

*Babesia gibsoni*의 적혈구내 배양법과 진단법 개발에 관한 연구

2. *Babesia gibsoni*의 적혈구내 배양

서명득·주보현

경상대학교 수의과대학
(1998년 2월 23일 접수)

Intraerythrocytic culture and development of serological diagnostic tests of *Babesia gibsoni*

2. Intraerythrocytic culture of *Babesia gibsoni* by microaerophilous stationary phase(MASP)

Myung-deuk Suh, Bo-hyun Joo

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

(Received Feb 23, 1998)

Abstract : This study was conducted to isolate the protozoan parasite *Babesia gibsoni* by intraerythrocytic culture method of microaerophilous stationary phase(MASP) and evaluate the possibility of application for the detection of *B gibsoni* in canine babesiosis. Also, indirect fluorescent antibody test(IFAT) and thick blood smear(giemsa stain), direct light microscopy (DLM), as control diagnostic tests, were conducted to compare diagnostic effects between MASP, IFAT and DLM. The results obtained from this study were summarized as follows.

The protozoan parasite *B gibsoni* multiplied in 24-well polystyrene plate containing 1.2ml of canine red blood cell suspension in RPMI 1640 medium(pH 7.0) which is contained 20~40% normal canine serum(NCS) under the MASP condition of 5% CO₂ and 95% air at 37°C incubator. Under the above MASP culturing system the percentage of parasitized erythrocytes (PPE) after incubation for 9 days reached the peak. The levels of PPE in MASP culture were shown more higher by exchanging the medium at 24 hour intervals. The parasite were purely isolated from MASP culture of canine red blood cells collected from dogs(pit bullterrier) infected with *B gibsoni* naturally.

Among the total of 83 heads of pit bullterrier blood samples the positive rate was 32 heads(38.5%) in DLM, 45 heads(54.2%) in IFAT and 42 heads(50.6) in MASP culture. In negative cases of IFAT and DLM the isolation rates of *B gibsoni* by MASP culture were 16 heads(42.1%) of 38

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr. Myung-deuk Suh, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Republic of Korea.

heads and 16 heads(28.6%)% of 56 heads, respectively.

From this study it was suggested that MASP culture method by RPMI 1640 medium was a reliable and useful diagnostic test for the diagnosis of *B gibsoni* infections in canine babesiosis.

Key words : *Babesia gibsoni* , IFA, intraerythrocytic culture, microaerophilous stationary phase, RPMI 1640 medium, protozoan parasite.

서 론

개 바베시아병은 진드기가 매개하는 원충성 질병으로서 *B canis* 와 *B gibsoni* 가 이 병의 주요한 원인체로 알려져 있고, 전자는 형태학적으로 대형종 그리고 후자는 소형종으로 분류된다¹⁻¹³. Patton⁷은 수렵견에서 *B gibsoni* 를 최초로 분리보고하였으며, 이 원충의 감염으로 발열, 빈혈, 황달 그리고 혈색소뇨 등의 임상증상을 나타내며 심급성인 경우에는 폐사를 일으킨다^{1,2,4,5,7,8,10,11}.

우리나라에서는 손¹⁴⁻¹⁶이 경주지역의 수렵견(retriever, pointer)에서 최초로 *B gibsoni* 의 감염을 보고하였으며 서 등¹⁷, 이 등¹⁸, 신 등¹⁹, 윤 등²⁰ 및 이와 서²¹가 국내에서 개 바베시아병의 발생예를 보고하였다.

바베시아병의 혈청학적 진단법으로는 보체결합반응(complement fixation test, CF)²²⁻²⁴, 간접적혈구응집반응(indirect hemagglutination test, IHA)^{11,25}, 간접형광항체법(indirect fluorescent antibody test, IFAT)^{12,26-30} 및 효소표지 면역검사법(enzymelinked immunosorbent assay, ELISA)³⁰⁻³³ 등이 이용되고 있으며, 직접검사법으로는 giemsa 염색 혈액도말검사법(direct light microscopy, DLM)^{1-11,30}과 동물접종검사법^{21,30,34}이 이용되고 있다.

