses más tarde llegaron a su título máximo y persistieron a bajos niveles durante los cuatro meses siguientes a la infección. La persistencia de las aglutininas del suero estaba generalmente

correlacionada con la persistencia de un estado portador de la infección.

Mahoney y Gooder (15) reportaron que dos sustancias antigénicas estaban presentes en los sueros colectados en la infección aguda con *B. argentina,* sin embargo, no se encontraron en el suero del ganado no infectado. Esto se demostró por medio de la prueba de precipitación en gel. El antisuero, contra suero de ternero infectado, preparado en conejos y luego absorbido con suero normal de ternero, contenía anticuerpos precipitantes para los componentes existentes en el suero de terneros infectados. Ese suero ha sido usado intentando caracterizar las sustancias antigénicas producidas durante la infección aguda con *B. argentina.* La primera de estas sustancias antigénicas fue inmunológicamente idéntica al fibrinógeno bovino y la segunda es un pigmento macromolecular complejo que se encuentra en el tejido del ganado normal. No se detectaron antígenos solubles en el suero de origen parasítico, tales antígenos quizás no indujeron una respuesta fuerte de precipitación o se encontraban en tan escasa cantidad que su hallazgo estaba más allá de la sensibilidad de la prueba de difusión en gel usada en su estudio.

Ferris y Colaboradores (3) discutieron el significado y aplicación de los antígenos de *Babesia* hallados en el suero en el serodiagnóstico de babesiosis. Se sugirió una nueva terminología para estos antígenos solubles hallados en el suero o en el plasma durante la infección aguda de *Babesia.* Como son diferentes los antígenos eritrocíticos se denominaron ectoantígenos. Estos ectoantígenos son de naturaleza compleja y contienen péptidos, lípidos, fosfátidos y polisacáridos y pueden usarse para la estimulación de anticuerpos protectores y también en el diagnóstico de la infección aguda y crónica de las especies de *Babesia* en animales y en el hombre.

3. MATERIALES Y METODOS

Los experimentos se hicieron con el fin de evaluar las varias técnicas serológicas para diagnosticar anticuerpos de *Babesia* en el ganado y para desarrollar una nueva prueba serológica para el diagnóstico de la infección de *Babesia.* La investigación se realizó en el Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Bogotá, Colombia.

Prueba de la Fijación del Complemento: Esta prueba usada para detectar anticuerpos de *Babesia* en el suero de animales infectados (9), se modificó en nuestro trabajo. La técnica consiste (1) aislamiento, purificación y titulación de los antígenos de *Babesia;* (2) preparación del sistema hemolítico; (3) titulación del complemento y (4) ejecución de la prueba en tubo y en sistema de microtitulación.

Aislamiento y purificación de los antígenos de *Babesia.*

a. Mantenimiento de la infección: Diez terneros Holstein de dos a tres meses de edad se esplenectomizaron bajo anestesia general (Equi-Thesin, Jen-Sal, 25-40 ml, I.V. por animal). Después de esta operación los terneros se examinaron dos veces por semana durante tres semanas y de allí en adelante semanalmente por dos meses, siendo negativos a hematozoarios. Estos terneros se infectaron con cepas puras de *Babesia bigemina y Babesia argentina* o ambos organismos. Cuando la parasitemia alcanzó un alto porcentaje se hicieron tres pases en otro grupo de terneros esplenectomizados. Después del tercer o cuarto pasaje en terneros esplenectomizados se observó aproximadamente un 50 o/o de parasitemia para *B. bigemina.*

b. Preparación de antígenos de Babesia: Se usaron dos técnicas para el aislamiento de los antígenos de *Babesia.*

Técnica 1. Se colectó sangre de ternero esplenectomizado altamente parasitado, por canulación de la arteria carótida. Se colectaron tres a cinco litros de sangre en un recipiente que contenía EDTA (1,2 g/litro de sangre) como anticoagulante. Después de la colección, la sangre se dejó en nevera (3,5°C) por tres horas para procesarla posteriormente. Se separó el plasma de los eritrocitos infectados por centrifugación, en una centrífuga IEC a 2.500 rpm durante 20 minutos, y se guardó para aislar antígenos solubles. Los eritrocitos infectados se lavaron dos veces con solución salina fisiológica estéril (NaCl 0,85o/o) y cada vez se centrifugó como se hizo al principio y finalmente se resuspendieron los eritrocitos en 10 veces su volumen en veronal buffer (pH 7,2-7,4). Después de lavar los eritrocitos, se fragmentaron por zonificación. Este proceso se hizo tomando un volumen de 150 ml de eritrocitos el cual se suspendió en un baño de agua helada (3-5°C) se zonificó por cinco minutos con una energía de 50 vatios (Sonifier, Cell Disruptor, Model W185, Heat-Systems Ultrasonic, Inc., Plainview, N.Y.). Las suspensiones de eritrocitos infectados que se zonificaron fueron centrifugados en una centrífuga refrigerada automática Sorvall Superspeed RC2B durante 30 minutos a 5.000 xg. Después de centrifugar se guardó el sobrenadante para estudios posteriores (So-I) y el sedimento (se-I) se resuspendió (10 veces su volumen) en agua destilada estéril. Luego se homogenizó en un homogenizador de tejidos (Pyrex 40 ml) por 15 golpes y se centrifugó de nuevo en la centrífuga sorvall por 30 minutos a 5.000 g. El sobrenadante resultante (So-II) se usó en la fijación del complemento como antígeno A de Babesia. El sedimento II se resuspendió en agua destilada estéril, se homogenizó y recentrifugó como en el proceso

