



PATRÍCIA MACÊDO GONÇALVES

**BABESIOSE BOVINA: PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE
ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM ANTI-
Babesia bovis E *B. bigemina* EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO
PROCESSO DE PREMUNICÃO.**

**Dissertação apresentada à Escola de
Veterinária da Universidade
Federal de Minas Gerais, como
requisito para a obtenção do grau
de Mestre em Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Medicina
Veterinária Preventiva
Orientadora: Profa. Lygia Maria
Friche Passos**

U. F. M. G. - BIBLIOTECA UNIVERSITARIA



NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

**Belo Horizonte
1996**

202-103/24
06

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

23/10/96

1043096-02

MV-00007981-8

G635b Gonçalves, Patrícia Macêdo, 1967 -

Babesiose bovina: padronização do teste de ELISA para detecção de anticorpos IgM anti-*Babesia bovis* e *B. bigemina* em animais submetidos ao processo de premunicação / Patrícia Macêdo Gonçalves. - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1996.

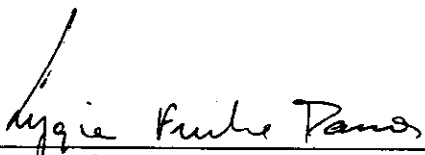
87p.: il

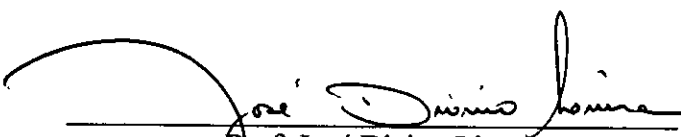
Dissertação (Mestrado)

1-Bovino - Doenças - Diagnóstico - Teses.
2- Babesiose em bovinos - Teses. 3 - Teste imunoenzimático - Teses. I. Título.

CD - 636.208.963 6

Dissertação defendida e aprovada em 23/08/1996 pela Comissão
Examinadora constituída por:


Prof. Lygia Maria Friche Passos


Prof. José Divino Lima


Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro


Prof. Rosângela Zacarias Machado



A minha mãe, que se doou por inteiro e renunciou aos seus sonhos,
para que, por diversas vezes, eu realizasse os meus...

Aos queridos Vô Mundico (in memoriam) e Vó Ignês.
Muitos foram os momentos em que não pudemos ficar juntos.
Agora, esta conquista também pertence a essas duas pessoas
maravilhosas, que com apoio e carinho, sempre ajudaram em todos
os momentos da minha vida.

Aos meus pais, irmãs e sobrinhos, que sempre me incentivaram com
ternura e alegria, diminuindo as dificuldades durante este trabalho.

Dedico

Ao Juan,

Agradeço ao Menino Jesus por ter colocado você em meu caminho.
Você que, durante todo este trabalho, me deu a mão, com ternura e
carinho, que me animou nas horas difíceis, que sorriu para mim.



AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença em todos os momentos deste trabalho; em toda vida.

Agradeço à professora Lygia Maria Friche Passos, pela orientação e capacidade demonstrada durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor José Divino Lima, com admiração, que durante estes anos foi mais que orientador e professor.

Ao professor Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, pela orientação neste trabalho e pela boa vontade durante todo o experimento.

À professora Rosângela Zacarias Machado, pelo carinho que me recebeu em Jabuticabal e pela estimável sabedoria que proporcionou ao trabalho.

Ao professor José Oswaldo Costa, pelas sugestões e carinho durante todos estes anos de convivência.

Ao professor Ivan Sampaio pela eficiente orientação nas análises estatísticas e boa vontade durante esta etapa do trabalho.

Ao professor Hélio Martins de Araújo Costa, que nos ensina a todo momento, o que é ser um mestre.

Ao doutorando, Jenner Karlisson, pela boa vontade e sugestões apresentadas.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, em especial, Romário Cerqueira Leite, Celina Maria Modena e Paulo Roberto de Oliveira, pelos ensinamentos durante o curso de mestrado.

Às amigas Célia, Denise, Marília e Paula. "Há pessoas que passam pela nossa vida e deixam um pouco de si. Há outros que passam, levam um pouco de nós. Há também aqueles que não passam, simplesmente ficam."

Aos amigos Adriana, Amália, Cacá, Cláudia, Cris, Eliana, Eliane, Fernando Brêtas, Glorinha, Hudson, Ilka, Júnia e Geraldo, Kity, Liliane, Luciene, Marcelo Resende, Narcisa, pelo carinho e amizade.

Ao Marcelo Reis (in memoriam). "A lembrança de sua presença, o som da sua voz sopram suaves na memória, num murmúrio triste de lamento e saudade." Você foi e sempre será uma pessoa especial para todos nós; você nos demonstrou exemplo de luta, vida.

Aos colegas de mestrado Brasilina, Cláudio, Clóvis, Cristiano, Edísio e Márcia, Josiane, Jorge, Marcelo, Patrícia Anderegg, Patrícia Gomes, Sandra, Santa Rosa, Silvana, Zenón pela agradável convivência.

À Nádia pela paciência, amizade e grande ajuda dada a todos nós durante o curso.

Aos professores Antônio Pinho Marques Jr., coordenador dos cursos de Pós-Graduação, e Israel José da Silva, chefe do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pelas constantes ajudas prestadas.

Aos funcionários do departamento André, Bete, Cleuza, Luciana, Jorge, D. Sônia e Ricardo pela cooperação e amizade.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida, durante o curso de mestrado.