그러나 이들 방법중 DLM은 초기 급성 감염기를 제외하고는 진단이 어렵다는 단점이 있고 그리고 동물접종법은 고유숙주인 개에서는 비장적출술을 수행해야 하는 시간과 비용이 다소 소요된다는 단점이 있으며, IFAT는 혈청학적 진단법으로는 효율적인 방법이지만 원충의 감염여부를 가리는데는 약간의 어려움이 있다. 이와 같은 단점을 보완하기 위하여 최근에 와서는 원충의 시험관내 배양법 개발이 이루어지고 있다^{21,35-39}.

Levy *et al*³⁹은 *B bovis* 의 배양에 microaerophilous sta-

tionary phase(MASP) 배양법을 고안하여 이 원충의 배양에 이용한 바 DLM법 보다 원충의 검출율과 증식성이 크게 향상되었다고 보고하였으며 그후 여러학자들은 *B canis*⁴⁰, *B divergens*⁴¹, *B bigemina*²⁵ 및 *B caballi* 등³⁶을 시험관내 배양법으로 원충의 분리와 증식에 관한 연구를 수행하였다.

그러나 *B gibsoni* 의 시험관내 배양법에 관한 연구는 그리 많지 않는 편이며, Murase *et al*⁴²은 *B gibsoni* 를 시험관내에서 배양하여 이 원충의 증식성과 형태학적 변화에 대하여 보고한 바 있으며, Onishi *et al*³⁵은 시험관내 배양의 최적조건과 배양유래 원충의 병원성 변화에 대하여 보고하였다. Holman *et al*³⁶은 시험관내 배양법으로 *B caballi* 에 감염된 말의 혈액재료로부터 잠복감염을 확인하는데 이 방법을 이용한 바 있고, James *et al*⁴⁰은 시험관내 배양법을 이용하여 *B canis* 배양유래 항원의 특성과 면역원성을 규명하기 위한 순수 항원제조에 이 방법을 이용하였다.

우리나라에서는 시험관내 배양법에 대한 연구가 거의 이루어지지 않고 있다가 이와 서²¹는 국내에서 처음으로 시험관내 적혈구배양법을 이용하여 감염 혈액재료로부터 원충의 분리를 시도하였던 바 사용된 수종의 배양액중 RPMI 1640 배양액에서 원충의 증식이 가장 좋았으며 분리율도 가장 높았다고 보고하였다.

따라서 저자들은 위에서 언급한 여러가지 진단법중 MASP법을 국내의 투견에서 흔히 발생하는 *B gibsoni* 감염증의 조기진단법에 이용할 목적으로 연구를 수행하고 그 결과를 여기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

원충주 : 경상대학교 수의과대학 기생충학교실에서

pit bullterrier로부터 분리하여 보존·계대하고 있는 *B gibsoni* 주를 시험에 사용하였다.

실험동물 : DLM과 IFAT에서 바베시아 감염음성으로 판정된 6~8개월된 10~15kg의 건강한 개로서 전염병 백신접종과 구충제로 구충시킨 후 pellet 사료를 자유급식 시키고 cage 내에 사육하면서 실험에 사용하였다.

개의 인공감염 : 개에 대한 인공감염은 비장적출후 2주째에 *B gibsoni* 감염 적혈구 $2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 개를 피하 또는 정맥내에 접종하였다.

가검혈액 및 혈청채취 : 야의사육건인 투견으로부터의 채혈은 항응고제 ACD-B 용액(anticoagulant citrate dextrose solution, usp formular-B, 녹십자 의약품업(주))이 들어있는 채혈용기를 사용하여 cephalic vein으로부터 혈액 배양용과 혈청분리용으로 구분하여 채취하여 사용하였다.