anterior. El sobrenadante III se recolectó y se usó en la prueba de fijación del complemento como antígeno B de *Babesia*. Esta técnica se repitió hasta obtener antígenos C y D. El procedimiento descrito anteriormente puede repetirse mientras se halle actividad antigénica en los sedimentos. Los procedimientos descritos arriba deben hacerse el mismo día en que se colecte la sangre.

Técnica 2. Se colectó de un ternero esplenectomizado altamente infectado, como en la técnica 1 y se centrifugó inmediatamente a 2.500 rpm durante 20 minutos. El plasma se decantó y se guardó para aislar antígenos solubles. Los eritrocitos infectados se lavaron dos veces en solución salina fisiológica estéril. Después de centrifugar se agregó al sedimento 10 volúmenes de agua destilada estéril fría. Esta suspensión se colocó en el refrigerador a 3-5°C por una hora para permitir la lisis de los eritrocitos. Si la lisis no es completa la suspensión se deja en el refrigerador por una hora más. Este lisado se centrifugó nuevamente a 5.000 g durante 30 minutos en la centrífuga Sorvall. El sedimento se suspendió en una cantidad igual de veronal buffer pH 7,3. Se diluyeron 200 ml de esta suspensión en veronal buffer para hacer un litro. Esta suspensión se hornogenizó en el homogenizador de tejido Pyrex por un total de 15 golpes y se guardó a -60°C en ampollas de 10 ml. El contenido de las ampollas se descongeló y se procesó posteriormente como se describió en la técnica 1, para aislar antígenos A, B, C y D el día en que se hizo la prueba.

2. Titulación de antígenos de *Babesia*.

Las suspensiones antigénicas se diluyeron en veronal buffer pH 7,3 hasta 1:128 o más. La titulación se hizo con un suero ligeramente positivo (4+a 1:5) conocido, suero negativo, fracciones antigénicas, veronal buffer pH 7,3, complemento y sistema hemolítico, de acuerdo con el procedimiento indicado en la Tabla 4 de "A Manual for Conducting the Complement Fixation Test for Anaplasmosis, ARS, USDA (1958)" (27). Cuando el punto final de la titulación fue determinado, se calculó la dilución deseada del antígeno de *Babesia* y se usó la prueba de fijación del complemento.

3. Preparación del sistema hemolítico.

Se sangró de la vena jugular una oveja adulta normal, en un recipiente de 500 ml que contenía 150 ml de solución Alsever hasta que el nivel totalizó 300 ml bajo condiciones asépticas. Se mezcló suavemente y se guardó en nevera (4°C). Esta suspensión de reserva se refrigeró por un

día antes de usarla en la prueba de la fijación del complemento y puede guardarse y usarse durante dos semanas si no ocurre hemólisis. El contenido del recipiente con el material de reserva se mezcló por rotación lenta, cada día que se necesitó eritrocitos de oveja para la prueba de la fijación de complemento. Para los requerimientos de la prueba se removieron por medio de una pipeta estéril glóbulos rojos suficientes y se colocaron en un tubo de centrífuga cónico graduado. Esta suspensión se centrifugó en una centrífuga IEC a 1.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó por suspensión a través de una pipeta capilar quitándole totalmente la capa de glóbulos blancos. Los glóbulos rojos se lavaron tres veces con cinco volúmenes de veronal buffer pH 7,3 y finalmente se suspendieron los glóbulos rojos en veronal buffer para hacer una suspensión al 2 o/o que se usó en la prueba. Si el sobrenadante no era completamente incoloro, en la tercera lavada, las células se consideraron demasiado frágiles y no se usaron en la prueba del FC. En esta prueba se usó hemolisina comercial. La hemolisina ant. oveja preservada a partes iguales en glicerol, es producida por Syeco-Sylvanna, Milburn, New Jersey, USA. Se diluyeron dos unidades de hemolisina en 0,5 ml de veronal buffer pH 7,3. La titulación y la dilución de la hemolisina se hicieron de acuerdo con el procedimiento descrito en "A Manual for Conducting the Complement Fixation Test for Anaplasmosis, ARS, USDA (1958)" (27).
En la preparación del sistema hemolítico se mezclaron y guardaron a 3-5°C durante un día antes del uso para FC, en cantidades iguales de la suspensión al 2 o/o de eritrocitos de oveja y de hemolisina titulada diluída.

