

# INVESTIGACIONES SOBRE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE LA BABESIOSIS BOVINA

JULIO VICENTE FIGUEROA MILLÁN  
JESÚS ANTONIO ÁLVAREZ MARTÍNEZ

1. Introducción .....	76
II. Identificación de animales portadores infectados con <i>Babesia bigemina</i> .....	80
III. Identificación de animales portadores infectados con <i>Babesia bovis</i> .....	81
IV: Prueba de PCR múltiple para identificar ADN de <i>B. bigemina</i> y <i>B. bovis</i> .....	82
1. Uso de la prueba de PCR en estudios epidemiológicos de la babesiosis bovina .....	84
2. Uso de la prueba de PCR en el monitoreo de bovinos inoculados con cepas vacunales de <i>Babesia</i> <i>bovis</i> y <i>Babesia bigemina</i> .....	85
3. Aplicación de la prueba de PCR múltiple en el monitoreo de bovinos movilizados a una zona endémica de babesiosis .....	86

V Avances en la investigación sobre vacunas inactivadas...	87
1. Vacunas constituidas de Antígenos Parasitarios Solubles (APS) .....	87
2. Antígenos candidatos para vacunación en forma de proteína recombinante .....	89
Referencias .....	94

## I. Introducción

La babesiosis bovina causada por *B. bigemina* y/o *B. bovis*, es considerada como una de las enfermedades económicamente mas importante del ganado en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (1). Ambas especies de *Babesia* comparten la garrapata *Boophilus* spp. como vector para su transmisión biológica al ganado (1).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad incluyen fiebre, anorexia, depresión, debilidad, ataxia, hemoglobinuria, anemia, ictericia, y la presencia de parásitos intraeritrocíticos (1, 2). En condiciones de campo, es frecuente que ambos organismos se encuentren infectando al mismo animal (1). Tradicionalmente, el diagnóstico de la Babesiosis bovina involucra el reconocimiento e identificación de los estadios parasíticos intraeritrocíticos y se basa en parte, en el tamaño, la morfología, y las características de tinción. El tamaño y la morfología son los principales parámetros de diagnóstico de la especie causal, y un microscopio calibrado es la herramienta esencial en un

laboratorio de diagnóstico (1, 2). Así, el método de diagnóstico relativamente más simple y que mas frecuentemente se ha utilizado, es la observación directa al microscopio de los parásitos intraeritrocíticos presentes en extensiones de sangre, colectada a partir de vasos periféricos y teñidas con colorante de Giemsa. Este método es bastante sensible, económico y relativamente fácil de implementarse en un laboratorio medianamente equipado. Sin embargo, es considerado por algunos autores como tardío, exhaustivo y dependiente de un "ojo" experimentado por parte del técnico microscopista. Independientemente de las citadas desventajas, el método ha sido, y continúa siendo utilizado como la primera herramienta de trabajo para la identificación y confirmación de los organismos protozoarios, especialmente en los casos de la babesiosis bovina con presentación en forma aguda (1, 2,3).

Como una alternativa diagnóstica, se han desarrollado un gran número de métodos de diagnóstico inmunológico, los cuales están basados principalmente en la identificación de anticuerpos circulantes producidos por el hospedero hacia los antígenos babesiales, y algunos basados en la identificación misma de los antígenos parasitarios (4). Los métodos inmunológicos, aún cuando se ha reportado ser sensibles, se les atribuyen algunas desventajas: si inducidos, los anticuerpos anti-parasito pueden estar presentes en el suero hasta algún tiempo después de iniciada la infección, o pueden persistir por mucho tiempo posterior a la resolución de la infección. La persistencia de anticuerpos pudiera ser un problema en términos epidemiológicos, por ejemplo, ciertos animales en áreas endémicas pueden tener un elevado nivel de anticuerpos reactivos en la ausencia del parásito. En los países donde se producen y comercializan vacunas *anti-Babesia*, los animales inmunizados pueden tener anticuerpos que confundirían el diagnóstico.

Idealmente, los anticuerpos *anti-Babesia* debieran ser detectados con antígenos purificados bien definidos. Sin embargo, tales antígenos son difíciles de obtener, y el uso de antígenos crudos pudiera disminuir la especificidad de una prueba diagnóstica dada la similitud de epítomos presentes en diferentes especies de *Babesia*. Además, en la detección de antígenos babesiales con anticuerpos policlonales se presenta el problema de reacción cruzada con otras especies. Es de esperarse que la clonación de genes que codifican por péptidos inmunodominantes y específicos de especie, así como el uso de anticuerpos monoclonales incrementaría la especificidad de este tipo de pruebas. Los métodos inmunológicos han sido mayoritariamente utilizados en estudios epidemiológicos de la babesiosis bovina, pero en situaciones en las cuales se precise de la determinación a nivel especie, y la detección directa del material genético parasitario, mediante el uso de sondas de ácidos nucleicos o técnicas de amplificación, pudiera proveernos de otra alternativa diagnóstica (5, 6).

La tecnología de sondas de ácidos nucleicos está siendo usada cada vez más en los laboratorios de investigación y diagnóstico de la babesiosis bovina. Esto se da como resultado de un mayor conocimiento, disponibilidad comercial de reactivos para la preparación de sondas, la necesidad de métodos analíticamente más sensibles para la identificación de organismos difíciles de cultivar, la necesidad de métodos más específicos para la detección de ácidos nucleicos, y los avances recientes en la tecnología de sondas de ácidos nucleicos. La clave para el desarrollo de sondas de ácidos nucleicos es la identificación de secuencias nucleotídicas que sean únicas para el organismo de interés en particular (7). Tales secuencias pueden ser de ADN genómico, ADN plasmídico o ARN ribosomal. El ácido nucleico que contiene tales secuencias es aislado y amplificado

biológicamente por medio de técnicas de ADN recombinante, para posteriormente incorporarle una molécula marcadora radioactiva o no-radioactiva. En forma alterna, ARN, ADN complementario, u oligonucleótidos sintéticos pueden marcarse y ser usados como sondas. El ADN o ARN así marcado es entonces hibridado al ácido nucleico de una sola cadena (ADN o ARN) presente en tejidos, en soporte de papel, o en solución. Si las secuencias de nucleótidos presentes en la sonda son complementarias a las presentes en la muestra, la hibridación ocurre formando un ácido nucleico de doble cadena, el cual puede ser identificado por auto-radiografía, si se usa una sonda marcada radioactivamente o con moléculas que actúan sobre sustratos quimio-luminiscentes, o por colorimetría para sondas marcadas con moléculas no radioactivas (7, 8, 9). A fines de la década de los 80, esta tecnología fue aplicada en el área de las hemoparasitosis bovinas, en mayor medida hacia la confirmación de la presencia del agente causal en casos agudos de la enfermedad (5, 6). Dentro de las mayores desventajas observadas en el pasado reciente, se incluye la relacionada con los límites de sensibilidad analítica de la tecnología de hibridación, bioseguridad y la vida media de las sondas radioactivas (5, 8, 9, 10, 11).