양성 및 음성혈청 : IFAT에서 음성 또는 양성으로 판정된 혈청을 표준혈청으로 사용하였다.

실험혈청의 처리 : 실험에 사용되는 모든 혈청은 56℃에서 30분간 비동화한 후 사용하였다.

DLM법 : 투견으로부터 채취된 혈액을 slide glass에 박충도말후 giemsa 염색하여 1000배의 배율로 광학현미경(carl zeiss)하에서 *B gibsoni*의 감염여부를 관찰하였다.

IFAT의 수행 : 이와 서²¹ 및 서와 신³⁰의 방법에 따라 수행하였다.

***B gibsoni*의 동정** : Farwelle *et al*²과 Minori *et al*⁴³의 형태학적 동정법에 의거하여 동정하였다.

Microaerophilous stationary phase(MASP) 배양 : MASP 배양에는 gibco사 제품인 RPMI 1640을 사용하여 첨가제로 penicillin G 100IU/ml, streptomycin 100µg/ml 및 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid(HEPES, gibco)가 25mM 함유되도록 한 것을 A배지 그리고 여기에 원충의 증식을 증진시킬 목적으로 바베시아 항체음성의 개혈청(normal canine serum, NCS)이 20~40% 함유되도록 한 것을 B배지로 하였다.

배양은 이와 서²¹ 및 Levy와 Ristic³⁹의 방법에 준하여 투견(pit bullterrier) 정맥으로부터 앞의 채혈방법에 따라 채취한 혈액을 A배지로 450g에서 3회 세척하여 백혈구를 제거하였으며 마지막 세척한 후 상층액을 버리고 침전된 적혈구는 B배지로 적혈구 용적비(PCV)가 10% 되도록 부유시키고 24well의 조직배양용 plate(nunc)에 분주하여 배양하였다. 배양조건은 각 well에 1.2ml씩의 감염

적혈구 부유액을 분주하고 가스조건을 고려하여 plate내 내양액의 높이는 6.2mm가 되도록 높이를 조절하여 5%의 CO₂와 95% 공기를 공급하면서 37℃ incubator에서 배양하였으며, 배양액은 24시간마다 교환하였다.

배지에서의 원충감염율(percentage of parasitized erythrocytes, PPE) 조사 : 정상적인 개의 적혈구가 2.5% 함유되게 조성한 B배지를 사용하여 배양하면서 매 24시간마다 배양혈구를 무균적으로 채취한 후 혈액도말 표본을 만들어 giemsa 염색하여 광학현미경으로 적혈구 1,000개당 원충감염수를 계산하여 PPE를 산출하였다.

진단방법별 *B gibsoni* 감염조사 : 조사대상 투견 83두에서 채취한 혈액 및 혈청재료로부터 MASP법에 의한 원충분리율을 DLM법과 IFAT에 의한 감염율과 비교조사하였다.

결 과

***B gibsoni*의 개 적혈구내 배양과 증식성** : MASP법에 의한 RPMI 1640 배지에 원충을 접종한 후 매 24시간 간격으로 원충의 적혈구내 배양과 증식성을 조사한 성적은 Fig 1에서 보는 바와 같이 배양 2일째부터 PPE(%)가 증가하는 경향을 보이기 시작하여 8일째에는 12.1% 그리고 9일째에는 13.0%로 최고에 이르렀으며 10일째부터는 감소하기 시작하여 15일째에는 8.5% 수준을 유지하였다.

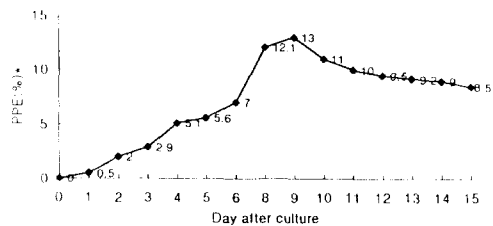


Fig 1. Percent of parasitized erythrocytes of *B gibsoni* in canine red blood cell cultured with RPMI 1640 medium.