4. Titulación del complemento.

Para la prueba de la FC se utilizó complemento de cobayo liofilizado, producto comercial de Texas Biological Laboratories, Inc., Fort Worth, Texas, el cual consiste en una mezcla de suero total fresco de animales adultos normales. Al complemento liofilizado se agregó cinco ml de la solución restauradora que viene con el producto. El complemento entonces se tituló de acuerdo con el procedimiento descrito en "A Manual for Conducting the Complement Fixation Test for Anaplasmosis, ARS, USDA (1958)" (27).

5. Ejecución de la Prueba de la Fijación del Complemento. Cuando se estandarizaron todos los componentes se llevó a cabo la prueba de la FC como sigue: Por cada muestra de suero se usaron dos tubos que contenían veronal buffer (0,4 y 0,9 ml), a los cuales se les adicionó 0,1 ml de suero; el segundo tubo (0,9) se usó como control. Los

tubos se colocaron en baño maría a 56°C durante 30 minutos para inactivar las muestras, después se removieron del baño y se les dejó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Luego se agregó 0,5 ml de antígeno de *Babesia* al primero de los tubos y no se agregó al segundo que sirve como control anticomplementario. Se adicionaron dos unidades, 0,50 ml de complemento a ambos tubos, se agitaron y se incubaron por una hora en baño maría de 37°C. Luego se agregó un ml de sistema hemolítico a ambos tubos, nuevamente se agitaron y se incubaron durante 45 minutos en el baño maría a 37°C Los resultados se leyeron inmediatamente o después de 12 horas. La lectura inmediata puede hacerse después de centrifugar a 1.000 rpm durante dos a tres minutos en la centrífuga IEC. La lectura a las 12 horas puede llevarse a cabo si los tubos se refrigeran por una noche a 4°C.

Todos los sueros controles deben estar hemolizados completamente puesto que no contienen antígeno. Si algún control presenta eritrocitos no hemolizados, la muestra es "anticomplementaria" falsa-positiva y el status de la muestra puede determinarse por procedimientos especiales. Los tubos que contienen el antígeno de *Babesia* pueden mostrar reacción desde hemólisis completa (prueba negativa) hasta fijación completa (prueba positiva). Las interpretaciones que caen dentro de estas dos reacciones son como sigue: 4+no hay hemólisis -muestra fuertemente positiva; 3+ligera hemólisis -muestra positiva; 2+50 o/o hemólisis -muestra ligeramente positiva; 1+ considerable hemólisis -muestra sospechosa y completa hemólisis -muestra negativa.

6. Titulación del Suero.

Se hace para determinar el nivel de anticuerpos en el número de muestras positivas identificadas por la prueba rápida. Esto se logró por medio de dilución seriada del suero en veronal buffer pH 7,3 hasta una dilución final de 1:1280 de acuerdo a la técnica descrita en "A Manual for Conducting the Complement Fixation Test for Anaplasmosis, ARS, USDA (1958)" (27), por medio de la técnica de la microtitulación descrita por Hidalgo y Dimopoullos (6), para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina. Las técnicas de microtitulación modificadas son las siguientes: En un tubo estéril que contenía 0,3 ml de veronal buffer, se agregó 0,2 ml de suero probado. El tubo se colocó en un baño a 56°C por 30 minutos. Por medio de una micropipeta plástica (Microtiter long delivery tester, Cooke Eng. Co., Alexandria, Va.) se agregó una gota de veronal buffer (0,025 ml), en una bandeja plástica apropiada para esta prueba (Linbro IS–MRC-96). Luego se sumergió un asa metálica precalibrada (Pipette

dropper MFG No. 220-5) (0,025 ml) en un tubo que contenía suero inactivado y se colocó en el primer orificio de la bandeja plástica. El asa se rotó y transfirió al siguiente orificio y así sucesivamente a los demás, para hacer diluciones desde 1:5 hasta 1:640. Con una micropipeta plástica (0,025 ml) se adicionó una gota de antígeno de Babesia a cada una de las diluciones. Luego se agregó una gota (0,025 ml) de complemento a cada dilución y se incubó por una hora a 37°C. Después de la incubación se agregaron con micropipeta dos gotas (0,050 ml) de sistema hemolítico a cada dilución y la bandeja plástica se cubrió con una cubierta adhesiva (Linbro Chemical Co., New Haven, Conn.) y se incubó a 37°C durante 45 minutos. La reacción se leyó utilizando el espejo cóncavo después de dejar la bandeja en nevera (3-5°C) durante 2-24 horas (Figura 1).