La introducción de nuevas tecnologías para la amplificación de ácidos nucleicos tales como la de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), han revolucionado la tecnología de sondas (12). Así la sensibilidad analítica no es un problema mayor ahora, ya que las secuencias de ADN a buscarse pueden ser amplificadas antes de la hibridación con sondas específicas. La técnica de PCR es un método enzimático el cual permite la amplificación *in vitro*, en el orden de varios millones de veces, de secuencias de ADN específicas. Desde su introducción en 1985, la técnica de PCR ha facilitado el desarrollo de una gran cantidad de sistemas de detección basados en ácidos nucleicos para

identificar bacterias, virus y parásitos de importancia médica veterinaria (13). Debido a su elevada sensibilidad, especificidad y velocidad, la técnica de PCR ofrece importantes ventajas sobre los métodos convencionales de diagnóstico. Sin embargo, aunque una gran cantidad de métodos diagnósticos basados en PCR -y usados para la detección de agentes infecciosos que afectan a los animales domésticos- han sido descritos en la literatura, su aplicación no es todavía de rutina, aún en los grandes laboratorios de diagnóstico. Los problemas asociados a la contaminación de amplicones (productos ADN de previas amplificaciones), el elevado costo de los materiales y reactivos necesarios, así como los intensos y laboriosos métodos de detección posteriores a la técnica de PCR (análisis de productos amplificados), son algunas de las condiciones que limitan el amplio uso de esta técnica (5, 6, 11, 13). En este trabajo se presentan, en forma resumida, los resultados de investigaciones que se realizaron durante el desarrollo y uso de un método basado en la amplificación del ADN para identificar a los parásitos *Babesia bovis* y *B. bigemina*.

## **II. Identificación de animales portadores infectados con *Babesia bigemina***

Un fragmento de ADN cortado con las enzimas de restricción *Spe* I y *Ava* I del plásmido pBbi16 (un derivado de pBR322 conteniendo un inserto de 6, 300 pares de bases (pb) de ADN de *B. bigemina*) fue subclonado en el vector fagómico pBluescript y secuenciado por el método de terminación de cadenas mediado por didesoxinucleótidos (3). A partir de la secuencia obtenida se diseñaron y sintetizaron dos pares de oligonucleótidos (oligos) para ser utilizados en la prueba de PCR. El par de oligos IA/IB fue utilizado para amplificar un fragmento de 278 pb a partir de ADN genómico del parásito, mientras que el par de oligos

IAN/IBN fue usado para preparar una sonda la cual, cuando hibrida al ADN "blanco", reconoce un sitio dentro del fragmento de ADN a identificar y amplificado por la prueba de PCR. La sonda fue incorporada con la molécula marcadora Digoxigenina dUTP durante la reacción de amplificación.

La amplificación por PCR del ADN genómico parasítico obtenido de *Babesia bigemina* cultivada *in vitro*, seguido de la hibridación de ácidos nucleicos del producto amplificado con la sonda no radioactiva, demostró que el fragmento de 278 pb podría ser identificado cuando se iniciaba el PCR con por lo menos 100 pg de ADN genómico del parásito. Un fragmento de ADN de tamaño similar se amplificó por PCR en muestras conteniendo ADN genómico obtenido de varios aislados de *Babesia bigemina*, pero no así de *Babesia bovis*, *Babesia divergens*, *Theileria annulata*, *Theileria parva*, *Cowdria ruminantium*, *Anaplasma marginale*, o de ADN de leucocitos de bovino. De forma similar, el producto de PCR podría ser identificado en muestras de ADN genómico purificado a partir de 200 III de paquete celular con una parasitemia de 0.0000001%, la cual contenía un estimado de 3 eritrocitos infectados con *B. bigemina*. Mediante el uso de una prueba directa de PCR (sin extracción de ADN), el ADN de *B. bigemina* fue amplificado a partir de 20 III de eritrocitos sedimentados con una parasitemia de 0.000001 %. Con el nivel de sensibilidad analítica de la prueba de PCR/hibridación con sonda se logró identificar ganado con infección crónica subclínica de *B. bigemina* de por lo menos 11 meses de duración (3).

### **III. Identificación de animales portadores infectados con *Babesia bovis***

A partir de una secuencia de ADN previamente publicada, la cual codifica una proteína de 60 kDa presente en la superficie

de *B. bovis*, se diseñaron y sintetizaron, también, 2 pares de oligos para utilizarse en una prueba de PCR específica para *B. bovis* (14). Los oligos BoF/BoR se usaron en el ensayo de PCR para amplificar un fragmento de 350 pb a partir de ADN genómico de *B. bovis*. Los oligos BoFN/BoRN se utilizaron para preparar, vía PCR, una sonda de ADN mareada con Digoxigenina-dUTP (fragmento de 291 pb), la cual reconoce e hibrida una secuencia dentro del fragmento de ADN genómico de *B. bovis* amplificado por PCR. La amplificación del ADN de *B. bovis* obtenido a partir de cultivo *in vitro* e hibridación con la sonda no radioactiva resultó en la visualización del fragmento de 350 pb, cuando 10 pg de ADN genómico del parásito fue utilizado como molde en el ensayo. Un fragmento de igual tamaño se amplificó a partir de ADN genómico obtenido de 4 aislamientos adicionales de *B. bovis* pero no del obtenido de las especies de hemoparásitos anteriormente señalados, o de sangre de bovino normal. El producto amplificado por PCR se identificó en muestras de sangre que con tenía un estimado de 3 eritrocitos infectados con *B. bovis* (20 ml de eritrocitos sedimentados con una parasitemia de 0.000001 %). Al usarse la prueba de PCR en muestras de sangre obtenidas de bovinos experimentales, se detectó positividad en 16 de 20 animales inoculados con *B. bovis*. No se observó reacción en muestras colectadas de 20 animales inoculados con *B. bigemina* o de 20 bovinos no infectados. La prueba de PCR fue 10 suficientemente sensible para detectar bovinos con infección subclínica por *B. bovis* de hasta 4 años pos-inoculación (14).