* : Percentage of parasitized erythrocyte.

검사방법별 *B gibsoni*의 항체검출 및 원충검출율 : 83두에서 채취한 혈액과 혈액으로부터 MASP, DLM 및 IFAT에 의한 *B gibsoni*의 항체 및 원충검출 여부를 조사한 성적은 Table 1에서와 같이 MASP법에서는 83두중 42두(50.6%)에서 원충을 분리할 수 있었고, DLM에서는

Table 1. Detection of *B gibsoni* by various diagnostic tests

	MASP			IFAT			DLM		
	+	-	Total	+	-	Total	+	-	Total
Number of head	42	41	83	45	38	83	32	56	88
%	50.6	49.4	100	54.2	45.8	100	38.5	61.5	100
Isolation by MASP	42	0	42	26	16	42	26	16	42
%	50.6	0	50.6	58.0	42.1	50.6	81.3	28.6	50.6

32두(38.5%)에서 원충의 감염이 확인되었으며, IFAT에서는 45두(54.2%)가 항체 양성이었다. 그리고 DLM에서는 양성인 32두중 26두(81.3%) 그리고 음성인 56두중 16두(28.6%)에서 MASP법으로 원충이 분리되어 전체 83두중 42두(50.6%)가 MASP 양성이었다, IFAT에서는 양성인 45두중 26두(58.0%) 그리고 음성인 38두 중에서 16두(42.1%)에서 MASP법으로 원충이 분리되었다.

IFA 역가별 MASP법에 의한 *B gibsoni*의 분리빈도 : 총83두에 대한 IFA 역가별 MASP법에 의한 원충의 분리 빈도를 조사한 성적은 Fig 2에서와 같이 1:32 이하의 음성으로 판정된 38두 중에서는 16두(42.1%)에서, 1:64의 6두중 1두(16.1%), 1:128의 1두중 1두(100%), 1:256의 4두중 1두(25.0%), 1:512의 7두중 1두(14.3%), 1:1,024의 16두중 13두(81.3%) 그리고 1:2,048의 11두중 9두(81.8%)에서 MASP 배양법으로 원충이 분리되었다.

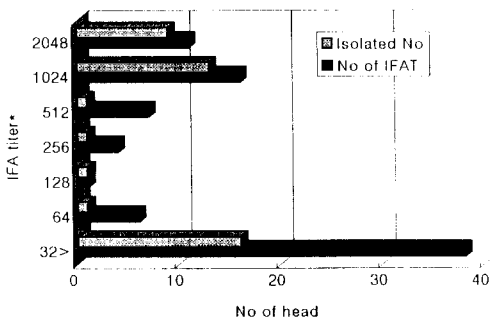


Fig 2. MASP isolation rate of *B gibsoni* by IFA titers.

*IFA titer indicated that titer 32 ≥ was negative, titer ≥ 64 was positive.

고 찰

바베시아 원충의 시험관내 배양법은 Levy와 Ristic³⁹이

B bovis 감염혈액을 microaerophilous stationary phase(MASP)법으로 배양한 것이 보고된 후 여러학자들^{35,42,43}에 의하여 바베시아 원충의 시험관내 배양법에 관한 연구가 이루어져 이 원충의 시험관내 배양분리(*in vitro*)와 항원생산에 널리 이용할 수 있게 되었다. 이와 서²¹는 국내에서는 처음으로 Levy와 Ristic³⁹의 방법을 이용하여 RPMI 1640, M199-HBSS, MEM-EBSS 그리고 α -MEM 등의 medium을 사용하여 *B gibsoni*의 시험관내 배양분리를 시도하였던 바 RPMI 1640 배지에서는 배양 8일째에 PPE가 14.2%에 도달하여 가장 높은 증식성을 나타내었다고 보고하였고, Onishi *et al*³⁵은 배양 7일째에 PPE가 최고 9.5%에 도달하였다고 보고하였다.

