



Figura 4: Reação de imunofluorescência indireta dos anticorpos monoclonais frente ao antígeno de *Babesia bovis* (amostra brasileira). (400x).

4.4.3 Caracterização através do teste de ELISA

Através do teste de ELISA, avaliou-se a reatividade dos anticorpos monoclonais presentes nos sobrenadantes de culturas concentrados por diálise em sacarose.

Resultados precedentes desse teste mostraram que a concentração do antígeno que mantinha a maior discriminação entre positivos e negativos foi de 5,75 µg do antígeno por orifício da placa de ELISA, utilizando-se o conjugado na diluição 1:2000.

Após a análise dos soros dos 50 camundongos, obteve-se a absorvância média dos soros negativos 0,018 e o desvio padrão de 0,0021, sendo, portanto, o valor discriminante (cut-off) de 0,022, ou seja, a média dos soros negativos acrescida de dois desvios padrões.

Baseado no valor discriminante acima descrito, todos os clones produtores de anticorpos monoclonais apresentaram-se positivos em ELISA, tendo a absorvância variado de 0,365 a 0,502. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-*Babesia bovis* em ELISA.

Clones	Absorvância (492 nm)
C2	0,423
C4	0,409
C5	0,435
C7	0,502
C9	0,407
C12	0,410
C13	0,446
C15	0,449
C17	0,377
C20	0,486
C22	0,425
C23	0,425
C24	0,425
C25	0,365
C28	0,382
C29	0,368
C34	0,368
C36	0,369

Cut-off = 0,022

4.4.4 Caracterização através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético do antígeno de *B. bovis*, amostra brasileira em SDS-PAGE está apresentado na Figura 5. Através dessa técnica, podem-se observar inúmeras bandas, sendo a variação dos pesos moleculares entre 173 a 29 kDa.

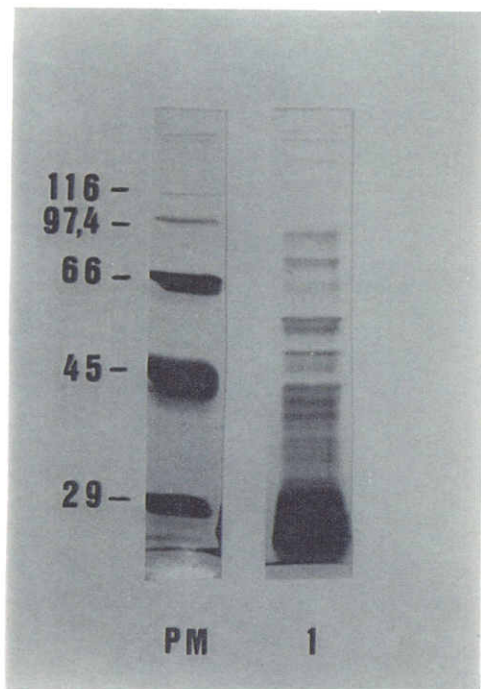


Figura 5 Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do antígeno de *Babesia bovis* corado pela prata. Marcadores de peso molecular (PM) em kDa à esquerda.

4.4.5 Caracterização através de Western blotting

As bandas protéicas reconhecidas pelos anticorpos monoclonais apresentavam pesos moleculares entre 163 a 19 kDa, sendo que a maioria dos anticorpos monoclonais reconheceu mais de uma banda nessa faixa de peso molecular (Tab. 4).

Tabela 4 Pesos moleculares aproximados dos antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais anti-*Babesia bovis* em Western blotting.

Clones	Pesos Moleculares (kDa)
C2	—
C4	não reativo
C5	—
C7	não reativo
C9	73
C12	não reativo
C13	162
	73
	25
C15	73
	25
	20
C17	25
	19
C20	162
	73
	25
	19
C22	73
C23	162
	73
	24
C25	—
C28	—
C29	73
C31	não reativo
C34	162
	73
C36	73

(—) A reação não foi realizada por falta de sobrenadante.

Os clones 9, 22, 29 e 36 reconheceram somente uma banda de 73 kDa. As bandas protéicas reconhecidas pelos clones podem ser visualizadas na Figura 6a, b. A Tabela 5 mostra a reatividade dos anticorpos monoclonais anti-*Babesia bovis* em RIFI, ELISA e Western blotting.

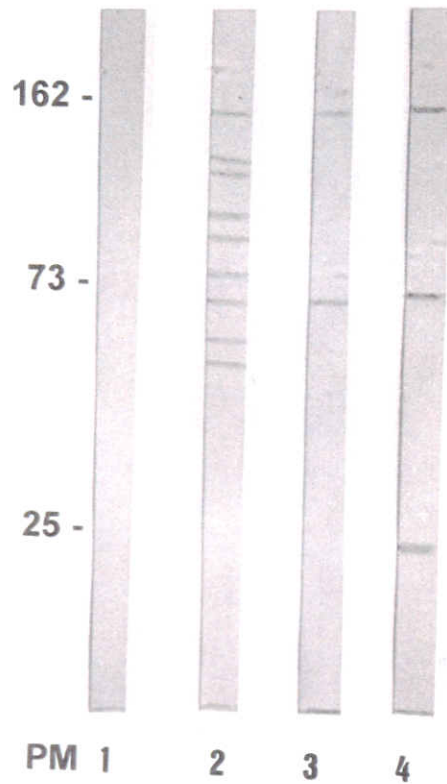


Figura 6a Western Blotting com os anticorpos monoclonais frente ao antígeno de *Babesia bovis*. Pesos moleculares (kDa) indicados à esquerda.