#### **IV. Prueba de PCR múltiple para identificar ADN de *B. bigemina* y *B. bovis***

Se desarrolló un método basado en la prueba de per., para amplificar e identificar, en la misma muestra de sangre, el ADN

de los hemoparásitos que comúnmente se encuentran infectando, en forma concomitante, al ganado de las regiones tropicales (15). Para esto, se mezclaron muestras de sangre de bovino conteniendo parasitemias similares de *Babesia bigemina* y *B. bovis* para estandarizar la prueba. Se utilizaron 20  $\mu$ l de diluciones décuples de la sangre mezclada, las cuales se resuspendieron en la mezcla de reacción de PCR conteniendo cada uno de los pares de oligos específicos de especie. Los oligos del grupo I (BiIA/IB; BoF/R) diseñados para unirse específicamente al ADN de *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente, se utilizaron para amplificar los fragmentos "blanco" de ADN genómico de los hemoparásitos.

La metodología utilizada, incluía el uso de alíquotas de 20  $\mu$ l de paquete de eritrocitos, los cuales se resuspendieron en 200  $\mu$ l de solución de lisis (0.015% saponina, 35 mM NaCl, 1 mM EDTA) en un vortex (3). Posterior a una centrifugación por 10 min a 12,000 x g, la hemoglobina (un potencial inhibidor de la enzima Taq polimerasa) se eliminó y las pastillas (conteniendo fantasmas de eritrocitos) se resuspendieron en 250  $\mu$ l de la solución de reacción de PCR (10 mM Tris-HCl [pH 8.9], 50 mM KCl, 1.5 mM MgC22, 0.01% gelatina) y lavadas por centrifugación en 2 ocasiones. Las pastillas son finalmente resuspendidas en 99.5  $\mu$ l de la solución de reacción de PCR adicionado con 200  $\mu$ M de cada dNTP y 1  $\mu$ M de cada oligo del grupo I, e incubadas a 100°C por 10 min. Después de una centrifugación breve, se adicionaron 2.5 U de la enzima Taq polimerasa y los tubos de reacción de PCR se colocaron en un aparato termociclador utilizando el programa siguiente: 35 ciclos de desnaturalización del ADN molde, 1 min a 95°C (2 min durante el primer ciclo); hibridación de oligos, 1 min a 55°C; y extensión de oligos, 1.5 min a 73°C; con una extensión final a 73°C por 13 min.

Los oligos del grupo II (BiIAN/IBN; BoFN/RN) se utilizaron para preparar las sondas no radioactivas específicas, para reconocimiento de secuencias complementarias internas presentes en el ADN "blanco" amplificado con los oligos del grupo I. El análisis de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa e hibridación tipo "Southern" con las sondas no radioactivas, demostró que los fragmentos de ADN de 278 pb y 350 pb fueron específicamente amplificados a partir de las muestras de sangre que contenían eritrocitos infectados con *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente. La sensibilidad analítica de la prueba de PCR múltiple fue de 0.00001 %, y 0.00001% eritrocitos infectados con *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente. Se encontró además que la sangre colectada de bovinos inoculados previamente con *B. bovis* (4 años) y *B. bigemina* (1 año) proporcionaba una señal positiva cuando se analizaba mediante la prueba de PCR múltiple (15).

### *1. Uso de La prueba de PCR. en estudios epidemiológicos de La babesiasis bovina*

Con la elevada sensibilidad analítica y especificidad del ensayo de PCR, así como su potencial práctico para identificar infecciones simultáneas con *B. bigemina* y *B. bovis* se dispuso probar su aplicabilidad en estudios epidemiológicos. Para esto, se llevó a cabo un muestreo de bovinos pertenecientes a ranchos de zonas ganaderas previamente identificadas como regiones enzoóticas para hemoparásitos en Yucatán (10,16), así como en los estados de Tabasco y Campeche (17, 18). De 421 muestras de sangre colectadas en Yucatán y analizadas por la prueba de PCR múltiple se determinó una tasa de prevalencia de 66.7% Y 60.1 % en bovinos infectados con *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente. La prueba de PCR múltiple demostró la presencia de algunos animales con infecciones subclínicas únicas

o dobles, los cuales podrían ser identificados con la correspondiente sonda de ADN específica de especie.

A partir de 963 muestras de sangre colectadas en el estado de Tabasco y analizadas por la prueba de PCR múltiple se determinó una tasa de infección de 32.7% y de 35.9% para *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente; mientras que en el estudio epidemiológico conducido en Campeche se determinó una tasa de infección con *B. bovis* y *B. bigemina* del 53.8% en muestras de sangre colectadas de 305 bovinos asintomáticos.

## 2. *Uso de la prueba de PCR en el monitoreo de bovinos inoculados con cepas vacunales de Babesia bovis y Babesia bigemina*

Para este estudio se colectaron muestras sanguíneas de 15 toretes tipo europeo, los cuales habían sido inoculados con 1 x 10<sup>7</sup> eritrocitos infectados con *B. bovis* y *B. bigemina* derivadas de cultivo *in vitro*, 15 toretes inoculados con eritrocitos no infectados sirvieron como testigos, 21-60 días pos-inoculación (PI) los animales se introdujeron en un potrero infestado con garrapatas *Boophilus microplus* para exponerse a cepas de campo de *Babesia* spp.

Mediante la prueba de PCR y usando un formato de hibridación de ácidos nucleicos en mancha, se identificó el ADN de los parásitos vacunales de *B. bigemina* y *B. bovis* en todos los toretes inoculados en los días 4 -14 **PI**, independientemente de la presencia o ausencia de signos clínicos. En el desafío de campo, se detectó ADN de *B. bovis* en todos los animales testigo a partir del día 8 posterior a la exposición a garrapatas. Los animales inmunizados mostraron señales positivas de PCR a *B. bovis* y *B. bigemina* durante los días 9 a 18 y 15 a 22 pos-exposición, respectivamente. En esta etapa no fue posible determinar si las señales positivas de PCR fueron resultado de amplificaciones

de ADN a partir de parásitos de cultivo, parásitos transmitidos por la garrapata, o de ambas poblaciones (19).