Aos funcionários da biblioteca da Escola de Veterinária da UFMG e do xerox, que sempre nos prestaram serviços de qualidade e com boa vontade.

Às funcionárias do Colegiado de Pós graduação da Escola de Veterinária da UFMG, Cláudia e Nilda, pela boa vontade, com que nos ajudavam, sempre que necessário.

E, a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.



“Quando se viaja em direção a um objetivo é muito importante prestar atenção no caminho. O caminho é que sempre nos ensina a melhor maneira de chegar, e nos enriquece, enquanto o estamos cruzando.”

Paulo Coelho

SUMÁRIO

	PAG
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE GRÁFICOS	18
RESUMO	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Babesiose bovina no Brasil	23
2.2 Métodos de diagnóstico	27
2.3 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA)	29
2.4 Resposta imune humoral pelo ELISA	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Local de realização do experimento	35
3.2 Animais experimentais	35
3.3 Infecções experimentais	35
3.4 Banco de soros	36
3.5 Teste de ELISA	38
3.5.1 Preparação antigênica bruta de <i>Babesia bovis</i>	38
3.5.2 Preparação antigênica bruta de <i>B. bigemina</i>	39
3.5.3 Descrição do teste de ELISA	40
3.5.4 Padronização do teste de ELISA	41
3.6 Análise estatística	42

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Padronização do teste de ELISA para <i>B. bovis</i>	44
4.2	Padronização do teste de ELISA para <i>B. bigemina</i>	52
4.3	Perfil de resposta imune humoral (IgM) de animais submetidos ao processo de premunição	58
4.3.1	Resposta imune humoral para <i>B. bovis</i>	60
4.3.1.1	Animais infestados com larvas de <i>B. microplus</i>	60
4.3.1.2	Animais inoculados com <i>Babesia</i> spp	61
4.3.1.3	Animais inoculados com <i>B. bovis</i>	61
4.3.2	Resposta imune humoral para <i>B. bigemina</i>	62
4.3.2.1	Animais infestados com larvas de <i>B. microplus</i>	62
4.3.2.2	Animais inoculados com <i>Babesia</i> spp	62
4.4	Análise estatística	64
4.4.1	Grupos testados com preparação antigênica de <i>B. bovis</i>	64
4.4.2	Grupos testados com preparação antigênica de <i>B. bigemina</i>	65
5	CONCLUSÃO	67
	SUMMARY	69
6	APÊNDICE	71
6.1	Reagentes e soluções	71
6.2	Resultados de ELISA	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE TABELAS

	PAG
TABELA 1	Valores de absorbância de soros positivo e negativo, em diluições seriadas, frente ao antígeno de <i>B. bovis</i> , utilizando-se caseína 5% e soro equino 5%, como agentes bloqueadores. 45
TABELA 2	Sensibilidade e especificidade do teste de ELISA usando o antígeno de <i>B. bovis</i> . 47
TABELA 3	Absorbância de amostras de soros de animais antes e após a primeira inoculação, usando o antígeno de <i>B. bovis</i> . 48
TABELA 4	Valores de absorbância de soros positivo e negativo, em diluições seriadas, frente ao antígeno de <i>B. bigemina</i> , utilizando-se caseína 5% e soro equino 5%, como agentes bloqueadores. 53
TABELA 5	Sensibilidade e especificidade do teste de ELISA usando o antígeno <i>B. bigemina</i> . 55
TABELA 6	Absorbância de amostras de soros de animais antes e após a primeira inoculação, usando o antígeno de <i>B. bigemina</i> . 57

LISTA DE GRÁFICOS

	PAG
GRÁFICO 1	Medianas dos valores de absorbância $^{-1}$ de IgM para <i>B. bovis</i> , de animais da raça Holandesa, submetidos ao processo de premunicação.
GRÁFICO 2	Distribuição da frequência de valores de absorbância de IgM para <i>B. bovis</i> de animais submetidos ao processo de premunicação, da 5ª à 10ª semana após inoculação inicial.
GRÁFICO 3	Medianas dos valores de absorbância $^{-1}$ de IgM para <i>B. bigemina</i> , de animais da raça Holandesa, submetidos ao processo de premunicação.
GRÁFICO 4	Distribuição da frequência de valores de absorbância de IgM para <i>B. bigemina</i> de animais submetidos ao processo de premunicação, da 5ª à 10ª semana após inoculação inicial.



RESUMO

Testes de ELISA indireto (sistema biotina-avidina), utilizando-se preparações antigênicas brutas, foram padronizados para a detecção de anticorpos IgM anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em animais submetidos à premunicação. Diluições ótimas dos antígenos, soros referência (positivo e negativo) e conjugado foram determinadas através de titulações seriadas. Amostras de soros de bovinos importados de áreas livres de carrapatos, foram colhidas antes e durante o processo de premunicação e submetidas aos testes de ELISA. Os valores discriminantes (0,223 e 0,124 para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente) foram calculados pela média de absorbância dos soros negativos acrescida de dois desvios-padrão. Os primeiros anticorpos IgM específicos anti-*B. bovis* foram detectados onze dias após inoculação inicial (P.I.), para os animais infestados com larvas de *B. microplus* e 19 dias P.I. para os animais inoculados com sangue. Foi observado declínio progressivo dos valores de absorbância 33 dias P.I., mas todos os animais permaneceram positivos até o final do experimento (124 dias). Para os anticorpos IgM anti-*B. bigemina*, foi observado comportamento semelhante da resposta imune, variando na detecção dos primeiros anticorpos nos animais infestados com larvas de *B. microplus*, que ocorreu 14 dias P.I.