Prueba de doble difusión en gel: El aislamiento de los antígenos solubles de especies de *Babesia* que pueden usarse en una prueba de precipitación en gel, se logró por precipitación del sobrenadante de eritrocitos lisados de ganado con infección aguda, por medio de sulfato de sodio o columna de cromatografía (24). Por medio de la prueba de difusión en gel fue posible estudiar la reacción serológica cruzada entre la *B. argentina* y la *B. bigemina* (Figura 2). El uso de la inmunoelectroforesis (25), en el análisis de los antígenos solubles de *Babesia*, ha demostrado de nuevo el excelente poder resolutivo de esta técnica.

Pruebas de Aglutinación: La hemoaglutinación con antígenos solubles de *Babesia* y eritrocitos sensibilizados tratados con ácido tánico se ha realizado en nuestro laboratorio para detectar anticuerpos de *Babesia* (1). También se usó la prueba de la aglutinación del látex en tubo (26) y las reacciones observadas pueden ofrecer información cualitativa y cuantitativa.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Los sueros de bovinos, natural y experimentalmente infectados con babesiosis, se sometieron a la prueba de la fijación del complemento durante un período de dos años. Se probó un total de 5.420 muestras de sangre de ganado durante este período. Estas muestras se obtuvieron de animales en varios hatos experimentales, localizados en el Valle del Cauca, Magdalena Medio, Llanos Orientales y zona de Montería, los cuales tenían historias conocidas de babesiosis y de animales infectados artificialmente en el Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV-ICA) en Bogotá. Diariamente se colectó suero de animales antes y después de la infección artificial o transmitida por garrapatas. En las muestras colectadas

antes de la inoculación de sangre infectada con *B. bigemina* y *B. argentina*, la fijación del complemento fue negativa y permaneció de esta manera hasta el octavo día después de la inoculación. En el 10o. día se observó una reacción de 2 con un título de 1:10. El día siguiente la muestra dió una reacción de 4 con un título de 1:40. Se observó *B. argentina y B. bigemina* en extensiones sanguíneas coloreadas con Giemsa cuatro días después de la parasitemia. La máxima parasitemia observada en el día ocho post-inoculación coincidió con el primer día de la respuesta del anticuerpo fijador del complemento, el cual persistió de una manera variable hasta la muerte de los animales. Ha habido una concordancia excepcional entre la reacción de la fijación del complemento y las historias conocidas de animales con infección natural o por inoculados con sangre infectada. Las muestras de sueros de las fincas particulares en el Valle del Cauca, Magdalena Medio, Llanos Orientales y zona de Montería, dieron una reacción de acuerdo con la historia del animal. Aproximadamente el 95 o/o fueron positivos mientras que un 5 o/o dieron reacciones discordantes. Estas últimas se presentaron especialmente en el suero de algunos de los animales portadores. Se está llevando a cabo un trabajo adicional para probar la precisión de la prueba en el campo, a través de inoculaciones en animales. Esta precisión de la prueba de la fijación del complemento para la babesiosis bovina es uno de los temas de nuestras futuras investigaciones. La prueba de la fijación del complemento descrita por Mahoney (9), se ha usado desde 1964 para el control de la infección de *B. argentina* en el ganado de Australia. Aproximadamente 0,5 o/o del ganado examinado ha mostrado una reacción positiva a la fijación del complemento, pero ha sido negativa para una prueba de transmisión. Esto representa hasta 10 veces el número de animales infectados en algunas áreas (10).

En este trabajo también se encontraron reacciones positivas-falsas a la prueba de la fijación del complemento. Queda el interrogante si la infección, o la vacunación contra otras enfermedades puede presentar una reacción cruzada con la babesiosis. Los estudios futuros se orientarán para precisar la especificidad de la prueba en sueros recolectados de animales infectados con otras enfermedades bovinas comunes en el trópico, o premunizados contra la anaplasmosis bovina. La naturaleza específica de la prueba de la fijación del complemento se estudiará más profundamente en relación con el uso de antígenos de suero o plasma obtenidos en la babesiosis aguda o antígenos más purificados del parásito y además la relación serológica entre la *B. bigemina* y la *B. argentina* de cepas diferentes. El antígeno usado en este trabajo se pudo producir en cantidades, pero tuvo la desventaja de contener demasiada hemoglobina y algunos lotes fueron anticomplementarios. Para el futuro se planea utilizar

la cromatografía en columna para producir un antígeno de *Babesia* más puro. Este proceso removerá la mayoría de la hemoglobina y resultará un antígeno más uniforme. La fijación del complemento usada en nuestro laboratorio para el diagnóstico de la babesiosis bovina ha demostrado ser específica. Como es obvio, los errores mecánicos y técnicos que se presentan en otros procedimientos de fijación del complemento, también se aplican a nuestra técnica. Sin embargo, cuando la prueba se lleva a cabo cuidadosamente usando un antígeno aislado de una sangre altamente infectada, debe ocurrir un error mínimo de precisión y especificidad. Los antígenos usados en este procedimiento se originaron de eritrocitos y del suero de animales con babesiosis aguda y se encontraron útiles para detectar anticuerpos específicos de *Babesia*. Debido a las impurezas, los antígenos sólo pueden usarse en la prueba de la fijación del complemento.