저자들은 이와 서²¹가 여러가지 배지중 원충의 증식성이 가장 좋았다고 보고한 RPMI 1640 배지만을 선정하여 *B gibsoni* 원충의 배양과 증식성을 조사하였던 바 배양 2일째부터 원충이 증식되기 시작하여 8일째와 9일째에 PPE가 각각 12.1%와 13.0%를 나타내어 최고에 도달하였으며, 15일째까지 8.5%의 수준을 유지하였다. 이와같은 결과로 보아 이 원충의 최고증식기는 배양후 7-9일 사이로 생각되며 Levy와 Ristic³⁹ 및 Onishi *et al*³⁵의 성적과 비슷한 결과라고 생각된다.

Murase *et al*⁴²은 α -MEM에서 MASP법으로 *B gibsoni*의 연속배양에서 배양후 8일과 9일째 PPE가 최고 4%를 나타내었으나 이와 서²¹는 배양 8일째에 11.4%의 PPE를 나타내었다고 보고함으로써 동일한 배지라도 보고자에 따라서 상당한 차이가 있는 것으로 보여진다.

Thomford *et al*⁴⁴은 사막에서 서식하는 bighorn sheep와 mule deer에서 MASP 배양법으로 *Babesia spp*를 분리하였고, Rodriguez *et al*⁴⁵은 *B bovis*를 그리고 Holman *et al*³⁶은 *B caballi*를 MASP 배양법으로 쉽게 분리할 수 있다고 보고하였다. 저자들의 성적과 다른 연구자들의 성

적을 종합해보면 RPMI 1640 medium은 *B gibsoni*를 MASP법으로 시험관내에서 분리하는데 효과적인 배지로 생각된다.

Holman *et al*³⁶은 실험적으로 *B caballi*에 감염된 말의 보충상태를 조사하는데 혈청학적 검사법으로 CF test와 IFAT를 그리고 MASP법에 의한 원충의 시험관내 배양 분리법을 비교한 바, 조사대상 10두중 CF에서는 3두, IFAT에서는 7두가 양성이었으나 MASP법에서는 4두가 양성으로 판정되어 이 방법으로 *B caballi*를 진단하는데 효과적이라고 하였으며, 이와 서²¹는 투견(pit bullterrier) 36두에서 채취한 혈액과 혈청에서 DLM, IFAT 및 MASP법에 의한 각 진단방법별 항체 및 원충검출율을 조사한 성적에서 DLM에서는 12두(33.3%), IFAT에서는 20두(59.6%) 그리고 MASP법에서는 17두(47.2%)가 양성을 보임으로써 MASP법은 IFAT 보다는 낮은 검출율을 보였으나 DLM 보다는 훨씬 높은 검출율을 보였다고 보고하였다.

저자들은 투견(pit bullterrier) 83두에 대해 DLM, IFAT 및 MASP 배양법에 의한 *B gibsoni* 원충의 항체 및 원충 검출율 조사에서 DLM 양성은 32두(38.5%), IFAT에서는 45두(54.2%) 그리고 MASP법에서는 42두(50.6%)가 양성을 보임으로써 MASP법은 IFAT 보다는 약간 낮았고 DLM 보다는 훨씬 높은 검출율을 나타내었는데 이와같은 결과는 이와 서²¹가 보고한 성적과 일치하는 것으로 생각된다.

한편 이와 서²¹는 MASP법으로 IFAT 양성예에서 75% 그리고 DLM 양성예에서는 92%의 원충을 분리할 수 있었다고 보고하였는데 저자들의 성적에서는 DLM 양성예 32두에서는 26두(81.3%) 그리고 IFAT 양성예 45두에서는 26두(58.0%)에서 MASP법으로 원충을 분리할 수 있었다.