- 1 Controle bovino negativo
- 2 Controle bovino positivo
- 3 Clone 34
- 4 Clone 13

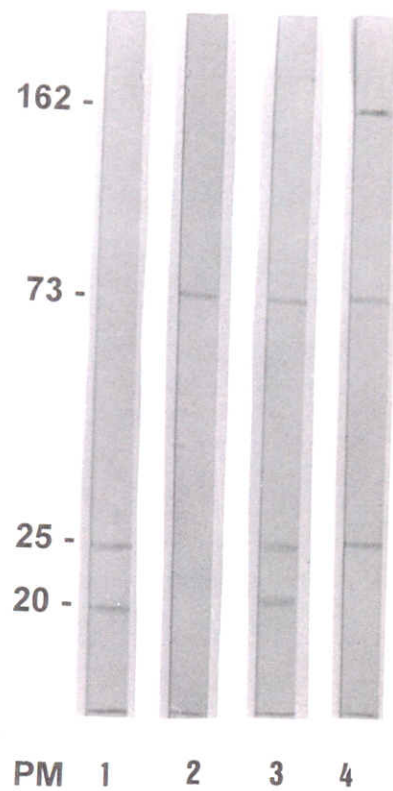


Figura 6b Western Blotting com os anticorpos monoclonais frente ao antígeno de *Babesia bovis*. Pesos moleculares (kDa) indicados à esquerda.

- 1 Clone 17
- 2 Clone 22
- 3 Clone 15
- 4 Clone 13

Tabela 5 Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-*Babesia bovis* em RIFI, ELISA e Western blotting

Clones	RIFI (local de emissão de fluorescência)	ELISA Absorvância (492 nm)	Pesos Moleculares (kDa)
C2	contorno de merozoito	0,423	—
C4	merozoito todo	0,409	não reativo
C5	merozoito todo	0,435	—
C7	merozoito todo	0,502	não reativo
C9	merozoito todo	0,407	73
C12	merozoito todo	0,410	não reativo
C13	merozoito todo	0,446	162 73 25
C15	merozoito todo	0,449	73 25 20
C17	merozoito todo	0,377	25 19
C20	merozoito todo	0,486	162 73 25 19
C22	merozoito todo	0,425	73
C23	merozoito todo	0,425	162 73 24
C25	superfície polar de merozoito	0,425	—
C28	merozoito todo	0,365	—
C29	contorno de merozoito	0,382	73
C31	região polar de merozoito	0,368	não reativo
C34	contorno de merozoito	0,368	162 73
C36	contorno de merozoito	0,369	73

(—) A reação não foi realizada por falta de sobrenadante.

5 DISCUSSÃO

A *Babesia bovis* é um protozoário intraeritrocitário, composto por diversos antígenos, que precisam ser isolados e purificados visando obter melhores resultados nos estudos imunodiagnósticos e imunoproliféricos.

O maior entrave para o desenvolvimento de testes mais sensíveis e específicos para a babesiose está relacionado com a natureza das preparações antigênicas utilizadas; geralmente, antígenos totais, ou seja, hemácias parasitadas.

A técnica da hibridização desenvolvida por Kohler & Milstein (1975), revelando a possibilidade de imortalizar linfócitos B normais através da fusão com células de mieloma, permite estudar a composição antigênica desse hemoparasito.

Este trabalho demonstra que a técnica dos anticorpos monoclonais pode ser desenvolvida contra a *B. bovis* e estabelecidas as condições de clonagem e preservação dos hibridomas ao nível de Brasil.

A técnica empregada não difere significativamente das descritas por outros autores, entretanto, certos aspectos devem ser ressaltados, como a imunização dos camundongos, a seleção dos híbridos e a clonagem.

A dificuldade na etapa de imunização deveu-se à impureza do material antigênico utilizado (hemoparasito e debris celulares), traduzida pela resposta imune de alguns camundongos contra todos os componentes celulares presentes no antígeno utilizado na RIFI, bem como a substância usada como criopreservador (DMSO). Estudos preliminares

mostraram que antígenos (amostra brasileira) criopreservados com DMSO provocavam áreas de alopecias com hiperemia nos animais inoculados, e os soros desses camundongos, quando submetidos à RIFI, revelavam fortes reações contra todos os componentes celulares. Portanto, baseando-se nesses dados, optou-se por usar o antígeno (amostra México) desenvolvido para o teste de ELISA no Centre for Tropical Veterinary Medicine em Edinburgh - Escócia, uma vez que o processamento (lise de hemácias, sonicação e centrifugação) para obtenção deste antígeno reduz substancialmente restos celulares, favorecendo, desta forma, uma melhor resposta imune, e que esta amostra é a que mais se assemelha à amostra brasileira (Passos, 1993).

A etapa de seleção dos híbridos positivos teve os seus entraves, devido ao método empregado para a sua realização (RIFI). A técnica de imunofluorescência indireta, apesar de ser simples, de fácil execução, apresentou algumas limitações abaixo descritas. Após a fusão celular, as possíveis células fusionadas foram transferidas para cinco placas de 96 orifícios, conforme descrito no item 3.5.2.