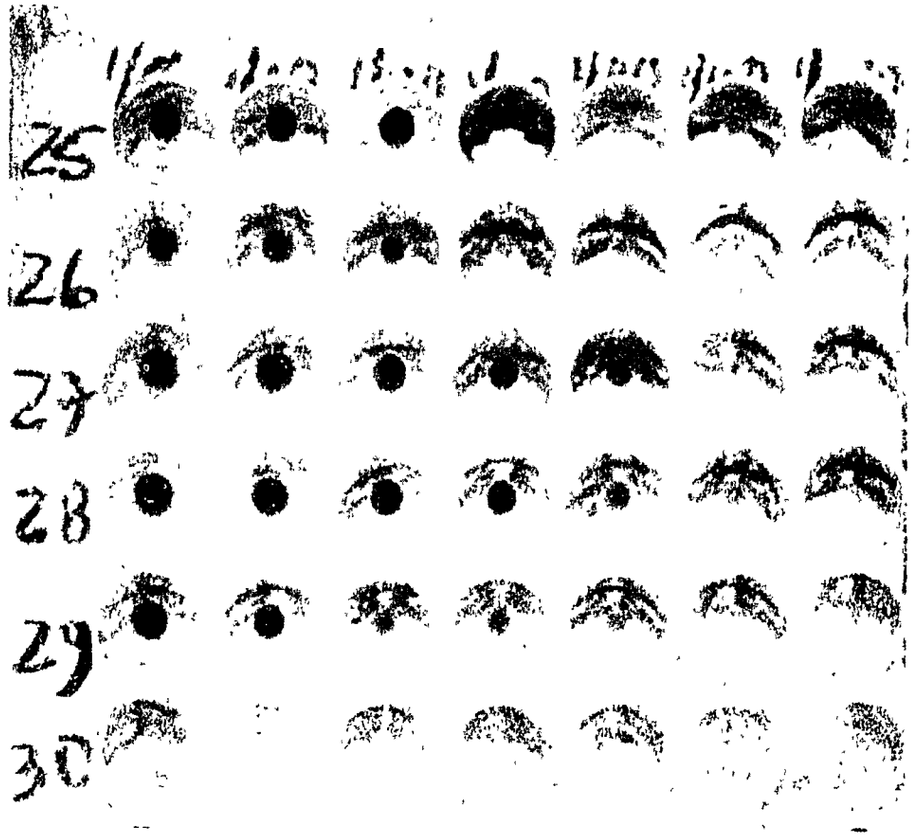


FIGURA 1. Fotografía de la reacción de la fijación del complemento en el sistema de microtitulación, para detectar anticuerpos específicos de *Babesia*. Las filas 25 y 26 contienen suero de animales infectados con *Babesia* en las cuales se observa un título de 1:20; las filas 27 y 28 tienen un título de 1:80. La fila 29 muestra un título de 1:40. La fila 30 tiene un suero negativo como control, el cual presentó una reacción negativa.

Bajo estas circunstancias las variables y dificultades inherentes a la CF se hacen más pronunciadas y la confiabilidad de esta prueba se reduce. Además de la prueba de la fijación del complemento que se ha usado en nuestro laboratorio, se han hecho intentos para aplicar las técnicas de inmunoelectroforesis y difusión doble de gel, para caracterizar la reacción antígeno de la *B. bigemina* y de la *B. argentina*. En el sistema de difusión en agar se observó una reacción cruzada entre el antígeno de la *B. bigemina* y los anticuerpos contra *B. argentina*. La aplicación de las pruebas de aglutinación del látex y hemoaglutinación para detectar los anticuerpos de *Babesia* todavía se investigan en nuestro laboratorio.