Palavras-chave: *Babesia bovis*, *B. bigemina*, ELISA, IgM, premunicação

1 INTRODUÇÃO

A babesiose é uma doença infecciosa causada por protozoários intraeritrocitários do gênero *Babesia*. Encontram-se descritas 111 espécies, das quais 22 são consideradas responsáveis pela doença em mamíferos domésticos (Levine, 1988), sendo que destas, sete são incriminadas como agentes etiológicos da babesiose bovina (Kuttler, 1988). As duas espécies de maior importância econômica para bovinos em regiões tropicais e subtropicais são a *Babesia bovis* (Babes, 1888) e *B. bigemina* (Smith & Kilborne, 1893). A população de bovinos no mundo é cerca de 1,2 bilhões (FAO, 1995) e destes 75% estão em áreas endêmicas do vetor, *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), e assim da doença (Kuttler, 1988; Böse, 1995).

As duas espécies do protozoário, encontradas no Brasil, são a *B. bovis* e *B. bigemina*, que são, em condições naturais, transmitidas pelo *B. microplus*. A doença é freqüentemente encontrada em todas as áreas infestadas pelo vetor (Madruga et al., 1983). Em Minas Gerais é elevada a prevalência de animais com anticorpos anti-*Babesia* (Patarroyo et al., 1987).

Esta enfermidade, quando não devidamente controlada, interfere no desenvolvimento dos animais, reduzindo o crescimento, produção de carne e leite, podendo ocasionar aborto e infertilidade temporária de machos e fêmeas (McCosker, 1981). Nos casos mais graves, principalmente em animais recém-importados de regiões livres, são responsáveis por elevada mortalidade (Kuttler, 1988). Entretanto, estes efeitos são minimizados nas áreas de estabilidade enzoótica, em decorrência da exposição precoce dos animais ao agente, logo após

o nascimento, e conseqüente desenvolvimento de imunidade (Corrier et al., 1978).

O diagnóstico parasitológico da babesiose tem sido realizado pela pesquisa do agente em esfregaços sanguíneos. O desenvolvimento e padronização de um teste sorológico para a doença aguda é altamente desejável, objetivando avaliar o risco da doença em rebanho e a avaliação de resposta imune após uma medida de imunização para a babesiose bovina.

O "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA) é considerado, atualmente, importante ferramenta no diagnóstico das doenças infecciosas. Este teste tem mostrado boa especificidade e sensibilidade, quando comparado com outros testes de diagnóstico. Outras vantagens apontadas no uso do ELISA é que ele pode ser automatizado, tornando sua execução mais rápida e econômica, o que possibilita o exame de um grande número de amostras.

O presente trabalho teve como objetivos padronizar um teste de ELISA indireto para detecção de anticorpos IgM anti-*B. bovis* e *B. bigemina* e avaliar a resposta imune de IgM em animais submetidos ao processo de premunicação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Babesiose bovina no Brasil

O primeiro relato da babesiose bovina no Brasil ocorreu por volta de 1893, quando 98% dos animais importados da Europa e da Argentina morreram devido a uma doença até então desconhecida. Em 1901, Farjado observou microscopicamente protozoários em esfregaços sanguíneos de bovinos recentemente importados. Desde então, uma grande variedade de fatores envolvidos na babesiose bovina foram pesquisados. Estes incluem estudos sobre transmissão, epidemiologia, patogenia, imunologia, diagnóstico, tratamento e controle da doença.

No *B. microplus*, há transmissão transovariana das *B. bigemina* e *B. bovis*. Esta última espécie é transmitida durante o período de alimentação larval, enquanto que a *B. bigemina* é transmitida durante os estágios ninfal e adulto (Mahoney & Mirre, 1979; Dalgliesh & Steward, 1982). O período de incubação, após a infestação pelo carrapato, é geralmente de oito a 16 dias em infecções por *B. bovis*, e em *B. bigemina* aparece poucos dias após a outra espécie.

Por outro lado, a *B. bovis* é o agente da babesiose bovina de maior importância patológica (Uilenberg, 1995) nas condições de campo e econômica do país, pois pode culminar em morte dos animais rapidamente. A ocorrência de babesiose cerebral por *B. bovis* foi registrada no Rio Grande do Sul (Kessler et al., 1980; 1983) e em Minas Gerais (Patarroyo et al., 1982).

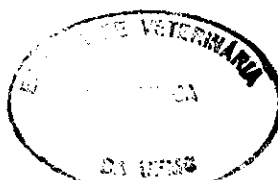
A babesiose bovina, no Brasil, é mais frequentemente encontrada em bezerros. Estudo da doença, no Mato Grosso do Sul, demonstrou sua presença em bezerros com idade inferior à quatro meses de idade (Madruga et al., 1986). Na Austrália, verificou-se nos vários trabalhos sobre endemia da babesiose, situação adversa a esta. Os bezerros tornaram-se infectados antes dos nove meses de idade (Mahoney & Ross, 1972), estabelecendo um estado de equilíbrio entre imunidade e doença.

Em estudo de prevalência da babesiose, realizado na Zona da Mata de Minas Gerais, observaram-se diferentes situações epidemiológicas, considerando-se a área como de instabilidade enzoótica (Patarroyo et al., 1987).