Decorridos 13 dias, os orifícios com crescimento celular relativo à 2/3 da sua superfície (464 orifícios) foram testados em RIFI. Conforme o exposto, a grande quantidade de orifícios a serem testados em um reduzido espaço de tempo, e a leitura subjetiva, neste caso com dificuldade ainda maior, visto que, os anticorpos monoclonais produzidos pelos hibridomas poderiam estar reagindo com regiões polares facilmente confundíveis com precipitados ou reações inespecíficas, vem de encontro com as observações feitas por Callow et al. (1974).

Apesar dessas dificuldades, o valor dessa técnica para a seleção de clones produtores de anticorpos monoclonais não deve ser afetado, visto que Wright et al. (1983) utilizaram-na para a seleção de clones específicos contra *B. bovis*; Goff et al. (1988), a fim de demonstrar o local de ligação dos anticorpos monoclonais nos antígenos de *B. bovis* e Figueroa et al. (1990), para observar a especificidade dos anticorpos

monoclonais anti-*B. bovis* frente ao antígeno de *B. bigemina*. Nesse trabalho realizado por Figueroa et al. (1990), observou-se que o local de ligação antígeno-anticorpo monoclonal era tão bem definido quanto por microscopia imunoeletrônica.

A mais importante modificação da técnica descrita por Kohler & Milstein (1975), refere-se à diluição sucessiva (diluições seriadas realizadas nas placas de forma que o último orifício fique com uma célula). No trabalho desenvolvido, a clonagem foi realizada por contagem e diluição das células de modo que, durante a distribuição nas placas de cultura, se colocasse apenas uma célula por orifício (diluição limitante). Isso permitiu permanecer com uma grande variedade de híbridos e menores gastos de materiais de consumo.

Após a clonagem, pôde-se observar um ótimo crescimento dos híbridos. Esse fato, provavelmente, foi devido à monocamada de macrófagos, pois os macrófagos facilitam o estabelecimento dos hibridomas após a clonagem e primeira transferência para as placas de 24 orifícios (Campbell, 1991).

Finalizada a produção dos anticorpos monoclonais, tinha-se como objetivo caracterizá-los em RIFI, ELISA, Western blotting e, conseqüentemente, estudar a composição antigênica da *B. bovis*.

Este estudo foi iniciado com a identificação dos locais de ligação desses anticorpos monoclonais nos antígenos de *B. bovis* através da RIFI (Goff et al., 1988), em que pode-se perceber que a maioria dos anticorpos monoclonais reagiu com o merozoíto da *Babesia*, conforme descrito no item 4.4.2.

O objetivo de caracterização desses anticorpos monoclonais anti-*B. bovis*, através de RIFI, foi de observar o local de ligação desses anticorpos monoclonais à *B. bovis*, já que se sabe que antígenos de superfície de merozoítos e da região polar são importantes na indução

de produção de anticorpos bloqueadores da invasão eritrocitária (Goff et al., 1988).

Outra importante inferência que se pode fazer refere-se à presença de antígenos comuns entre as espécies de *Babesia*, visto que o antígeno utilizado na RIFI era proveniente de amostra brasileira, enquanto que os anticorpos monoclonais foram produzidos frente à amostra México. A heterogeneidade das populações de *Babesia* foi descrita por Curnow (1968, 1973), através do teste de aglutinação, Kahl et al. (1982, 1983), através de eletroforese em gel bi-dimensional e por análise de sonda de DNA realizada por Cowman (1984).

Vale ressaltar que todos os anticorpos monoclonais foram submetidos a isotipagem através de imunodifusão em gel de ágar, porém foi possível caracterizar somente dois clones, os de número 13, e 20. A explicação para esse fato, possivelmente, deva-se à baixa quantidade de anticorpos monoclonais presentes nos concentrados.

Em relação à reatividade dos anticorpos monoclonais em ELISA, puderam observar diferentes intensidades de absorvância de 0,502 a 0,365, permitindo distinguir claramente os clones positivos dos negativos (cut-off = 0,022). Todos os clones positivos em RIFI apresentaram positividade em ELISA, concordando com a observação realizada por Barry et al. (1982), quando puderam comprovar 95% de concordância entre os dois testes.

Apesar das diferentes absorvâncias encontradas, não foi possível comparar se os clones que reagiram com contorno de merozoíto ou região polar apresentavam leitura menor que os clones que reagiram com merozoíto todo.

Estudos preliminares sobre a eletroforese em gel de poliacrilamida, a fim de separar as proteínas presentes na preparação antigênica, mostrou que o antígeno utilizado para a imunização dos camundongos havia sofrido desnaturação de proteínas, provavelmente, devido ao processo

de liofilização. Baseado nesse estudo, optou-se por usar o antígeno de ELISA de *Babesia bovis* amostra brasileira sem passar pelo processo de liofilização, porquanto as proteínas separaram satisfatoriamente em SDS-PAGE. A análise das proteínas presentes nessa preparação antigênica mostrou ser o antígeno de *Babesia bovis* possuidor de inúmeras bandas protéicas, com variação de pesos moleculares entre 173 a 29 kDa, visualizadas através da coloração pela prata.

Após a separação das proteínas, suas transferências para membrana de nitrocelulose e a conseqüente reação com os anticorpos monoclonais, pôde-se notar que alguns clones perderam a sua reatividade, ou seja, não reconheceram nenhuma proteína. Essa perda de reatividade, provavelmente, deva-se a diferenças existentes entre os três testes e, particularmente, à preparação antigênica utilizada.