Los métodos diseñados hasta la fecha para el diagnóstico serológico de

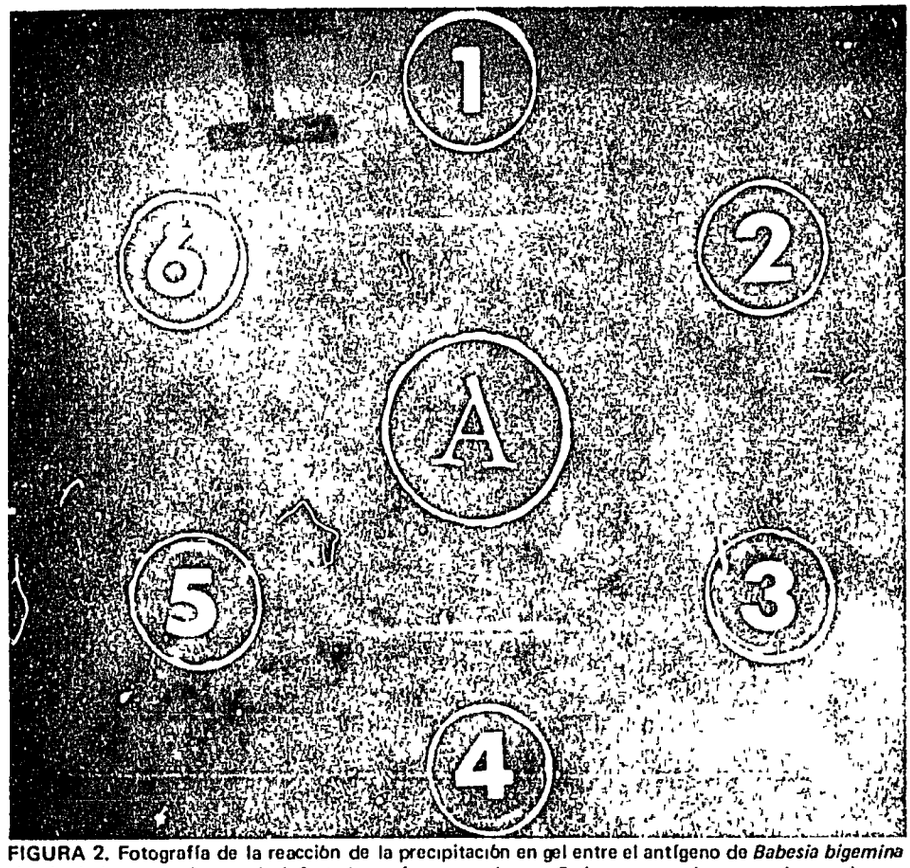


FIGURA 2. Fotografía de la reacción de la precipitación en gel entre el antígeno de *Babesia bigemina* aislado de la sangre de ganado infectado en forma aguda con *B. bigemina* y de sueros de ganado con babesiosis latente. El orificio (a) contiene antígeno de *B. bigemina* y los orificios periféricos 1 y 4 contienen suero de terneros recuperados de *B. bigemina*. El orificio 5 contiene suero de un ternero recuperado de *Babesia argentina*.
No hubo reacción entre el antígeno de *B. bigemina* y los sueros de los terneros no infectados, orificios 2, 3 y 6..

la babesiosis bovina todavía son imperfectos. Se requiere más investigación y es necesario estandarizar los procedimientos serológicos especialmente para el uso práctico. Sin embargo, las técnicas imperfectas disponibles, sirven para el diagnóstico de la babesiosis bovina.

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El descubrimiento del estado portador de la babesiosis bovina ha presentado un problema particularmente difícil, dado que la sangre de un alto porcentaje de animales, no contiene parásitos de *Babesia* suficientes para efectuar un diagnóstico. Por lo tanto, en los últimos tiempos ha habido mucho interés para el desarrollo de una técnica serológica, que ayude en el diagnóstico de la babesiosis.

En esta revisión se ha hecho un intento para compendiar y discutir los avances recientes en el diagnóstico serológico de la babesiosis, con especial atención a los procedimientos serológicos usados en el Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias en Bogotá, Colombia, para detectar anticuerpos de Babesia en ganado infectado. En las dos últimas décadas los conocimientos fundamentales con relación a la inmuno-serología de las diferentes especies de *Babesia,* han llevado al desarrollo de los procedimientos serodiagnósticos para el hallazgo de los anticuerpos de *Babesia.* Los antígenos usados en estas técnicas, se obtuvieron de eritrocitos parasitados y de suero o plasma de animales con babesiosis agudas y se aplicaron en varias pruebas serológicas. La reacción de la fijación del complemento constituyó una de las primeras pruebas para el diagnóstico de la babesiosis.

En años recientes ha habido considerable progreso para mejorar la prueba de la fijación del complemento, para el diagnóstico de la babesiosis. Además se han aplicado las técnicas de precipitación en gel, anticuerpos fluorescentes y aglutinación, para detectar anticuerpos específicos de *Babesia,* utilizando antígenos tanto de eritrocitos parasitados, como de suero obtenido en la fase aguda de la enfermedad. Las investigaciones descritas en este informe se realizaron con el fin de evaluar las técnicas existentes para el diagnóstico de la babesiosis bovina, y desarrollar otras nuevas. La investigación se hizo con la cooperación del Instituto Colombiano Agropecuario en el Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias en Bogotá Colombia. Se aislaron antígenos de las diferentes especies de *Babesia* por medio de dos técnicas y se usaron en la prueba de la fijación del complemento para hallar anticuerpos de *Babesia*, en ganado experimental y naturalmente infectado. Por medio de la fijación del complemento fue posible detectar anticuerpos específicos de *Babesia* en el suero de ganado, ocho días después de la infección por inoculación de sangre infectada. Se probó un total de 5.420 muestras de suero de ganado