이와같은 성적의 차이는 실험방법상의 기술적인 문제이거나 혈액채취시의 각 숙주개체별 원충 감염상태 차이에서 온 결과라고 생각된다. 그리고 저자들은 DLM 음성으로 판정된 56두중에서 16두(28.6%) 그리고 IFAT의 음성예 38두중 16두(42.1%)에서 MASP법으로 원충을 분리할 수 있었는데 이러한 결과는 이와 서²¹가 RPMI 1640을 이용한 MASP 배양법은 숙주의 혈액으로부터 *B gibsoni*를 분리할 수 있는 매우 효과적인 진단법이라고 평가한 것과 일치한다고 생각된다.

저자들은 혈청학적 진단법인 IFA 역가와 MASP법에

의한 원충분리율과의 관계를 비교한 바, IFAT 음성예(1:32) 38두중 16두(42.1%), 1:64에서는 6두중 1두(16.1%), 1:128의 1두중 1두(100%), 1:256의 4두중 1두(25.0%), 1:512의 7두중 1두(14.2%), 1:1,024의 16두중 13두(81.3%) 그리고 1:2,048의 11두중 9두(81.8%)가 MASP법에서 양성을 나타내었는데 이와같은 결과는 IFAT에서 1:1,024~1:2,048의 비교적 높은 항체가 가진 개체에서 원충의 분리율이 높은 것으로 생각되며, 이와 서²¹가 IFA 역가 1:512의 4두중 3두(75.0%), 1:1,024의 8두중 7두(87.5%) 그리고 1:2,048의 7두중 4두(57.1%)에서 MASP 양성이었다고 보고한 성적과 비슷한 것으로 생각된다.

그러나 저자들의 성적에서는 IFAT 음성예(1:32) 38두중 16두(42.1%)가 MASP 양성이었다고, 이와 서²¹는 IFAT 음성예 16두중 2두(12.5%)가 MASP 양성이라고 판정한 것과 비교할 때 IFA 항체가 높을 수록 MASP법에 의한 원충분리율이 높다고 할 수 있을지는 더 검토되어야 할 것으로 생각된다.

결론

B gibsoni 감염에 의한 개 바베시아병의 원인체 분리 배양법으로 MASP(microaerophilous stationary phase)법의 이용가능성을 검토하고 IFAT와 DLM법과의 진단방법별 항체 및 원충검출율을 조사하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RPMI 1640 배지를 이용한 MASP 배양법은 *B gibsoni* 감염혈액으로부터 원충분리율을 높일 수 있는 진단법으로 판단되었다.

2. 정상 개혈청을 20~40% 첨가한 RPMI 1640 배지에서의 원충의 증식율(PPE)은 배양후 2일째부터 증식하기 시작하여 9일째에 peak(13.0%)를 나타내었다.

3. 투견(pit bullterrier) 83두에 대한 진단방법별 항체 및 원충검출율은 IFAT 45두(54.2%), MASP 42두(50.6%) 그리고 DLM 32두(38.5%) 순이었다.