Levantamento sorológico, realizado na região do cerrado no Mato Grosso do Sul, demonstrou taxas de prevalência médias de 19,0 e 12,9% para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. Estes resultados foram considerados baixos, quando comparados com pesquisa realizada em Minas Gerais, sugerindo a região como uma área de instabilidade enzoótica (Madruga et al., 1983).

Outro estudo, realizado no Mato Grosso do Sul, demonstrou prevalência de 26,4% de casos clínicos da babesiose, juntamente com a anaplasmoze, em bezerros de um a quatro meses de idade, com menor incidência em bovinos adultos (Madruga et al., 1986). Situação esta, devida à queda da imunidade passiva a partir do 28º dia após o nascimento (Madruga et al., 1984).

Alguns aspectos sobre a epidemiologia da *B. bovis* foram estudados em Santana do Livramento (RS) pela análise de prática de manejo em 101 rebanhos e pela pesquisa de anticorpos em bovinos de aproximadamente onze meses de idade. A soroprevalência, através do ELISA, variou entre 15 e 80% e a área foi considerada de risco para esta babesiose (zona de instabilidade enzoótica). Alta prevalência de anticorpos anti-*B. bovis* foram encontradas em



rebanhos *Bos taurus* (53%) e em rebanhos *Bos taurus* X *Bos indicus* (51%). Os autores justificam a necessidade do uso de vacinas vivas contra *B. bovis* para prevenir perdas econômicas naquela região (Martins et al., 1994).

Para se determinar o perfil de estabilidade/instabilidade de uma região, deve-se avaliar os fatores inerentes ao animal, como por exemplo, a queda de imunidade devido à redução do número de carrapatos, e os vários fatores que podem estar interagindo no ambiente. Dentre eles raça, idade, variações climáticas, estresse, manejo e tipo de pastagens (Alonso et al., 1992).

No Brasil, não existem trabalhos epizootiológicos que permitam um mapeamento das áreas livres, das áreas de estabilidade e áreas de instabilidade enzoótica para a babesiose bovina. As publicações disponíveis na literatura nacional demonstram, em quase toda sua totalidade, regiões de instabilidade enzoótica. Entretanto, segundo Kessler et al., 1983, o território brasileiro é, em grande parte, uma área de estabilidade enzoótica para a doença, onde os bovinos encontram-se naturalmente imunizados contra *Babesia* spp.

Esta enfermidade frequentemente ocorre devido às práticas de manejos instituídas no sistema de criação, como o uso de instalações "Free Stall", determinados tipos de bezerreiros e principalmente em importações de animais de áreas livres de hemoparasitos, para melhoramento genético bovino (Lima, 1991), pois esses bovinos são geralmente *Bos taurus*, sendo assim mais susceptíveis aos carrapatos e assim à doença. Nestes casos, a premunicação constitui um método de controle muito utilizado, com a finalidade de promover o desenvolvimento de imunidade contra as hemoparasitoses (Brasil, 1982; Lima, 1991; Nogueira et al., 1991). O processo se baseia na inoculação de sangue parasitado por hemoparasitos de animal portador em animais susceptíveis e seu subsequente tratamento usando drogas específicas. Esta medida profilática produz um razoável nível de proteção à infecção, mesmo que ocorram variações

entre amostras das espécies dos hemoparasitos, e em condições tropicais é provavelmente o procedimento de imunização mais eficaz. Apesar da premunicação apresentar riscos de disseminação de outras doenças e alto custo, estes são mínimos, se comparados àqueles ocasionados pela introdução de bovinos susceptíveis e não protegidos em áreas enzoóticas (Lima, 1991).

Também vale ressaltar que vacinas vivas e/ou atenuadas contra *B. bovis* e *B. bigemina* estão sendo utilizadas na imunização de animais importados. Inúmeros experimentos estão sendo conduzidos objetivando caracterizar os antígenos de babesias específicos a serem utilizados no diagnóstico e/ou vacinas.

Vários métodos de vacinação têm sido desenvolvidos e estudados em condições de laboratório e de campo, como medidas imunoproláticas contra a babesiose bovina (Patarroyo, 1990; Kessler et al., 1991; Machado, 1991)

A imunização ideal deve ser capaz de: prevenir doença clínica em condições de campo; proteger contra todas as cepas do parasito; induzir proteção por longo tempo; não possuir antígenos contaminantes ou infecciosos; ser utilizável em larga escala e ser de baixo custo; ser segura e de fácil administração (Mahoney, 1981).

Um estudo iniciado em 1987 por Kessler e colaboradores, quando amostras de campo de cada parasito foram isoladas por infestação de carrapatos em bezerros, demonstrou existência de diversidade antigênica.

Trabalhos sobre caracterização, identificação e purificação de exoantígenos obtidos de culturas "in vitro" de *B. bovis* e, vacinação experimental de bovinos foram desenvolvidos por Patarroyo, 1990. Foram utilizadas diferentes metodologias, que permitiram semipurificar três frações polipeptídicas em uma amostra do parasito proveniente da Zona da Mata de Minas Gerais.

Kessler et al. (1991) isolaram amostras puras de *B. bovis* e *B. bigemina* em Campo Grande, MS. Estas amostras foram atenuadas utilizando-se o método australiano, com modificações. Nos experimentos realizados no campo, as amostras apresentaram baixa virulência e proteção em 97% dos animais vacinados, frente ao desafio homólogo, mediante infecção através do carrapato.