Em relação a RIFI, o antígeno utilizado é basicamente eritrócitos infectados íntegros fixados com acetona, já o antígeno para ELISA constitui-se de praticamente de parasitas solúveis, ou seja, as hemácias rompidas por lise diferencial com KCl e, posteriormente, sonicadas, são retiradas por centrifugação. Em contrapartida, o antígeno usado para a caracterização dos anticorpos monoclonais em Western blotting são também praticamente extratos de parasitas, porém as proteínas sofrem um processo de desnaturação através de aquecimento a 100 °C por três minutos.

Baseado nesses fatos, a perda da especificidade, ou seja, reatividade desses anticorpos monoclonais em Western blotting, é perfeitamente explicada e até mesmo supõe-se que esses anticorpos reagem com epítopos conformacionais (Liddell & Cryer, 1991).

A análise da reatividade dos anticorpos monoclonais em Western blotting revelou a heterogeneidade antigênica da *Babesia bovis*. O estudo mostrou várias bandas protéicas com pesos moleculares aproximados de 162, 73, 25, 24, 20 e 19 kDa.

Antígenos de *Babesia bovis* com pesos moleculares similares foram identificados por outros pesquisadores. Goodger et al. (1984) identificaram quatro bandas com pesos moleculares de 70, 60, 44 e 27 kDa de lisados de eritrócitos infectados com *B. bovis*, e algumas dessas bandas podem representar as mesmas proteínas encontradas neste presente estudo.

A proteína de 29 kDa, identificada por Wright et al. (1985) e usada em imunizações de bovinos susceptíveis, pode ser a proteína de 25 kDa identificada pelos monoclonais produzidos neste trabalho. Essa proteína, se associada com outras de poder imunogênico, pode ser apropriada ao desenvolvimento de programas de imunização, visto que, no trabalho realizado pelo pesquisador, acima descrito, ela mostrou conferir imunidade parcial contra amostras homólogas de *B. bovis*.

Outras proteínas com pesos moleculares de 22 e 70 kDa identificadas mostraram conferir proteção parcial contra proteínas isoladas de amostras virulentas e têm sido consideradas prósperos candidatos para os processos de imunização (Commins et al., 1985). A indução de proteção parcial também foi relatada por Goodger et al. (1990), ao utilizarem quatro proteínas de pesos moleculares variando de 12 a 18 kDa, possivelmente, as proteínas de 19 e 20 kDa neste trabalho analisadas, referem-se às proteínas acima citadas.

A proteína de 162 kDa, identificada pelos monoclonais anti-*B. bovis* produzidos neste trabalho, pode estar relacionada com as proteínas de pesos moleculares 180, 140 e 135 kDa isoladas de lisado de eritrócitos infectados por *B. bovis*. Esse lisado foi usado para a imunização de bovinos esplenectomizados e conferiu grande imunidade protetora (Goodger et al., 1987).

Pelo exposto, pode-se concluir que alguns componentes antigênicos da *B. bovis*, aparentemente imunodominantes, foram identificados neste estudo usando-se anticorpos monoclonais. Esses anticorpos monoclonais poderão ser usados no seqüenciamento genômico, no

desenvolvimento de testes mais sensíveis e específicos nos estudos epidemiológicos da babesiose bovina; na avaliação da ocorrência de variações antigênicas da *B. bovis* em diferentes regiões fisiográficas do Brasil; na caracterização das áreas de estabilidade e instabilidade enzoótica, bem como, utilizá-los na identificação e purificação de proteínas relevantes que poderão ser utilizadas como possíveis imunógenos na imunoprofilaxia da babesiose bovina.



6 CONCLUSÕES

A reação de imunofluorescência indireta é uma técnica adequada para a seleção de híbridos e clones positivos produtores de anticorpos contra *Babesia bovis*.

O painel de anticorpos monoclonais produzido permitiu a identificação de seis proteínas de merozoítos de *Babesia bovis* de diferentes pesos moleculares com potencial uso em testes imunodiagnósticos e imunoproláticos.

SUMMARY

With the aim of identifying antigens of *Babesia bovis*, with potential use in immunodiagnostic tests, a panel of monoclonal antibodies was produced and characterized by the indirect fluorescent antibody test, ELISA and Western blotting. The resultant hybrids, after fusion were selected by the indirect fluorescent antibody test, cloned, maintained in *in vitro* culture and cryopreserved in liquid nitrogen. Twelve clones producing monoclonal antibodies reacted against merozoites, while five reacted on the surface of merozoites and one clone reacted against the polar region of merozoites. All monoclonal antibodies reacted in ELISA, with optical density varying from 0.365 to 0.502 (cut-off = 0.022). The bands recognized by the monoclonal antibodies in Western blotting had molecular weights ranging from 162 to 19 kDa. Four clones recognized only one band of 73 kDa and the other did not react in Western blotting. These antigens will be useful for the development of more sensitive and especific immunodiagnostic tests for use in epidemiological studies on bovine babesiosis in Brazil.

Key-words: Monoclonal antibodies, indirect immunofluorescent antibody test, ELISA, Western blotting.

APÊNDICE I**SOLUÇÕES PARA RIFI****Tampão PBS pH 7,6**

NaCl	8,5 g
Na ₂ HPO ₄	1,28 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,17 g
Água destilada	1000 ml

PBS-Tween 80 (0,02%)

PBS pH 7,6	1000 ml
Tween 80	200 µl

Adicionar o Tween 80 após preparar o PBS e verificar o pH.