4. DLM과 IFAT에서 음성으로 판정된 예의 MASP법에 의한 원충분리율은 DLM 음성 56두중 16두(28.6%) 그리고 IFAT 음성 38두중 16두(42.1%)이었다.

5. IFA 항체 역가별 MASP법에 의한 원충분리율은 1:512 이하의 낮은 역가에서 보다 1:1,024와 1:2,048의 높은 역가에서 높았다.

참 고 문 헌

1. Conrad P, Thomford J, Yamane I, et al. Hemolytic anemia caused by *Babesia gibsoni* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 199:601-605, 1991.
2. Farwell GE, Grand I, Cobb CC. Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 180:507-511, 1982.
3. Groves MG, Dennis GL. *Babesia gibsoni*: Field and laboratory studies of canine infections. *Exp Parasitol*, 31:152-159, 1972.
4. Irwin PJ, Hutchinson GW. Clinical and pathological findings of babesia infection in dogs. *Aust Vet J*, 68: 204-209, 1991.
5. Klinefelter MR. Cause, diagnosis and treatment of canine piroplasmiasis. *Veterinary Medicine Small Animal Clinician*, 1505-1508, 1982.
6. Shirlaw JF, MRCVS. On the relationship between 'Lahore canine fever' and 'tick fever' of dogs due to *Piroplasma gibsoni* infection, with observation on their pathology and haemocytology. *Indian Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 8:293-316, 1938.
7. Patton WS, Symons TH. Report on an outbreak of canine piroplasmiasis due to *Piroplasma gibsoni* (Patton) among the hounds of madras hunt, together with some observations on the treatment of the disease with salvarsan. *Ann Trop Med Parasit*, 6:361-370, 1912.
8. Yamane I, Conrad PA, Gardner I. *Babesia gibsoni* infections in dogs. *J Protozool Res*, 3:111-125, 1993.
9. Boulos AM, Ronald WM, Ibrahim SB. Some observations on experimentally induced infection of dogs with *Babesia gibsoni*. *Am J Vet Res*, 36:293-296, 1975.
10. Sanders RE. Observations on canine babesiosis(piroplasmiasis). *J Am Vet Med Assoc*, 43:27-28, 1937.
11. Purnell RE. Babesiosis in various hosts. *Academic press*, In Babesiosis(Ristic M, Kreier JP), 45-50, 1981.
12. Chang GN, Tu CH. A serological survey of canine babesiosis in Taiwan. *J Chin Soc Vet Sci*, 18:125-131, 1992.
13. Yanamine H, Ichiki H, Hamakawa M, et al. Studies on canine babesiosis in Okinawa island. *Jpn J Vet Sci*, 46:511-518, 1984.
14. 손제영. 한국에서 발생한 canine babesiosis에 관한 연구. 제1보 경주지방에서의 canine babesiosis 발생. 경북대학교 논문집, 6:169-175, 1962.
15. 손제영. 한국에서 발생한 canine babesiosis에 관한 연구. 제2보 실험적 임상견에 대한 임상관찰. 경북대학교 논문집, 7:185-197, 1963.
16. 손제영. 한국에서 발생한 canine babesiosis에 관한 연구. 제3보 자연발생환경의 임상관찰 및 환경발생지역 사육견에 대한 조사. 대한수의학회지 4:7-14, 1964.
17. 서동일. 개의 바베시아병 1예. 대한수의학회지, 13: 167-168, 1977.
18. 이학호, 김태종, 이원창. *Babesia gibsoni*가 감염된 개에 관한 연구. 대한수의학회지, 20:161-168, 1984.
19. 신상태, 최희인, 성재기 등. 사냥개에서의 *Babesia gibsoni* 감염. 한국임상수의학회지, 4:61-69, 1987.
20. 윤창모, 이주목, 최춘식 등. *Babesia gibsoni* 항원접종과 *Theileria sergenti*를 비특이적으로 접종한 개의 면역효과에 관한 연구. 대한수의학회지, 33:101-108, 1993.
21. 이호권, 서명득. 개 바베시아병에 관한 연구. 1. *Babesia gibsoni*의 시험관내 분리와 항원성상에 관한 연구. 대한수의학회지, 36:681-692, 1996.
22. Schindler R, Denning KH. Demonstration of babesia antibodies by complement fixation reaction. *Z Tropnm-ed Parasito* 13:480-488, 1962.
23. Sibnovic KH, Ristic M, Sibnovic S, et al. Equine babesiosis: Isolation and serological characterization of a blood serum antigen from acutely infected horses. *Am J Vet Res*, 26:147-153, 1965.
24. Ferris DH, Todorovic R, Ristic M. Signification and application of babesial and plasmodial ectoantigens to comparative medicine. *J Am Vet Med Assoc*, 153: 1888-1896, 1968.
25. Figueroa JV, Buening GM, Kinden DA. Purification of the erythrocytic stages of *Babesia bigemina* from