Machado, 1991 caracterizou bioquimicamente antígenos de *B. bovis* e *B. bigemina*, verificando-se várias bandas protéicas com peso molecular entre 200 e 21 KDa nos antígenos de babesias solúveis.

2.2 Métodos de Diagnóstico

O diagnóstico parasitológico da babesiose tem sido realizado pela visualização de parasitos intraeritrocitários em esfregaços sanguíneos corados pelo método de Giemsa. Este é o método de escolha para detecção de parasitos na fase aguda da babesiose. A técnica é utilizada como rotina, mas quando um grande número de exames tem que ser realizado, é um trabalho difícil e demorado (Weiland & Reiter, 1988; Böse et al., 1995). Outra limitação deste método decorre do fato da *B. bovis* apresentar tropismo pela circulação capilar e, apesar de, na fase aguda da doença, a parasitemia na circulação venosa ser baixa, dificultando a visualização do agente; consequentemente, exames negativos não significam ausência de infecção (Weiland & Reiter, 1988). Portanto, o desenvolvimento de um teste rápido e simples para o diagnóstico da babesiose aguda é necessário (Böse, 1995).

Os animais que se recuperam da fase aguda da doença tornaram-se portadores crônicos, e os níveis de anticorpos persistem por longos períodos (Wright, 1990). Desta forma, testes sorológicos têm sido utilizados na detecção de anticorpos IgG em animais portadores para se avaliar o estado imunológico de rebanhos e em estudos epidemiológicos para identificação de áreas de instabilidade enzoótica.

Testes imunológicos para a detecção de anticorpos específicos contra *Babesia* spp. vêm sendo desenvolvidos, mas o grande desafio encontrado está nas preparações antigênicas, que muitas vezes afetam a especificidade e a sensibilidade do método utilizado.

Dentre os vários métodos sorológicos desenvolvidos para detecção de anticorpos anti-*Babesia* spp destacam-se a fixação de complemento (Mahoney, 1964), a hemaglutinação (Goodger, 1971), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Ross & Löhr, 1968; Leeftang & Perié, 1972; Todorovic & Long, 1976), o teste de ELISA (Barry et al., 1982; O'Donoghue et al., 1985; Waltisbuhl et al., 1987; Böse et al., 1990, Machado, 1991).

A fonte primária de antígeno de babesias para muitos testes sorológicos é o sangue total de animais infectados. Testes de ELISA para *B. bovis* foram desenvolvidos utilizando preparações antigênicas feitas a partir de sangue infectado (Waltisbuhl et al., 1987; Böse et al., 1990). Inúmeros experimentos estão sendo conduzidos, objetivando caracterizar os antígenos específicos de babesias a serem utilizados no diagnóstico. Técnicas de purificação de antígenos de babesias para o uso na detecção de anticorpos pelo teste de ELISA têm sido usadas (O'Donoghue et al., 1985; Böse et al., 1990; Passos, 1993), confirmando a necessidade de melhora na especificidade dos antígenos brutos para serem usados, em testes de ELISA para as espécies de *Babesia*. O cultivo celular tem sido também usado como fonte de antígeno para *Babesia* em testes de imunodiagnósticos (Patarroyo, 1990), principalmente, quando decorre da limitação de animais infectados (Woodford et al., 1990).

A avaliação da resposta imune humoral de anticorpos IgM foi feita em bovinos infestados com larvas de *Boophilus* contendo *B. bovis* através fixação de complemento e reação de imunofluorescência indireta (Goff et al., 1982). Onze bovinos infestados, tornaram-se infectados, e dois não desenvolveram anticorpos anti-*B. bovis*. Durante o experimento, cinco bezerros morreram devido à

inoculação do primeiro estabilizado; todos os bovinos sorologicamente positivos sobreviveram e foram protegidos contra um segundo desafio homólogo de carrapatos infectados.

Atualmente os testes mais utilizados para o diagnóstico de portadores e/ou acompanhamento de animais imunizados são a RIFI e o ELISA. A RIFI apesar de ser um teste de alta sensibilidade, especificidade e de fácil execução, necessita de técnicos bem treinados e de grande demanda de tempo. Uma das grandes limitações desta técnica refere-se à subjetividade da leitura e também à restrição do número de amostras a serem examinadas diariamente (Bidwell et al., 1978).

Bidwell et al. (1978), compararam reações de ELISA com a RIFI para a detecção de anticorpos IgG em bovinos infectados com *B. divergens* e/ou *B. major*, demonstrando boa correlação e sensibilidade.

Até o presente, o teste de ELISA para a babesiose bovina tem-se constituído uma técnica de diagnóstico usada na detecção de anticorpos IgG anti-*Babesia* spp em animais recém-infectados e em estágio crônico da doença. Observações realizadas no diagnóstico sorológico desses parasitos indicam que há similaridades e diferenças entre a *B. bovis* e a *B. bigemina* (Goodger, 1971; Wright et al., 1987).

2.3 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA)

A primeira utilização do teste de ELISA para detecção de anticorpos foi descrito por Engvall & Perlman (1972), como um teste sensível e de baixo custo. A utilização do ELISA para detecção de anticorpos anti-*Babesia* foi demonstrado por Purnell et al. (1976), usando extrato antigênico somático homólogo.