PBS-Tween 80 (0,05%)

PBS pH 7,6	1000 ml
Tween 80	500 µl

Adicionar o Tween 80 após preparar o PBS e verificar o pH.

APÊNDICE II**SOLUÇÕES PARA ELISA****Coating buffer pH 9,6**

Na ₂ CO ₃	0,16 g
NaHCO ₃	0,29 g
Água destilada	100 ml

PBS-Tween 80 (0,05%)

PBS pH 7,6	1000 ml
Tween 80	500 µl

Adicionar o Tween 80 após preparar o PBS e verificar o pH.

Solução ácido cítrico pH 5,0

Na ₂ HPO ₄	0,72 g
Ácido cítrico	0,52 g
Água destilada	100 ml

Tampão PBS pH 7,6

NaCl	8,5 g
Na ₂ HPO ₄	1,28 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,17 g
Água destilada	1000 ml

Substrato (OPD)

Ácido cítrico pH 5,0	10 ml
OPD	2 mg
Água oxigenada	2 µl

APÊNDICE III**SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE****Tampão de corrida**

Tris	6,06 g
Glicina	28,8 g
SDS	2 g
Água bidestilada	2000 ml

Tampão de amostra

SDS	0,23 g
Tampão do gel de concentração	1,25 ml
Glicerol	2 ml
2 mercaptoetanol	0,5 ml
Azul de bromofenol	400 µl
Água destilada	10 ml

Tampão do gel de concentração pH 6,8

Tris	12,10 g
SDS	0,80 g
Água bidestilada	100 ml

Acertar o pH para 6,8 com HCl 5N (HCl concentrado).

Tampão do gel de resolução pH 8,8

Tris	36,33 g
SDS	0,80 g
Água bidestilada	100 ml

Acertar o pH para 8,8 com HCl 5N.

Solução estoque de acrilamida

Acrilamida	30 g
Bis - acrilamida	0,8 g
Água destilada	100 ml

Solução de persulfato de amônio 10%

Persulfato de amônio	0,3 g
Água bidestilada	3 ml

Gel de acrilamida 10%

Sol. estoque de acrilamida	10 ml
Tampão do gel de resolução	3,75 ml
SDS 10%	300 μ l
Água bidestilada	13,28 ml
Persulfato de amônio 10%	150 μ l
TEMED	15 μ l

Gel de concentração

Sol. estoque de acrilamida	1,6 ml
Tampão do gel de concentração	1,25 ml
SDS 10%	100 µl
Água bidestilada	7,34 ml
Persulfato de amônio 10%	300 µl
TEMED	10 µl

Solução corante para proteínas (Coomassie)

Brilhante Blue R	0,63 g
Ácido acético	17,5 ml
Metanol	125 ml
Água bidestilada	250 ml

Dissolver o Coomassie em metanol, adicionar o ácido acético e filtrar em papel de filtro.

Solução descorante para proteínas

Ácido acético	70 ml
Metanol	100 ml
Água bidestilada	1000 ml

Solução pré - fixadora I

Ácido acético	14 ml
Metanol	86 ml
Água destilada	100 ml

Solução pré - fixadora II

Ácido acético	20 ml
Metanol	20 ml
Água destilada	160 ml

Glutaraldeído

Glutaraldeído 25%	105 ml
Água destilada	120 ml

Etanol aquoso 20 %

Etanol P. A	40 ml
Água destilada	160 ml

Solução de Prata

Etanol aquoso	190 ml
NaOH	0,05 g
Hidróxido de amônio	0,8 ml

Adicionar gota a gota:

Nitrato de prata	0,5 g
Água destilada	10 ml

Solução reveladora

Etanol aquoso	200 ml
Formaldeído	200 μ l
Ácido cítrico 2,3M	50 μ l

Solução inativadora

Etanol aquoso	200 ml
Ácido acético	2 ml

APÊNDICE IV**SOLUÇÕES PARA WESTERN BLOTTING****Tampão de transferência**

Tris	6,055 g
Glicina	28,835 g
Metanol	400 ml
Água bidestilada	2000 ml

Solução de Ponceau's 1%

Ponceau's	1 g
Ácido acético	10 ml
Água bidestilada	100 ml

Tampão de neutralização

Tris	6 g
NaCl	14,6 g
Água bidestilada	100 ml

Acertar o pH para 7,5 com HCl 5N

Tampão de Bloqueio (10 X)

Tris	6,055 g
NaCl	8,766 g
EDTA	0,372 g
NP40	0,5 ml
Gelatina	0,25 g
Thiomersal	0,2 g

Antes do uso diluir a solução com água destilada (1:10) e acrescentar 5% de leite em pó.

PBS-Tween 80 (0,05%)

PBS pH 7,6	1000 ml
Tween 80	500 µl

Adicionar o Tween 80 (0,05%) após preparar o PBS e verificar o pH.

Tampão salina - Tris

Tris	2,422 g
NaCl	29,22 g

Fazer 1000 ml e ajustar o pH para 7,5 com HCl.