### 3. *Aplicación de la prueba de per. múltiple en el monitoreo de bovinos movilizados a una zona endémica de babesiosis*

Para monitorear la infección por *Babesia bovis* y *B. bigemina*, en novillos introducidos a un rancho infestado con la garrapata *Boophilus micro plus* en Veracruz, ocho novillos tipo *Bos taurus*, intactos, de 18 meses de edad, (Cuatro testigos, Grupo A; Cuatro premunizados con *Babesia* spp., Grupo B) fueron inmediatamente expuestos a la garrapata vector a su llegada al rancho, y clínicamente monitoreados desde el día 6 al día 98 pos-exposición (PE) ala garrapata. El análisis de muestras de sangre por medio del ensayo de MPCR/sonda de ADN mostró que los animales del Grupo A estuvieron infectados con *B. bovis* del día 11 hasta el día 22 PE, haciéndose necesario el tratamiento babesicida entre los días 17-20 PE. Los animales del Grupo B se detectaron positivos a *B. bovis* durante los días 17-20 PE, no requirieron tratamiento y mostraron infección persistente entre los días 70 a 84 PE. El tratamiento de los animales del Grupo A atrasó la infección con *B. bigemina*, mostrándose positivos al parásito hasta los días 63-77 PE. En cambio, los animales del Grupo B (no tratados) mostraron señales de infección por *B. bigemina* durante los días 21-26 y 63-84 PE. El monitoreo de la infección por hemoparásitos con el ensayo de MPCR/sonda de ADN, proporcionó importante información epidemiológica. Así, es posible instaurar medidas preventivas a tiempo, cuando bovinos susceptibles sean movilizados a una zona de riesgo de Babesiosis bovina (20)

Estudios recientes han puesto un interés particular en el desarrollo de métodos basados en PCR para caracterizar especies y cepas de hemoparásitos (21). Se argumenta que un diagnóstico

correcto no puede lograrse sin la identificación de la especie y, en el futuro, de la cepa parasítica en particular. Por ejemplo, la capacidad para identificar cepas de *Babesia* resistentes o susceptibles a los compuestos antibabesiales; la identificación de cepas atenuadas (vacunales) o virulentas (de campo); la definición de cepas transmisibles o no transmisibles por la garrapata vector, etc., llevaría a un mejor diagnóstico y, como consecuencia, al establecimiento de una mejor estrategia de control. Se ha discutido también, que la caracterización de especies con marcadores moleculares puede ser el primer paso hacia la construcción de mejores herramientas diagnósticas (11, 13).

### **V. Avances en la investigación sobre vacunas inactivadas**

Después de varias décadas de investigación en la lucha contra la Babesiosis bovina, se han publicado distintas estrategias vacunales basadas en el uso de antígenos parasitarios obtenidos a partir de lisados de eritrocitos infectados, o de antígenos parasitarios solubles presentes en el sobrenadante de cultivos de *Babesia* spp (22). El desarrollo del cultivo *in vitro* de varias especies de *Babesia* ha permitido y facilitado el abordaje molecular para el estudio de los genes codificadores por proteínas parasitarias potencialmente protectoras. Este abordaje ha permitido no solamente abrir una vía para el uso de vacunas con base en proteínas recombinantes, sino también de estudiar el polimorfismo molecular de esos antígenos.

#### *1. Vacunas constituidas de Antígenos Parasitarios Solubles (APS)*

El termino APS agrupa los antígenos parasitarios solubles liberados ya sea naturalmente *in vivo* en el plasma de los

animales infectados, o *in vitro* en el sobrenadante de cultivo. Estos APS son obtenidos de la lisis artificial de los eritrocitos infectados posterior a la liberación de los merozoítos, o excretados-secretados por el parásito en el medio exterior durante la invasión o salida del eritrocito (22, 23, 24).

Una protección limitada a un retraso en la multiplicación de parásitos y a una disminución en signos clínicos se ha obtenido contra *B. bovis*, al inocular bovinos con un lisado de eritrocitos parasitados homogeneizados con adyuvante completo de Freund (25). Subsecuentemente, el uso de fracciones cromatográficas de APS obtenidos a partir de lisados de eritrocitos infectados, ha permitido mejorar la preparación vacunal y de obtener una protección eficaz en contra de *B. bovis* (26). Otra fracción de APS de *B. bovis*, la fracción proteica denominada DSP (27) ha sido probada y demostrada como inductora de protección. Sin embargo, este tipo de vacunas presentan el inconveniente de inducir una débil respuesta inmune de memoria (26,28), inducir una aloinmunización anti-eritrocito debido a los componentes eritrocitarios que contiene, amén del costo y la dificultad de producción de estos APS *in vivo*, lo cual hace que este procedimiento sea difícilmente explotado en gran escala.

El desarrollo del sistema de cultivo *in vitro* de *Babesia* ha permitido un considerable progreso desde el punto de vista del desarrollo de vacunas. El cultivo permite obtener y producir grandes cantidades de APS presentes en el sobrenadante del cultivo. El poder inmunoprotector de los APS obtenidos de cultivo *in vitro* ha sido probado con éxito para todas las especies de *Babesia* hasta ahora estudiadas: *Babesia bovis* (24, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36), *B. bigemina* (37, 38, 39), y *B. diver gens* (40, 41, 42, 43). Los sueros de animales protegidos, ya sea naturalmente o después de la vacunación, han permitido identificar APS potencialmente

inmunoprotectores en el sobrenadante de cultivo y con pesos moleculares comprendidos entre 20 y 225 kDa en *B. bovis* (22), entre 20 y 150 kDa en *B. bigemina* (22) y entre 17 y 90 kDa en *B. divergens* (37, 38). Además, el análisis de la respuesta humoral de los animales vacunados, independientemente de la especie de *Babesia* estudiada, demuestra la importancia en particular de APS de alrededor de 40 kDa en la inmunoprotección, sin indicar que las vacunas basadas en la sola utilización de estas moléculas permitirían obtener una inmunoprotección eficaz contra *Babesia* (22). A pesar de que las vacunas con base en APS derivados de sobrenadante de cultivo, inducen de manera sistemática una protección total de los animales vacunados en contra de un desafío homólogo, esto no necesariamente es el caso, cuando animales vacunados son desafiados con un aislado heterólogo, en los que se observa una protección variable. La diversidad antigénica entre las distintas cepas o aislados podría ser la responsable de esta protección variable. Por otro lado, en un experimento de vacunación en el cual se combinaron los APS obtenidos de cultivos de *B. bovis* y *B. bigemina*, se demostró una protección adecuada en los bovinos desafiados con las dos especies de *Babesia* (44). Estos datos sugieren entonces la idea de utilizar la combinación de los APS de dos especies distintas para aumentar la capacidad de protección de este tipo de vacuna. No obstante las bondades ofrecidas por los APS del sobrenadante de cultivo de *Babesia*, la única vacuna disponible actualmente y en forma comercial es Pirodog® (Rhone-Merieux, Lyon, Francia) preparada contra *Babesia canis* (45).