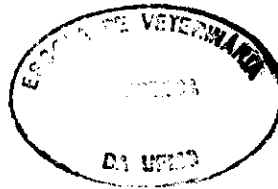
Os imunoenaios se baseiam na utilização da reação antígeno-anticorpo. No caso do teste de ELISA indireto, este envolve três estágios: a reação entre o antígeno e o anticorpo específico; seguindo pela detecção desta reação pelo uso de imunoglobulina anti-espécie conjugada com uma enzima. E o último estágio do procedimento é a adição do substrato respectivo para uma determinada enzima, indicando a reação pelo grau de degradação desse substrato, a qual pode ser quantitativamente medida em um espectrofotômetro (Lane, 1988).

A técnica tem sido amplamente adaptada e usada para o diagnóstico de infecções por parasitos e outros microorganismos de importância médica e veterinária, com disponibilidade de reagentes altamente purificados (Voller et al., 1976).

A comparação entre o teste de ELISA, a RIFI e o FC para detecção de anticorpos em bovinos experimentalmente infectados com *B. divergens* e *B. major* foi feita por Bidwell et al. (1978), que encontraram boa correlação entre os testes. O FC foi o que detectou anticorpos mais cedo; no entanto, a titulação obtida neste foi inferior ao encontrado na RIFI e ELISA, sendo este último o indicado devido a sua objetividade na leitura.

Barry et al. (1982) realizaram um teste de ELISA para detecção de anticorpos anti-*B. bovis* que demonstrou especificidade e maior sensibilidade quando comparada à RIFI. Não foram observadas reações cruzadas com *B. bigemina*, *Anaplasma centrale* e *Theileria* spp. Houve correlação de aproximadamente 95% dos resultados quando comparados com a RIFI, sendo o ELISA mais sensível.

O'Donoghue et al. (1985) fracionaram extrato bruto de *B. bigemina* em coluna de "Sephadex" G-200 produzindo duas frações antigênicas de peso molecular de 600 e 15 KDa que foram utilizadas em um ELISA. No estudo avaliou-se a resposta imune humoral de IgG e IgM em bezerros experimentalmente infectados. Os soros



apresentaram soroconversão para as duas frações no sétimo dia após infecção. A resposta de IgG persistiu por 49 dias após a infecção e a resposta de IgM havia declinado em valores baixos em torno de 28 dias após a infecção.

Waltisbuhl et al. (1987) obtiveram uma fração purificada de lisado de eritrócitos infectados, a partir de filtração em gel, que foi considerada sensível e específica como antígeno para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*B. bovis* no teste de ELISA. No experimento foram testados quatro sistemas, sendo que destes o peroxidase foi o mais sensível. Foram observadas reações cruzadas em soros de animais infectados com *A. marginale*.

Mais recentemente, um antígeno recombinante de *B. bovis* (11C5), que induziu imunidade em bovinos, mostrou ser sensível e específico em ELISA; entretanto observou-se baixa sensibilidade com algumas amostras de soros positivas (Böse et al., 1990). Estes autores sugeriram a utilização de um "cocktail" de dois ou mais antígenos recombinantes para melhorar a sensibilidade do teste.

Antígenos de babesias solúveis ou digeridos foram obtidos a partir de eritrócitos infectados por *B. bovis* e *B. bigemina* (Machado, 1991). Para a lise de eritrócitos parasitados e isolamento de merozoítos de *Babesia* spp livres, utilizou-se a solução de cloreto de amônio a 0,83% tamponada em Tris. A resposta imune humoral em bezerros intactos, experimentalmente infectados por *B. bovis*, permaneceu em níveis elevados durante os 233 dias de experimentação. Através do teste de ELISA indireto foram determinados os perfis sorológicos em bezerros, novilhas e vacas mantidos a campo. Foi observado maior percentual de soros negativos (19,4%) entre os bezerros os quais também apresentaram níveis séricos de anticorpos, significativamente inferiores quando comparados com os de novilhas e vacas.

Proteínas de parasitos identificadas através de eletroforese foram usadas como antígeno no teste de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* (Passos, 1993). Extratos antigênicos brutos foram comparados com estas proteínas purificadas e testados contra um painel de soros experimentalmente produzidos e outro de soros naturalmente infectados através de carrapatos no campo. O teste de ELISA, desenvolvido para detecção de anticorpos contra *B. bovis*, usando o antígeno 56 KDa purificado, demonstrou ser apropriado para o uso em estudos epidemiológicos. Entretanto a proteína purificada de *B. bigemina* apresentou reação cruzada com soros anti-*B. bovis*.

2.4 Resposta imune humoral pelo ELISA

Numerosos estudos têm demonstrado o papel da resposta imune na proteção de bovinos contra a infecção por *Babesia*. A transferência passiva de soro imune para bezerros susceptíveis, confere proteção parcial contra a infecção (Mahoney et al., 1981). Em áreas endêmicas, os bezerros recebem proteção passiva de anticorpos presentes no colostro, aproximadamente até três meses de idade (James et al., 1985). A proteção pode persistir por até 6 meses para *B. bovis* e de três a quatro meses para *B. bigemina*. A classe de anticorpo que induz imunidade é a IgG. Estudos mais recentes demonstraram que os anticorpos da subclasse IgG₁ são os responsáveis pela indução da resposta imune (Wright, 1990). Além da resposta humoral, a imunidade mediada por células é importante na proteção contra *Babesia*, pois animais esplenectomizados tornam-se muito mais susceptíveis à infecção. Segundo alguns autores, após a primo-infecção, os animais permanecem sorologicamente positivos por um período de quatro anos para *B. bovis* e pelo menos de dois a três anos para a *B. bigemina* (Mahoney et al., 1979; Wright et al., 1990).