Substrato

(A) 60 mg de 4 cloro -1- naphtol em
20 ml de metanol gelado (freezer)

(B) 100 ml de tampão salina - Tris pH 7,5

Misturar A e B imediatamente antes do uso e acrescentar 60 μ l de
água oxigenada gelada (freezer).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. 2. ed.: Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. 457p.
- ALONSO, M., ARELLANO-SOTA, C., CERESER, V.H., et al.. Epidemiology of babesiosis in Latin America and the Caribbean. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v.11, p.713-733, 1992.
- ANTCZAK, D.F. Monoclonal antibodies: technology and potential use. **J. Am. Med. Assoc.**, v.181, p.1005-1011, 1982.
- BABES, V. Sur l'hémoglobinurie du bouef. **C. R. Acad. Sci.**, v.107, p.692-694, 1888.
- BARRY, D.N., RODWELL, B.J., TIMMS, P. et al. Microplate enzyme immunoassay for detecting and measuring antibodies to *Babesia bovis* in cattle serum. **Aust. Vet. J.**, v.59, p.136-140, 1982.
- BERNE, M.E.A. **Identificação e purificação de antígenos somáticos de formas adultas de *Fasciola hepatica* através de anticorpos monoclonais: ensaios de imunoproteção e imunodiagnósticos**. Belo Horizonte: UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, 1994. 168p. Tese (Doutorado).

- BESSENGER, R., SCHOEMAN, J.H. Serological response of cattle to infection with *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in South Africa. **Onderst. J. Vet. Res.**, v.50, p.115-117, 1983.
- BIDWELL, D.E., TURP, P., JOYNER, L.P., et al.. Comparison of serological tests for babesiosis in British cattle. **Vet. Res.**, v.103, p.446-449, 1978.
- BLANN, A.B. Cell hybrids and important source of antibody production. **Med. Lab. Sci.**, v.36, p.329, 1979.
- BÖSE, R., JACOBSON, R.H., GALE, K.R., et al. An improved ELISA for detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinant *B. bovis* antigen. **Parasitol. Res.**, v.76, p.648-652, 1990.
- BROCKLESBY, D.W., ZWART, D., PERIE, N.M. Serological evidence for the identification of *Babesia major* in Britain. **Res. Vet. Sci.**, v.12, p.285-287, 1971.
- BURRIDGE, M.J., KIMBER, C.D., McHARDY, N. Detection of antibodies to *Babesia bigemina* in dried blood sample using the indirect fluorescent antibody test. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.67, p.191-195, 1973.
- CALLOW, L.L., MCGREGOR, W., PARKER, R.J. et al. Immunity of cattle to *Babesia bigemina* following its elimination from the host, with observations on antibody levels detected by the indirect fluorescent antibody test. **Aust. Vet. J.**, v.50, p.12-18, 1974.
- CAMPBELL, AM. **Monoclonal antibody and immunosensor technology**. Amsterdam: Elsevier, 1991. 427p.



- COMMINS, M.A., GOODGER, B.V., WRIGHT, I.G. Proteinases in the lysate of bovine erythrocytes infected with *Babesia bovis*: initial vaccination studies. **Int. J. Parasitol.**, v.15, p.491-495, 1985.
- COWMAN, A.F., TIMMS, P., KEMP, D.J. DNA polymorphism and subpopulations in *Babesia bovis*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.11, p.91-103, 1984.
- CURNOW, J.A. *In vitro* agglutination of bovine erythrocytes infected with *Babesia argentina*. **Nature**, v.217, p.267-268, 1968.
- CURNOW, J.A. Studies on antigenic changes and strain differences in *Babesia argentina* infections. **Aust. Vet. J.**, v.49, p.279-283, 1973.
- DALRYMPLE, B.P. Molecular variation and diversity in candidate vaccine antigens from *Babesia*. **Acta Trop.**, v.53, p.227-238, 1993.
- ENGVALL, E., PERLMANN, P. Enzyme linked immunosorbent assay ELISA. III Quantification of specific antibodies by enzyme labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. **J. Immunol.**, v.109, p.129-135, 1972.
- FIGUEROA, J.V., BUENING, G.M., KINDEN, D.A. et al. Identification of common surface antigens among *Babesia bigemina* isolates by using monoclonal antibodies. **Parasitology**, v.100, p.161-175, 1990.
- FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. (Ed) **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.23-52.

- GARNHAM, P.C., VOLLER, A. Experimental studies on *Babesia divergens* in rhesus monkeys with special reference to its diagnosis by serologic methods. **Acta Protozool.**, v.3, p.183-187, 1965.
- GODING, J.W. Antibody production by hybridomas. **J. Immunol. Meth.**, v.36, p.285-308, 1980.
- GOFF, W.L., DAVIS, W.C., PALMER, G.H., et al. Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine sera and monoclonal antibodies. **Infect. Immunol.**, v.56, p.2363-2368, 1988.
- GOODGER, B.V., WRIGHT, I.G. Babesial antigens in a saline eluate of sucrose washed bovine erythrocytes infected with *Babesia bovis*. **Experimentia**, v.39, p.1392-1393, 1983.
- GOODGER, B.V., COMMINS, M.A., WRIGHT, I.G. et al. *Babesia bovis* vaccination of cattle against heterologous challenge with fractions of lysate from infected erythrocytes. **Z. Parasitenk.**, v.70, p.321-329, 1984.
- GOODGER, B.V., COMMINS, M.A., WRIGHT, I.G., et al. *Babesia bovis*: vaccination trial with a dominant immunodiffusion antigen in splenectomized calves. **Z. Parasitenk.**, v.72, p.715-722, 1986.
- GOODGER, B.V., COMMINS, M.A., WRIGHT, I.G., et al. Successful homologous vaccination against *Babesia bovis* using a heparin-binding fraction of infected erythrocytes. **Int. J. Parasitol.**, v.17, p.935-940, 1987.