infectado con babesiosis. Estos animales estaban situados en varios hatos experimentales localizados en el Valle del Cauca, Magdalena Medio, Llanos Orientales y zona de Montería, con historias conocidas de babesiosis y de animales infectados artificialmente en el Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias, en Bogotá. Aproximadamente el 95 o/o de estas muestras fue positivo, mientras que el 5 o/o presentó reacciones discordantes. Además de la prueba de la fijación del complemento usada en nuestro laboratorio, se han hecho intentos para aplicar la técnica de la doble difusión en gel, para la caracterización de la reacción antígeno-anticuerpo de las distintas especies de *Babesia*. Se observó una reacción cruzada en este sistema entre la *B. bigemina* y la *B. argentina*. La aplicación de las pruebas de aglutinación del látex y de hemoaglutinación, para el hallazgo de los anticuerpos de *Babesia* todavía son objeto de investigación en nuestro laboratorio. Como resultados de estas investigaciones y observaciones, es aparente que se necesita más trabajo para desarrollar una técnica serológica práctica, para el diagnóstico de la babesiosis, que ayude a resolver este problema biológico complejo en las áreas tropicales y subtropicales del mundo.

6. SUMMARY

The detection of the carrier state of bovine babesiosis has presented a particularly difficult problem, since the blood from a high percentage of carrier animals does not contain sufficient *Babesia* parasites on which to base the diagnosis. Therefore, much past interest has been concerned the development of serologic technique that would aid in diagnosing babesiosis.

In this review an attempt has been made to summarize the recent advances on serodiagnosis of babesiosis with special attention to the serologic procedures used in "Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias" at Bogotá, Colombia for detection of babesial antibodies in the infected cattle. In the last two decades some fundamental knowledge concerning the immuno serology of several *Babesia spp.* has led to the development of serodiagnostic procedures for detection of *Babesia* antibodies. The antigen used in these techniques originated from parasitized erythrocytes and serum or plasma of animals with acute babesiosis, and they were applied in several serologic tests. The complement fixation reaction constituted one of the earliest test for the diagnosis of babesiosis. In recent years considerable progress has been made in an improved complement fixation test for the diagnosis of babesiosis. In addition, the gel precipitation, fluorescent antibody, and agglutination techniques have been applied for detection of specific

Babesia antibodies utilizing antigens from the parasitized erythrocytes as well as acute serum.

The investigations described in this report were conducted to evaluate the existing technique for diagnosing bovine babesiosis and to develop the new ones. Research was carried out with the cooperation of the Instituto Colombiano Agropecuario at Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias in Bogotá, Colombia. Antigens of *Babesia spp.* were isolated by means of two techniques and they were used in complement fixation test for detection of *Babesia* antibodies in cattle experimentally and naturally infected. By means of complement fixation test it was possible to detect specific antibodies in serum of cattle 8 days after blood-borne infection. A total of 5.420 serum samples of cattle infected with babesiosis were tested. These animals were located in several experimental herds located in Valle del Cauca, Río Magdalena, Llanos and Montería, with known histories of babesiosis and from animals artificially infected at the Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias in Bogotá. Approximately 95 per cent of these samples were positive whereas, about 5 per cent gave discordant reactions. In addition, to the complement fixation test used in our laboratory, attempts have been made to apply gel-double diffusion technique for characterization of *Babesia spp.* antigen-antibody reactions. A cross reaction was noted in this system between *Babesia bigemina and Babesia argentina.* The application of latex-agglutination and hemagglutination tests for detection of the *Babesia* antibodies are still under investigation in our laboratory. As a result of these investigations and observations, it is apparent that more work is needed for development of the practical serologic technique for diagnosis of babesiosis and to help solve this complex biological disease problem in tropic and subtropic areas of the world.

7. BIBLIOGRAFIA

1. CURNOW, J.A. and B.A. CURNOW. 1967. An indirect haemagglutination test for the diagnosis of *Babesia argentina* infection in cattle. Austral. Vet. J. 43:286-290.

2. CURNOW, J.A. 1968. *In vitro* agglutination of bovine erythrocytes infected with *Babesia argentina.* Nature 267-268.

3. FERRIS, D. H.; R. TODOROVIC and M. RISTIC. 1968. Significance and application of babesial and plasmodial ectoantigens to comparative medicine. J.A.V.M.A. 153:1888-1896.

4. FRERICHS, W.; A. A. HOLBROOK and A. J. JOHNSON. 1969a. Equine piroplasmosis; complement fixation titers of horses infected with *Babesia caballi.* Am. J. Vet. Res. 30:697-702.

5. FRERICHS, W.; A.A. HOLBROOK and A. J. JOHNSON. 1969b. Equine piroplasmosis; production of antigens for the complement fixation test. Am. J. Vet. Res. 30:1337-1341.