## 2. Antígenos candidatos para vacunación en forma de proteína recombinante

Los antígenos parasitarios que se han investigado, son aquellos señalados como blanco del sistema inmune y/o aquellos

implicados en funciones esenciales para la supervivencia del parásito, tales como la invasión al eritrocito o la variación antigénica, la cual es un factor esencial notable del parásito para escapar al sistema inmune del hospedero bovino. El cultivo *in vitro* de *Babesia* y las herramientas de ingeniería genética, han facilitado considerablemente el estudio de las interacciones hospedero-parásito y permitido la caracterización de tales antígenos. Cuatro grupos de antígenos han sido particularmente estudiados con el fin de probar su potencial inmunoprotector mediante la inoculación de proteínas recombinantes: los presentes en la superficie de eritrocitos infectados; los presentes en la superficie de los merozoítos; los presentes en los organelos del complejo apical; y los excretados-secretados en el sobrenadante de cultivo *in vitro*.

Los estudios de inmunofluorescencia realizados con sueros de animales inmunes sobre eritrocitos infectados con *B. bovis* o *B. bigemina*, han demostrado que la superficie de los eritrocitos parasitados era antigénicamente diferente de aquella de los eritrocitos sanos (46, 47, 48, 49, 50, 51). Entre los antígenos descritos en la superficie de los eritrocitos parasitados con *Babesia*, se encuentran aquellos que son polimórficos entre distintos aislados y los cuales estarían involucrados en el fenómeno de variación antigénica y señalados como implicados en un mecanismo de escape inmune. Este mecanismo de variación antigénica ha sido demostrado *in vivo* con la ayuda de poblaciones parasitarias clonales de *B. bovis* (52), y la variante antigénica ha sido recientemente caracterizada (53). Se trata de un doblete proteico designado como VESA 1 el cual está compuesto por una proteína de 128 kDa (VESA-1a) y de una proteína de 113 kDa (VESA-1b). VESA-1a, que se localiza sobre la fase extracelular de la membrana plasmática del eritrocito parasitado, a nivel de las protuberancias denominadas "knobs".

Hay hipótesis afirmando que VESA-1a permitiría a *B. bovis* escapar al sistema inmune del hospedero según un proceso hasta ahora desconocido, que intervendría sobre el DNA del parásito, permitiendo una variación antigénica rápida de la proteína dentro de las poblaciones clonales (53). No obstante su localización, la cual la hace un blanco de elección, VESA-1a no ha sido estudiada en ensayos de vacunación. Pero debido a su variación extrema, se trata de un blanco de elección igualmente importante para comprender los mecanismos de escape inmune.

Los antígenos de superficie del merozoíto de *Babesia*, están expuestos al sistema inmune del hospedero, durante el breve período extracelular precedente a la invasión del eritrocito por el merozoíto. Sin embargo, esta fase donde el merozoíto es libre, es suficiente para inducir una respuesta inmune ya que los sueros inmunes de bovinos infectados por *B. bovis*, reconocen los antígenos de superficie de 42 kDa (MSA1) y de 44 kDa (MSA2) (54, 55,56). Estas dos moléculas, que presentan un polimorfismo antigénico entre los distintos aislados geográficos (57) han sido reagrupadas dentro de una familia de antígenos variables de superficie del merozoíto designada VMSA. La capacidad del suero de bovino inmune para proteger contra una infección por *B. bovis*, así como la capacidad de anticuerpos provenientes de animales vacunados y dirigidos contra la proteína recombinante rMSA1 para neutralizar la infectividad de los merozoítos *in vitro*, sugieren un importante papel de la proteína MSA1 en la protección inmune contra *B. bovis* (55, 56). Sin embargo, los animales vacunados con la molécula rMSA1 a pesar de que produjeron una elevada cantidad de anticuerpos, no fueron protegidos contra un desafío con cepa homóloga virulenta (58).

Debido a sus implicaciones dentro del proceso de invasión del eritrocito por el merozoíto, y de la disolución de la vacuola

parasitófora, los antígenos del complejo apical de *Babesia* contenidos dentro de organelos como las roprías, micronemas o cuerpos esferoidales, se han considerado como candidatos para preparar una vacuna *anti-Babesia* (59, 60,61). Antígenos de las roprías que pertenecen a una familia multigénica (*rap-I*) han sido identificadas en las especies *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens* (62, 63, 64). Aún cuando la función de las proteínas RAP no se ha elucidado perfectamente, el hecho de que anticuerpos monoclonales anti-RAP-I inhiban el crecimiento de *Babesia bigemina in vitro* (65), sugiere la implicación de las moléculas RAP-I en el mecanismo de invasión y la importancia de estas moléculas a nivel inmunológico. Además, las moléculas RAP-I de *B. bovis* y de *B. bigemina* poseen epitopos de células T cooperadoras, los cuales se encuentran conservados entre cepas de las diferentes especies. Siendo altamente inmunogénicos, estos epitopos tienen la capacidad de inducir a los linfocitos T cooperadores, que, al expresar el interferón  $\gamma$ , activarán a los linfocitos B secretores de anticuerpos IgG2 opsonizantes (66). El carácter protector (en cuanto ala reducción de parasitemia) de RAP-I, aún cuando variable, a sido demostrado *in vivo*, después de una inmunización de bovinos con la proteína nativa de *B. bovis* (67) y de *B. bigemina* (59). Además, la molécula de fusión recombinante 21B4, la cual corresponde a una fracción de la proteína RAP-I de *B. bovis*, ha permitido conferir protección en los animales vacunados y posteriormente desafiados (60).

Dentro de las proteínas del complejo apical, las proteínas del cuerpo esferoidal estarían igualmente involucradas en el proceso de invasión y de la modificación de la membrana del eritrocito infectado. Se han identificado tres proteínas las cuales se localizan en los cuerpos esferoidales: una molécula de 77-80 kDa (Bb-1/Bv80) (67); una de 225 kDa (BvVAL) (67, 68), respectivamente redesignadas como SBPI y SBP2 (68); y una

de 135 kDa denominada SB3. Las moléculas SBP1 y SBP2 se encuentran asociadas con la fase citoplásmica de la membrana del eritrocito infectado durante o justamente después de la invasión (68, 69, 70). Las proteínas SBP1 y SBP2 son los principales componentes de la fracción DSP a la cual se le atribuye capacidad inmunoprotectora en los bovinos (71). Estas dos moléculas han sido clonadas y expresadas en forma de proteína de fusión. La molécula SBP1 presenta en la región N-terminal, epitopos T capaces de inducir una respuesta inmune celular (72), pero los cuales muestran polimorfismo entre los distintos aislados (70).