- GOODGER, B.V., COMMINS, M.A., WALTISBUHL, D.L., et al. *Babesia bovis*: immunity induced by vaccination with a lipid enriched fraction. **Int. J. Parasitol.**, v.20, p.685-687, 1990.
- HINES, S.A., McELWAIN, T.F., BUENING, G.M., et al. Molecular characterization of *Babesia bovis* merozoite surface proteins bearing epitopes immunodominant in protected cattle. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.37, p.1-10, 1989.
- HINES, S.A., PALMER, G.H., JASMER, D.P., et al. Neutralization sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.55, p.85-94, 1992.
- IICA. **Técnicas para el diagnóstico de babesioses e anaplasmoses bovinas.** San José, Costa Rica, 1987. 79p.
- JASMER, D.P., REDUKER, D.W., HINES, S.A., et al. Surface epitope localization and gene structure of *Babesia bovis* 44 kilodalton variable merozoite surface antigen. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.55, p.75-84, 1992.
- KAHL, L.P., ANDERS, R.F., RODWELL, B.J., et al. Variable and common antigens of *Babesia bovis* parasites differing in strain and virulence. **J. Immunol.**, v.129, p.1700-1705, 1982.
- KAHL, L.P., MITCHELL, G.F., DALGLIESH, R.J., et al. *Babesia bovis*: proteins of virulent and avirulent parasites passaged through ticks and splenectomized or intact calves. **Exp. Parasitol.**, v.56, p.222-235, 1983.

- KEARNEY, J.F., RADBROUCH, A., LIESEYANG, B., et al. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody - secreting hybrid cell lines. **J. Immunol.**, v.123, p.1548-1550, 1979.
- KELLEY, K.W., LEWIN, H.A. Monoclonal antibodies: pragmatic application of immunology and cell biology. **J. Anim. Sci.**, v.63, p.288-309, 1986.
- KOHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v.256, p.495-497. 1975.
- KUNG'U, M.W., GOODGER, B.V. A slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for screening of *Babesia* - specific monoclonal antibodies. **Int. J. Parasitol.**, v.20, p.341-345, 1990.
- KUTTLER, K.L. World wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. (Ed) **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.2-22.
- KUTTLER, K.L., ADAMS, L.G., TODOROVIC, R.A. Comparisons of the complement - fixation and indirect fluorescent antibody reactions in the detection of bovine babesiosis. **Am. J. Vet. Res.**, v.38, p.153-156, 1977.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-686, 1970.
- LEEFLANG, P., PERIÉ, N.M. Comparative immunofluorescent studies on 4 *Babesia* species of cattle. **Res. Vet. Sci.**, v.13, p.342-346, 1972.

- LEVINE, N.D. Blood parasites: the piroplasms. In: LEVINE, N.D. **The protozoan phylum Apicomplexa**. Boca Raton: CRC Press. 1988.v.2, c.13, p.35-45.
- LIDDELL, J.E., CRYER, A. **A practical guide to monoclonal antibodies**. Ontario: John Wiley & Sons, 1991. 188p.
- LITTLEFIELD, J.W. Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. **Science**, v.145, p.708-709, 1964.
- LUDFORD, C.G., HALL, W.T.K., SULZER, A.J. et al. *Babesia argentina*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium falciparum*: antigenic cross reactions. **Exp. Parasitol.**, v.32, p.317-326, 1972.
- MADDEN, P.A., HOLBROOK, A.A. Equine piroplasmiasis: indirect fluorescent antibody test for *Babesia caballi*. **Am. J. Vet. Res.**, v.29, p.117-123, 1968.
- MADRUGA, C.R., AYCARDI, E., PUTT, N. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in the Savannah region of the Mato Grosso do Sul State (Brazil). I. Prevalence. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.35, p.631-640, 1983.
- MADRUGA, C.R., BERNE, M.E.A., KESSLER, R.H., GOMES, R.F.C., LIMA, J.G., SCHENK, M.A.M. Diagnóstico da tristeza parasitária bovina no estado do Mato Grosso do Sul: inquérito de opinião. Min. Agric. EMBRAPA - CNPGC, Circ. Téc., n.18, 32p., 1986

- OUCHTERLONY, O. Handbook of immunodifusion and immunoelectroforesis. **Ann. Sci. Publ. Ann. Arbor. Mich. USA**, 1968.
- PALMER, G.H., McELWAIN, T.F., PERRYMAN, L.E., et al. Strain variation of *Babesia bovis* merozoite surface exposed epitopes. **Infect. Immunol.**, v.59, p.3340-3342, 1991.
- PASSOS, L.M.F. **Immunological studies on bovine babesiosis with particular reference to Brazil, using *in vitro* culture-derived antigens.** Edinburg: Centre for Tropical Veterinary Medicine, 1993. 326p. Tese (Doutorado).
- PASSOS, L.M.F., SACCO, A.M.S., RAE, P. Assessment of lyophilised antigens in ELISA for *Babesia bovis* antibody detection. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.48, p.223-226, 1996.
- PATARROYO, J.H.S., RIBEIRO, M.F.B., SANTOS, J.L., et al. Epidemiology of *Babesia* infections in cattle in Minas Gerais State. 1. Prevalence of fluorescent antibodies in the Zona da Mata - MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.39, p.423-429, 1987.
- PURNELL, R.E., HENDRY, D.J., BIDWELL, D.E. & TURP, P. Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to *Babesia divergens* in cattle. **Vet. Rec.**, v.99, p.102, 1976.
- REDUKER, D.W., JASMER, D.P., GOFF, W.L., et al. A recombinant surface protein of *Babesia bovis* elicits antibodies that react with live merozoites. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.35, p.239-248, 1989.