- cultures. *Parasitol Res*, 76:675-680, 1990.
26. Yamane I, Thomford JW, Gardner IA, *et al.* Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Am J Vet Res*, 54:1579-1584, 1993.
 27. Anderson JF, Magnarelli LA, Sulzer AJ. Canine babesiosis: Indirect fluorescent antibody test for a north american isolate of *Babesia gibsoni*. *Am J Vet Res*, 41:2102-2105, 1980.
 28. Ristic M, Lykins JD, Smith AR. *Babesia canis* and *Babesia gibsoni*: soluble and corpuscular antigens isolated from blood of dogs. *Exp Parasitol*, 30:385-392, 1971.
 29. Breitschwerdt EB, Malone JB, Macwilliams P, *et al.* Babesiosis in the greyhound. *J Am Vet Med Assoc*, 153:689-694, 1968.
 30. 서명득, 신용승. *Babesia gibsoni* 의 적혈구내 배양법과 진단법 개발에 관한 연구. I. *Babesia gibsoni* 진단을 위한 간접형광항체법(IFAT)과 효소표지면역검사법(ELISA). 대한수의학회지, 37:583-593, 1997.
 31. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans Roy Soc Tro Med Hyg*, 70:98-106, 1976.
 32. Voller A. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull World Health Organ*, 54:129-139, 1976.
 33. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. A microplate enzyme immunoassay for toxoplasma antibody. *J Clin Pathol*, 29:150-153, 1976.
 34. Dorner JL. Clinical and pathological features of canine babesiosis. *J Am Vet Med Assoc*, 154:648-652, 1969.
 35. Onishi T, Morita M, Anda T. *In vitro* cultivation and infectivity of *Babesia gibsoni*. *Jpn J Parasitol*, 42:340-344, 1993.
 36. Holman PJ, Wayne MF, Lucious C, *et al.* Culture confirmation of carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *J Clin Microbiol*, 31:698-701, 1993.
 37. Holman PJ, Warldrup KA, Wagner GG. *In vitro* cultivation of babesia isolated from a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Parasitol*, 74:111-115, 1988.
 38. Erp EE, Gravely SM, Smith RD, *et al.* Growth of *Babesia bovis* in bovine erythrocyte cultures. *Am J Trop Med Hyg*, 27:1061-1064, 1978.
 39. Levy MG, Ristic M. *Babesia bovis*. Continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. *Science*, 207:1218-1220, 1980.
 40. James MA, Kakoma I, Holland C, *et al.* Antigenic and immunogenic studies on cell culture-derived *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 10:29-40, 1982.
 41. Valentin A, Precigout E, L'Hostis M, *et al.* Cellular and humoral immune responses induced in cattle by vaccination with *Babesia divergens* culture-derived exoantigens correlate with protectin. *Infection and Immunity*, 61:734-741, 1993.
 42. Murase T, Hashimoto T, Ueda T, *et al.* Multiplication of *Babesia gibsoni* in *in vitro* culture and its hemolysis of infected erythrocytes. *Jpn J Vet Sci*, 53:759-760, 1991.
 43. Mimori T, Kono I, Sakamoto T, *et al.* Morphological studies of multiplication of *Babesia gibsoni* in canine erythrocytes. *Jpn J Vet Sci*, 44:699-701, 1982.
 44. Thomford JW, Conard PA, Boyce WM, *et al.* Isolation and *in vitro* cultivation of babesia parasites from free-ranging desert bighorn sheep(*Ovis canadensis Nelsoni*) and mule deer(*Odocoileus hemionus*) in California. *J Parasitol*, 79:77-84, 1993.
 45. Rodriguez SD, Buening GM, Green TJ, *et al.* Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Infection and Immunity*, 42:15-18, 1983.