La capacidad para inducir una respuesta inmune protectora ha sido evaluada en tres antígenos de los denominados excretados/secretados de *B. bovis*. Así, la inoculación de una pequeña cantidad de los antígenos 12D3, 11C5 y 21B4 ha permitido la protección de animales vacunados y sometidos a un desafío heterólogo de *B. bovis*. Los tres antígenos han sido clonados y expresados en forma de proteínas de fusión. Dos de las proteínas de fusión utilizadas en combinación, la GST12D3 y la GST-11C5, han conferido una protección en bovinos tan buena como la conferida por la vacuna comercial preparada a partir de parásitos atenuados (60). Sin embargo, los resultados de investigación utilizando como vacuna el antígeno 12D3, muestran que la respuesta inmune inducida presenta variaciones significativas entre los animales (73). No obstante, estudios de hibridación de ácidos nucleicos o de serología con anticuerpos anti-12D3, han demostrado, a la vez en secuencia nucleotídica y en presencia de los epitopos de la proteína 12D3, que la molécula se encuentra conservada entre distintos aislados de *B. bovis* y en otras especies de *Babesia* tales como *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. equi* y *B. canis* (60).

A pesar de los grandes avances realizados en la última década, especialmente en lo que respecta a la caracterización inmunobiológica molecular de los antígenos candidatos a vacuna brevemente mencionados en esta revisión, a la fecha no se ha producido en forma comercial ningún biológico contra la Babesiosis bovina, el cual posea características adecuadas de eficacia, potencia, seguridad y costo. Permanece el reto para los investigadores de involucrarse más profundamente en el descubrimiento de los antígenos esenciales para el desarrollo de una vacuna ideal.

### Referencias

1. **Ristic, M.:** Babesiosis. En: *Diseases of Cattle in the Tropics*. Martinus Nihhoff Publishers. Ristic, M., McIntyre, I. (eds.) The Hague, The Netherlands. pp. 443-468, 1981.
2. **Álvarez Martínez, A., Rojas Martínez, C.:** Hematología diagnóstica. En: *Diagnóstico de helmintos y hemoparásitos de rumiantes*. Campos R. R. Y Bautista, G. R. (eds.). Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria. pp. 145-158, 1989.
3. **Figuroa, J.V., Chieves, L.P., Johnson, G.S. and Buening, G.M.:** Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2576-2582, 1992.
4. **Buening, G.M.:** Diagnosis of babesiosis: Past, present and future. *Memorias Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten*. Octubre 911, Oaxtepec, Mor., pp. 180-89, 1991.

5. **Figueroa, J.V., Buening, G.M.:** Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 75: 75-92,1995.
6. **Buening, G.M., Figueroa, J.V.:** Development and application of DNA probe and PCR diagnostic methods in bovine babesiosis. In: *Use of applicable biotechnological methods for diagnosing haemoparasites.* Uilenberg, G., Permin, A., & Hansen, J.W. (eds.) Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, 1994. Proceedings of the Expert Consultation Merida, Mexico, 4-6 October 1993. pp. 38-45, 1994.
7. **Gillespie, D.:** The magic and challenge of DNA probes as diagnostic reagents. *Vet. Microbiol.* 24: 217-233,1990.
8. **Paul, S. P.:** Applications of nucleic acid probes in veterinary infectious diseases. *Vet. Microbiol.* 24: 409-417, 1990.
9. **Wilson, S. M.:** Nucleic acid techniques and the detection of parasitic diseases. *Parasitol. Today* 7: 255-259, 1991.
10. **Ramos, J .A., Alvarez, J .A., Figueroa, J. V., Solis, J., Rodriguez, R.I., Hernandez, R., Buening, G.M. and Vega, C.A.:** Evaluation of the use of a *Babesia bigemina* DNA probe in an epidemiological survey. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87: S11, 213-217, 1992.
11. **Comes, A. M., Humbert, A.M., Cabaret, J., Élard, L. :** Using molecular tools for diagnosis in veterinary parasitology. *Vet. Res.* 27: 333-342, 1996.
12. **Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Hisuchi, R., Horn, G.T., Mullis K.B. & Ehrlich, H.A.:** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988.

13. **Pfeffer, M., Wiedmann, M., Batt, C. A.:** Applications of DNA amplification techniques in veterinary diagnostics. *Vet. Res. Comm.* 19: 375-407, 1995.
14. **Figueroa, J.V., Chieves, L.P., Johnson, G.S., Goff, W. L. and Buening, G.M.:** Polymerase chain reaction-based diagnostic assay to detect cattle chronically infected with *Babesia bovis*. *Rev. LatAmer. Microbiol.* 36: 47-55, 1994.
15. **Figueroa, J.V., Chieves, L.P., Johnson, G.S. and Buening, G.M.:** Multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA. *Vet. Parasitol.* 50: 69-81, 1993.
16. **Figueroa, J.V., Alvarez, J.A., Ramos, J.A., Vega, C.A. and Buening, G.M.:** Use of a multiplex PCR assay to diagnose hemoparasite-infected bovine carriers in Mexico. *Reveu d'Elevage et de Medicine Vétérinaire des Pays tropicaux.* 46 (1-2): 71-75, 1993.
17. **Álvarez J .A., Figueroa, J. V., Ramos, J .A., Vega, CA., Buening, G.M.:** Epidemiological survey of cattle babesiosis in Tabasco México. *Resúmenes "74th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease"*. Chicago, Illinois. Noviembre, 8-9, pp. 75, 1993.
18. **Álvarez, J.A., Ramos, J .A., Figueroa, J. V., Mosqueda, J J., Vega, CA., Buening, G.M.:** Descriptive epidemiology of anaplasmosis and babesiosis in cattle farms from Campeche México. *Resúmenes "75th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease"*. Chicago, Ill. Nov., 14-15, pp. 56, 1994.
19. **Figueroa, J.V., Álvarez, J.A., Rojas, E.E., Ramos, J.A., Mosqueda, J.J., Cantó, G.J., Vega, CA., Buening, G.M.:** Uso

del ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para monitorear la infección por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en bovinos involucrados en un experimento de inmunización. Memorias Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. *Veterinaria México* 26 (2): 31, 1995.