Barry et al. (1982) avaliaram o curso de resposta de anticorpos IgG pelos testes de ELISA e RIFI, em cinco animais experimentalmente

infectados por *B. bovis*, que sofreram desafio 71 dias após inoculação inicial com amostra heteróloga. Os maiores níveis de anticorpos detectados pelos dois métodos foram observados 14 dias após inoculação, sendo os animais positivos por 268 dias após inoculação inicial. Após desafio foi observado aumento significativo no nível médio de reatividade em ELISA dos bovinos imunes.

Em infecções por *Babesia* foram produzidos anticorpos contra um largo espectro de antígenos do parasito, protetores e não protetores, e também contra antígenos do hospedeiro, como resultado de uma resposta inflamatória. A maioria dos anticorpos detectados em procedimentos sorológicos não são protetores (Goodger et al., 1985a)

O'Donoghue et al. (1985) fracionaram extrato bruto de *B. bigemina* verificando resposta antigênica contra proteínas de peso molecular de 600 e 15 KDa. Usando estas frações antigênicas, eles investigaram a resposta de anticorpos dentro das classes de IgG e IgM em bezerros experimentalmente infectados. Anticorpos IgM específicos foram detectados em soros de bezerros infectados experimentalmente a ambas as frações, inicialmente observadas no sétimo dia pós-infecção. A resposta por IgG atingiu pico de intensidade 12 dias após infecção e persistiu por 49 dias após infecção, enquanto que, na resposta por IgM, o pico de intensidade ocorreu 12 dias após infecção e persistiu em níveis máximos até o dia 22, declinando em níveis baixos em torno de 28 dias de infecção até o final do experimento a 49 dias após inoculação.

Waltisbuhl et al. (1987) demonstraram que uma fração de lisado de eritrócitos infectados por *B. bovis*, separados por filtração em gel, pode ser utilizada como antígeno no teste de ELISA. O ensaio foi capaz de detectar anticorpos IgG por um período de dois a quatro anos após uma única infecção.

Através do teste de ELISA indireto, Machado (1991), avaliou o perfil sorológico de bezerros intactos, infectados experimentalmente por *B. bovis*. A soroconversão iniciou entre nove e dez dias após a infecção, apresentando declínio de anticorpos IgG do 72º ao 84º dia do período pós inoculação; entretanto, estes níveis permaneceram elevados durante os 233 dias do experimento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização do experimento

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Protozooses e de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, MG.

O antígeno de *B. bigemina* foi processado no Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal-UNESP, SP.

3.2 Animais experimentais

Foram utilizados bezerros machos, da raça Holandesa, esplenectomizados, livres de hemoparasitos e que não haviam ingerido colostro, adquiridos da Companhia Agrícola Nova América (CANA), Tarumã, SP.

Os animais foram trazidos da CANA para a Escola de Veterinária - UFMG. Os bezerros eram mantidos em baias individuais cobertas com piso e paredes de cimento, em isolamento para carrapatos e moscas.

3.3 Infecções experimentais

Um bezerro esplenectomizado, de um mês de idade, recebeu inóculo de *B. bovis* (amostra CANA), contendo aproximadamente 10^7 parasitos, por via endovenosa. A amostra de *B. bovis* foi isolada a

partir de infecção natural e mantida criopreservada em dimetilsulfoxido (DMSO) a 11% em nitrogênio líquido a -196°C (IICA, 1987).

O outro bezerro esplenectomizado, com aproximadamente cinco meses de idade, recebeu inóculo de *B. bigemina* (Machado, 1994). A amostra foi isolada em Jaboticabal (SP), mantida criopreservada em DMSO a 10%.

Os bezerros foram acompanhados através de registro diário de temperatura retal e esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa, para determinação da parasitemia.

3.4 Banco de soros

Foram utilizadas 50 amostras de soros de animais importados de áreas livres de carrapatos, colhidas logo após a chegada dos animais oriundos de fazendas onde ficaram em quarentena. Foram colhidos soros de bovinos das Fazendas Pindobas, município de Venda Nova do Imigrante (ES); Fazenda Mata Velha, município de Capitólio (MG); Companhia Agrícola Nova América, município de Tarumã (SP) e Granja Diniz Lima, município de Esmeraldas (MG).

Foram colhidas amostras de soros de 17 bovinos da raça Holandesa, com idades variando entre oito e 18 meses, importados de área livre do carrapato *Boophilus microplus* (EUA) e submetidos ao processo de premunicação (CANAm). As colheitas destas amostras de soros foram feitas diariamente, por um período de 19 dias consecutivos, e posteriormente por mais 15 semanas.

Estes animais foram divididos aleatoriamente em três grupos e receberam os seguintes tipos de inóculos:

Grupo 1: composto por cinco animais, infestados com aproximadamente 2 000 larvas de *B. microplus*. A idade destas

larvas variavam de doze a 20 dias e eram colocadas diretamente sobre o dorso dos animais. Estes bovinos foram desafiados com cinco ml de sangue contendo 1×10^6 hemácias parasitadas (h.p.) por *B. bovis*, 1×10^6 h.p. por *B. bigemina* e 1×10^7 h.p. por *A. marginale*;

Grupo 2: composto por seis animais, inoculados por via subcutânea com cinco ml de sangue parasitado por *B. bovis* e *B. bigemina*. Estes bovinos foram desafiados com cinco ml de sangue contendo 4×10^6 h.p. por *B. bovis*, $3,5 \times 10^6$ h.p. por *B. bigemina* e $1,2 \times 10^7$ h.p. por *A. marginale*;

Grupo 3: composto por seis animais, inoculados por via subcutânea com cinco ml de sangue parasitado por *B. bovis*. Estes bovinos foram desafiados com cinco ml de sangue contendo 1×10^6 h.p. com *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.