- REITER, I., WEILAND, G. Recently developed methods for the detection of babesial infections. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.83, p.21-23, 1989.
- RICHARDSON, M.D. TURNER, A., WARNOCK, D.W. et al. Computer-assisted rapid enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serological diagnosis of aspergillosis. **J. Immunol. Meth.**, v.9, p.557-562, 1983.
- RISTIC, M., OPPERMANN, J., SIBINOVIC, S. et al. Equine piroplasmiasis: a mixed strain of *Piroplasma caballi* and *Piroplasma equi* isolated in Florida and studies by the fluorescent antibody technique. **Am. J. Vet. Res.**, v.25, p.15-23, 1964.
- RISTIC, M., SIBINOVIC, S. Equine babesiosis: diagnosis by a precipitin in gel and a one-step fluorescent - antibody inhibition test. **Am. J. Vet. Res.**, v.25, p.1519-1526, 1964.
- RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man.** Boca Raton: CRC Press, 1988. 255p.
- ROSS, J.P.J., LÖHR, K.F. Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the fluorescent antibody test. **Res. Vet. Sci.**, v.9, p.557-562, 1968.
- ROSS, J.P.J., LÖHR, K.F. Transmission and persistence of colostral antibody to *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Z. Tropenmed Parasitol.**, v.21, p.410-411, 1970.
- SHULMAN, M., WILDE, C. D., KÖHLER, G. A better cell line for making hybridomas secreting antibodies. **Nature**, v.276, p.269-270, 1978.

- SMITH, T., KILBORNE, F.L. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. **USDA Bur. Anim. Ind. Bull.**, v.1, p.7-269, 1893.
- SPENCER, T.L. Blockers, diluents and anomalous in ELISAs. In: BURGESS, D.W (Ed) **ELISA technology in diagnosis and research**, Townsville: James Cook University, 1988. p.51-59.
- SUAREZ, C.E., PALMER, G.H., JASMER, D.P., et al. characterization of the gene encoding a 60 kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.46, p.45-52, 1991.
- TIJSSEN, P. Processing of data and reporting of results of enzyme immunoassays. In: BURDON, R.D., VAN KNIPPENBERG, P.H. (Ed). **Practice and theory of enzyme immunoassay** Amsterdam: Science Publishers, 1985. p.385-421.
- TIMMS, P., BARRY, D.N. Failure of a recombinant *Babesia bovis* antigen to protect cattle against heterologous strain challenge. **Res. Vet. Sci.**, v.45, p.267-269, 1988.
- TODOROVIC, R.A., LONG, R.F. Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia* spp infections in Colombian cattle. **Z. Tropenmed Parasitol.**, v.27, p.169-182, 1976.
- TODOROVIC, R.A., GARCIA, R. Comparison of dried on filter paper and serum technique for the diagnosis of bovine babesiosis utilizing the indirect fluorescent antibody (IFA) test. **Z. Tropenmed Parasitol.**, v.29, p.88-94, 1978.

- TODOROVIC, R.A., CARSON, C.A. Methods for measuring the immunological response to *Babesia*. In: RISTIC, M.(Ed) **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. 381p.
- TOWBIN, H., STAEBLIN, T., GORDON, G. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.76, p.4330-4335, 1979.
- TUNON, P., JOHANSON, K.E. Yet another improved silver staining method for detection of proteins in poliacrylamide gels. **J. Biochem. Biophys. Meth.**, v.9, p.171-179, 1984.
- VOLLER, A., BARLETT, A., BIDWELL, D.E. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.70, p.98-106, 1976.
- VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BARLETT, A. **The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) - a guide with abstracts of microplate applications**. Guernsey: Dynatech Europe, 1979. 125p.
- WALTISBUHL, D.J., GOODGER, B.V., WRIGHT, I.G. et al. An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. **Parasitol. Res.**, v.73, p.126-131, 1987.
- WRIGHT, I.G. The kallikrein - kinin system and its role in the hypotensive shock syndrome of animals infected with the haemoprotozoan parasites *Babesia*, *Plasmodium* and *Trypanosoma*. **Gen. Pharmacol.**, v.10, p.319, 1979.



WRIGHT, I.G., WHITE, M., TRACEY-PATTE, P.D., et al.
Babesia bovis: isolation of a protective antigen by using
monoclonal antibodies. **Infect. Immunol.**, v.41, p.244-250,
1983.

WRIGHT, I.G., MIRRE, G.B., RODE-BRAMANIS, K., et al.
Protective vaccination against virulent *Babesia bovis* with a low
molecular weight antigen. **Infect. Immunol.**, v.48, p.109-113,
1985.

YOSHIDA, N., NUSSENVWEIG, R.S., POTOENJAK, P., et al.
Hybridoma produces protective antibodies directed against the
sporozoite stage of malaria parasite. **Science**, v.207, p.71-73,
1980.