20. **Figuroa, J.V., Alvarez, J.A., Ramos, J.A., Rojas, E.E., Santiago, C., Vega, C.A., Buening, G.M.:** Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases. *Ann. New York Acad. Sci.* 849: 1-10, 1998.
21. **Lew, A. E., Dalrymple, B. P., Jeston, P. J., Bock, R. E.:** PCR methods for the discrimination of *Babesia bovis* isolates. *Vet. Parasitol.* 71: 223-23, 1997.
22. **Schettters, T.P., Montenegro-James, S.:** Vaccines against Babesiosis using soluble parasite antigen. *Parasitol. Today.* 11: 456-462, 1995.
23. **James, M.A., Levy, M.G., Ristic, M.:** Isolation and partial characterization of culture-derived soluble *Babesia bovis* antigens. *Infect. Immun.* 31: 358-36, 1981.
24. **Ristic, M., Kakoma, I.:** Exoantigens of *Babesia*. En: *Babesiosis of domestic animals and man*. Ristic M (ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 131-141, 1988.
25. **Mahoney, D.F.:** Bovine Babesiosis: the immunization of cattle with killed *Babesia argentina*. *Exp. Parasitol.* 20: 125-129, 1967.
26. **Mahoney, D.F., Wright, I. G., Goodger, B.V.:** Bovine Babesiosis: the immunization of cattle with fractions of erythrocytes infected

with *Babesia bovis* (syn *B. argentina*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2: 145-156, 1981.

27. **Goodger, B.V., Waltisbuhl, D.J., Commins, M.A., Wright, I.G.:** *Babesia bovis*: dextran sulphate as an adjuvant for and precipitant of protective immunogens. *Int. J. Parasitol.* 22: 465-469, 1992 a.
28. **Ristic, M., Montenegro-James, S.:** Immunization against *Babesia*. En: *Babesiosis of domestic animals and man*. Ristic, M. (ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 163-189, 1988.
29. **Smith, R.D., Carpenter, J., Cabrera, A., Gravely, S.M., Erp, E.E., Osorno, M., Ristic, M.:** Bovine Babesiosis: vaccination against tick-borne challenge exposure with culture-derived *Babesia bovis* immunogens. *Am. J. Vet. Res.* 40: 1678-1682, 1979.
30. **Kuttler, K.L., Levy, M.G., James, M.A., Ristic, M.:** Efficacy of a nonviable culture-derived *Babesia bovis* vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 43: 281-284, 1982.
31. **Kuttler, K.L., Levy, M.G., Ristic, M.:** Cell culture-derived *Babesia bovis* vaccine: sequential challenge exposure of protective immunity during a 6-month postvaccination period. *Am. J. Vet. Res.* 44: 1456-1459, 1983.
32. **Timms, P., Dalgliesh, R.J., Barry, D.N., Dimmock, C.K., Rodwell, B.J.:** *Babesia bovis*: comparison of culture-derived parasites, nonliving antigen and conventional vaccine in the protection of cattle against heterologous challenge. *Aust. Vet.* 1. 60: 75-77, 1983.
33. **Timms, P., Stewart, N.P., Rodwell, B.J., Barry, D.N.:** Immune responses of cattle following vaccination with living and nonliving *Babesia bovis* antigens. *Vet. Parasitol.* 16: 243-251, 1984.

34. **Montenegro-James, S., Ristic, M., Toro Benitez, M., Leon, E., López, R.:** Heterologous strain immunity in bovine Babesiosis using a culture-derived soluble *Babesia bovis* immunogen. *Vet. Parasitol.* 18: 321-337, 1985.
35. **Jorgensen, W.K., Bock, R.E., Kingston, T.G., de Vos, A.J., Waldron, S.J.:** Assessment of tetracycline and *Babesia* culture supernatants as prophylactics for moderating reactions in cattle to live *Babesia* and *Anaplasma* vaccines. *Aust. Vet. J.* 70: 35-36, 1993.
36. **Patarroyo, J.H., Prates, A.A., Tavares, C.A., Mafra, C.L., Vargas, M.I.:** Exoantigens of an attenuated strain of *Babesia bovis* used as a vaccine against bovine Babesiosis. *Vet. Parasitol.* 59: 189-199, 1995.
37. **Montenegro-James, S., Toro Benitez, M., Leon, E., Lopez, R., Ristic, M.:** Bovine Babesiosis: induction of protective immunity with culture-derived *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* immunogens. *Parasitol. Res.* 74: 142-150, 1987.
38. **Echaide, I.E., de Echaide, S.T., Guglielmone, A.A.:** Live and soluble antigens for cattle protection to *Babesia bigemina*. *Vet. Parasitol.* 51: 35-40, 1993.
39. **Beniwal, R.P., Nichani, A.K., Rakha, N.K., Sharma, R.D., Sarup, S.:** An immunization trial with *in vitro* produced *Babesia bigemina* exoantigens. *Trop. Anim. Health. Prod.* 29: 124S-126S, 1997.
40. **Gorenflot, A., Precigout, E., Bissuel, G., Lecointre, O., Brasseur, P., Vidor, E., L'Hostis, M., Schrevel, J.:** Identification of major *Babesia divergens* polypeptides that induce protection against homologous challenge in gerbils. *Infect. Immun.* 58: 40764082, 1990.

41. **Precigout, E., Gorenflot, A., Valentin, A., Bissuel, G., Carey, B., Brasseur, P., Moreau, Y., Sehrevel, J.:** Analysis of immune responses of different hosts to *Babesia divergens* isolates from different geographic areas and capacity of culture-derived exoantigens to induce efficient cross-protection. *Infect. Immun.* 59:2799-2805,1990.
42. **Carey, B., Precigout, E., Valentin, A., Gorenflot, A., Sehrevel, J.:** A 37-kilodalton glycoprotein of *Babesia divergens* is a major component of a protective fraction containing low-molecular-mass culture-derived exoantigens. *Infect. Immun.* 63: 811-817, 1995.
43. **Grande, N., Precigout, E., Camillieri, S., Carey, B., Moubri, K., Gorenflot, A.:** Comparison between aseric and seric culture-derived exoantigens of *Babesia divergens* in their ability to induce immunoprotection in gerbils. *Parasitol. Intl.* 47: 262279, 1998.
44. **Montenegro-James, S., Toro, M., Leon, E., Guillen, A. T.:** Field evaluation of an exoantigen-containing *Babesia* vaccine in Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87: 283-288,1992.
45. **Moreau, Y., Laurent, N.:** Antibabesial vaccination using antigens from cell cultures: industrial requirements. En: *Malaria and Babesiosis.* Ristic M, Ambroise-Thomas P, Kreier IP (eds.), Martinus Nijhoff, Publishers, Boston. pp.129-149, 1984.
46. **Curnow, J.A.:** *In vitro* agglutination of bovine erythrocytes infected with *Babesia argentina.* *Nature.* 217: 207, 1968.
47. **Ross, J.P., Lohr, K.F.:** Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. *Res. Vet. Sci.* 9: 557-562,1968.