6. HIDALGO, R.J. and G. T. DIMOPOULLOS. 1967. Complement fixation microprocedures for anaplasmosis. Am. J. Vet. Res. 28:245-251.

7. HIRATO, K.; M. NINOMIYA; Y. NWANO and T. KUTII. 1945. Studies of the complement fixation reaction for equine piroplasmosis. Jap. Vet. Sci. 7:197-205.

8. MADDEN, P. A. and A.A. HOLBROOK. 1968. Equine piroplasmosis: indirect fluorescent antibody test for *Babesia caballi*. Am. J. Vet. Res. 29:117-123.

9. MAHONEY, D. F. 1962. Bovine babesiosis: diagnosis of infection by a complement fixation test. Aust. Vet. J. 38:48-52.

10. MAHONEY, D.F. 1964. Bovine babesiosis: an assessment of the significance of complement fixing antibodies based upon experimental infection. Aust. Vet. J. 40:369-375.

11. MAHONEY, D.F. 1966. Circulating antigens in cattle infected with *Babesia bigemina* or *Babesia argentina*. Nature 24:422.

12. MAHONEY, D.F. 1967a. Bovine babesiosis: preparation and assessment of complement fixing antigen. Exptl. Parasitol. 20:232-241.

13. MAHONEY, D.F. 1967b. Bovine babesiosis: the passive immunization of calves against *Babesia argentina* with special reference to the role of complement fixing antibodies. Exptl. Parasitol. 20:119-124.

14. MAHONEY, D.F. 1967c. Bovine babesiosis: the immunization of cattle with killed *Babesia argentina*. Exptl. Parasitol. 20:125-129.

15. MAHONEY, D.F. and B. V. GOODER. 1969. *Babesia argentina:* serum changes in infected calves. Exptl. Parasitol. 24.375-382.

16. RISTIC, M.; J. OPPERMANN; S. SIBINOVIC and T. N. PHILLIPS. 1964. Equine piroplasmosis: a mixed strain of *Piroplasma caballi* and *Piroplasma equi* isolated in Florida and studied by the fluorescent antibody technique. Am. J. Vet. Res. 25:15-23.

17. RISTIC, M. and S. SIBINOVIC. 1964. Equine babesiosis: diagnosis by a precipitin in gel and a one-step fluorescent antibody inhibition test. Am. J. Vet. Res. 25:1514-1526.

18. ROSS, J.P. J. and F. K. LOHR. 1968. Serologic diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. Res. Vet. Sci. 9:557-562.

19. SCHINDLER, R. and H. H. DENNING. 1962. Demonstration of *Babesia* antibodies by the complement fixation reaction. Z. Tropenmed. Parasitolog. 13:480-488.

20. SCHINDLER, R.; R. WORATCH and G. SCHROEDER. 1966. Immunity and serologic reaction against *Babesia canis* in dogs after infection with living parasites and after immunization with a soluble antigen. Z. Tropenmed. Parasitolog. 17:226-240.

21. SIBINOVIC, K. H.; M. RISTIC; S. SIBINOVIC and T. N. PHILLIPS. 1965. Equine babesiosis: isolation and serologic characterization of blood serum antigens from acutely infected horses. Am. J. Vet. Res. 110:147-153.

22. SIBINOVIC, S.; K. H. SIBINOVIC and M. RISTIC. 1969. Equine babesiosis: diagnosis by bentonite agglutination and passive hemagglutination tests. Am. J. Vet. Res. 30:691-695.

23. TODOROVIC, R.; D. H. FERRIS and M. RISTIC. 1967. Roles of the spleen in acute plasmodial and babesial infections in rats. Exptl. Parasitol. 21:354-372.

24. TODOROVIC, R.; M. RISTIC and D. H. FERRIS. 1968a. Soluble antigens of *Plasmodium gallinaceum*. Trans. Roy. Soc. Med. and Hyg. 62:51-57.

25. TODOROVIC, R.; R. FERRIS and M. RISTIC. 1968b. Antigens of *Plasmodium gallinaceum*. II. Immunoserologic characterization of explasmodial antigens. Am. J. Trop. Med. and Hyg. 17:695-701.

26. TODOROVIC, R.; M. RISTIC and D. H. FERRIS. 1968c. A tube latex agglutination test for diagnosis of malaria. Trans. Roy, Soc. Trop. Med. and Hyg. 62:58-68.

27. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 1958. A manual for conducting the complement fixation test for anaplasmosis. Laboratory services, Animal Disease Eradication Division in Cooperation with Animal Disease and Parasite Research Division, Agricultural Research Service, Washington, D.C.

28. ZUCKERMAN, AVIVAL and M. RISTIC. 1968. Blood parasite antigens and antibodies. In "Infectious Blood Diseases of Man and Animals" ed. Weinman and Ristic, Academic Press, N. Y. -London. pp.79-122.