48. **Curnow, J.A.:** Studies on antigenic changes and strain differences in *Babesia argentina* infections. *Aust. Vet. J.* 49: 279-283, 1973.
49. **Curnow, J.A.:** The use of a slide agglutination test to demonstrate antigenic differences between *Babesia bigemina* parasites. *Aust. Vet. J.* 49: 290-293, 1973.
50. **Ahrens, K.P., Allred, D.R.:** Polypeptides reactive with antibodies eluted from the surface of *Babesia bovis-infected* erythrocytes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87: 21-26, 1992.
51. **Allred, D.R., Hines, S.A., Ahrens, K.P.:** Isolate-specific parasites antigens of *Babesia bovis-infected* erythrocyte surface. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60: 121-132, 1993.
52. **Allred, D.R., Cinque, R.M., Lane, T.J., Ahrens, K.P.:** Antigenic variation of parasite-derived antigens on the surface of *Babesia bovis-infected* erythrocyte surface. *Infect. Immun.* 62: 91-98, 1994.
53. **O'connor, R.M., Lane, T.J., Stroup, S.E., Allred, D.R.:** Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA 1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89: 259-270, 1997.
54. **Goff, W.L., Davis, W.C., Palmer, G.H., McElwain, T.F., Johnson, W.C., Bailey, J.F., McGuire, T.C.:** Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine serum and monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 56: 2363-2368, 1988.
55. **Hines, S.A., McElwain, T.F., Buening, G.M., Palmer, G.H.:** Molecular characterization of *Babesia bovis* merozoite surface proteins bearing epitopes immunodominant in protected cattle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37: 1-9, 1989.

56. **Hines, S.A., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., McGuire, T.C., McElwain, T.F.:** Neutralization- sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 55: 85-94, 1992.
57. **Palmer, G.H., McElwain, T.F., Perryman, L.E., Davis, W.C., Reduker, D.R., Jasmer, J.P., Shkap, V., Pipano, E., Goff, W.L., McGuire, T.C.:** Strain variation of *Babesia bovis* merozoite surface-exposed epitopes. *Infect. Immun.* 59: 3340-3344, 1991.
58. **Hines, S.A., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., Goff, W.L., McElwain, T.F.:** Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-I. *Infect. Immun.* 63: 349-352, 1995.
59. **McElwain, T.F., Perryman, L.E., Musoke, A.J., McGuire, T.C.:** Molecular characterization and immunogenicity of neutralization sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47: 213-222, 1991.
60. **Wright, I.G., Casu, R., Commins, M.A., Dalrymple, B.P., Gale, K.R., Goodger, B.V., Riddles, P.W., Waltisbuhl, D.J., Abetz, I., Berrie, D.A. et al.:** The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Vet. Parasitol.* 44: 3-13, 1992.
61. **Ushe, T.C., Palmer, G.H., Sotomayor, L., Figueroa, J.V., Buening, G.M., Perryman, L.E., McElwain, T.F.:** Antibody response to a *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein 1 surface-exposed and neutralization-sensitive epitope in immune cattle. *Infect. Immun.* 62: 5698-5701, 1994.
62. **Suarez, C.E., McElwain, T.F., Stephens, E.B., Mishra, V.S., Palmer, G.H.:** Sequence conservation among merozoite apical

complex proteins of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and other Apicomplexa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49: 329-332, 1991.

63. **Dalrymple, B.P., Casu, R.E., Peters, J.M., Dimmock, C.M., Gale, K.R., Boese, R., Wright, I.G.:** Characterization of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis*, and *Babesia canis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57: 181-192, 1993.
64. **Skuce, P.J., Mallon, T.R., Taylor, S.M.:** Molecular cloning of a putative rhoptry associated protein homologue from *Babesia divergens*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77: 99-102, 1996.
65. **Figueroa, J.V., Buening, G.M.:** *In vitro* inhibition of multiplication of *Babesia bigemina* by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 29: 997-1003, 1991.
66. **Brown, W.c., McElwain, T.F., Hotzel, I., Ruef, B.J., Rice-Ficht, A.C., Stich, R.W., Suárez, C.E., Estes, D.M., Palmer, G.H.:** Immunodominant T-cell antigens and epitopes of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92: 473-482, 1998.
67. **Dalrymple, B.P.:** Molecular variation and diversity in candidate vaccine antigens from *Babesia*. *Acta trap.* 53: 227-238, 1993.
68. **Jasmer, D.P., Reduker, D.W., Perryman, L.E., McGuire, T.C.:**  
A *Babesia bovis* 225-kilodalton protein located on the cytoplasmic side of the erythrocyte membrane has sequence similarity with a region of glycogen phosphorylase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52: 263-270, 1991.
69. **Dowling, S.C., Perryman, L.E., Jasmer, D.P.:** A *Babesia bovis* 225-kilodalton spherical- body protein: localization to the

cytoplasmic face infected erythrocytes after merozoite invasion.

*Infect. Immun.* 64: 2618-2626, 1996.

70. **Hines, S.A., Palmer, G.H., Brown, W.c., McElwain, T.F., Suarez, C.E., Vidotto, O., Rice.Ficht, A.C.:** Genetic and antigenic characterization of *Babesia bovis* merozoite spherical body protein Bv-I. *Mol. Biochem. Parasitol.* 69: 149-159,1995.
71. **Goodger, B.V., Waltisbuhl, D.J., Wright, I.G., White, M.:** *Babesia bovis*: analysis of and preliminary vaccination studies with a defined infected erythrocyte membrane binding antigen. *Int. J. Parasitol.* 22: 533-535, 1992.
72. **Brown, W.c., Zhao, S., Woods, V.M., Tripp, C.A., Tetzlaff, C.L., Heussler, V.T., Dobbelaere, D.A., Rice-Ficht, A.C.:** Identification of two Th1 cell epitopes on the *Babesia bovis* encoded 77 -kilodalton merozoite protein (Bv-I) by use of truncated recombinant fusion protein. *Infect. Immun.* 61: 236-24, 1993.
73. **East, I.J., Zakrzewski, H., Gale, K.R., Leatch, G., Dimmock, C.M., Thomas, M.B., Waltisbuhl, D.J.:** Vaccination against *Babesia bovis*: T cells from protected and unprotected animals show different cytokine profiles. *Int. J. Parasitol.* 27: 1537-1545, 1997.