O desafio de todos os animais, dos respectivos grupos, ocorreu 30 dias após a inoculação inicial. Os bovinos usados como doadores do inóculo para o desafio, foram submetidos ao processo de premunicação, realizada na CANA.

A temperatura retal de cada animal foi registrada duas vezes ao dia, pela manhã e à tarde, durante todo o período do experimento. Animais com temperatura retal igual ou superior a $39,5^{\circ}\text{C}$ eram considerados febris.

Diariamente durante os primeiros 19 dias foram preparados esfregaços de sangue periférico, da extremidade da cauda. Após este período, este procedimento foi feito semanalmente até o término da premunicação. Os esfregaços eram corados pelo Giemsa e observados em microscópio óptico, em objetiva de imersão, para o diagnóstico parasitológico.

Amostras de sangue com anticoagulante foram colhidas para determinação do volume globular.

3.5 Teste de ELISA

3.5.1 Preparação antigênica bruta de *B. bovis*

Para sua obtenção, empregou-se a técnica utilizada por Passos (1993). Foram colhidos 300 ml de sangue de bezerro parasitado por *B. bovis*, em anticoagulante (citrato de sódio) e mantido em banho de gelo até o início do processamento. O sangue foi centrifugado a 2.500 g por 30 minutos a 4°C. O plasma, a papa de leucócitos e aproximadamente 5% das hemácias foram descartados. O sedimento das hemácias foi lavado com PBS por centrifugação nas condições anteriores. O volume de 100 ml deste sedimento foi lisado com 25 volumes de KCl 0,5% por cinco minutos. Nesta etapa, ocorreu a lise das hemácias não infectadas. A lise foi interrompida pela adição de KCl 10,9%, na proporção de 1,57 vezes o volume do sedimento inicial de hemácias. O material foi novamente centrifugado e o sedimento lavado duas vezes com PBS. As hemácias infectadas concentradas foram então lisadas com cinco volumes de NH₄Cl 0,9% durante 30 minutos a 4°C.

Todas as soluções para lise foram mantidas sob refrigeração e a cada etapa esfregaços dos sedimentos e sobrenadantes foram feitos para detecção de hemoparasitos.

Os parasitos livres e membranas de hemácias foram sedimentados e lavados por centrifugação em PBS. O sedimento final foi ressuspenso em cinco volumes de PBS contendo inibidores de proteases (Apêndice 6.1).

O material foi sonicado em amplitude de 50 W em três ciclos de um minuto cada. Após a sonicação, as preparações foram centrifugadas a 10 000 g, por cinco minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram

separados, identificados e armazenados a -20°C em alíquotas de 50 μl , até o momento do uso.

3.5.2 Preparação antigênica bruta de *B. bigemina*

Foi utilizado antígeno solubilizado de *B. bigemina*, preparado na UNESP - Jaboticabal, segundo técnica usada por Machado (1991), com algumas modificações. Sangue de bezerro parasitado por *B. bigemina* foi colhido em igual volume de solução de Alsever. Este material foi centrifugado a 1.500 g por 5 minutos à 5°C . O plasma e a papa de leucócitos foram desprezados. Os eritrócitos sedimentados, após três lavagens sucessivas, foram ressuspensos em solução salina estéril a 0,85% a uma relação eritrócito/dilúente de 1:4. Para a lise de eritrócitos parasitados, utilizou-se a técnica descrita por Martin et al. (1971), com modificações. Os eritrócitos parasitados foram lisados em solução cloreto de amônio/tamponado em Tris. Preparou-se, anteriormente ao uso, a solução de cloreto de amônio a 0,83% e a nove volumes desta solução adicionou-se um volume de tampão Tris 0,17 M (pH 7,65). A solução foi aquecida em banho maria a 37°C . Para a lise foram adicionados nove volumes desta solução a cada volume da suspensão de eritrócitos. A mistura foi incubada em banho maria a 37°C durante três minutos, observando-se visível hemólise. Em seguida, à temperatura de 5°C , a mistura foi centrifugada a 1.500 g por 15 minutos e o sedimento livre do estroma eritrocítico lavado em solução salina estéril a 0,85%, por três vezes consecutivas. Desse modo, merozoítos de *B. bigemina* livres foram utilizados para o preparo de antígeno bruto, submetendo-se posteriormente este material ao processo de congelamento, em nitrogênio líquido, e descongelamento a 37°C , em banho maria, por sete ciclos consecutivos. O material desintegrado foi centrifugado a 12.000 g durante 60 minutos, à temperatura de 4°C . O sobrenadante assim obtido foi dividido em alíquotas, mantidos à temperatura de -20°C até o momento do uso.

3.5.3 Descrição do teste de ELISA

A técnica utilizada foi a estabelecida por Wilchek & Bayer (1984), com modificações. As microplacas (Costar, USA) foram adsorvidas, com 100 µl de cada antígeno (*B. bovis* ou *B. bigemina*) por well diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05 M (pH 9,6), de acordo com a titulação de cada antígeno. As microplacas foram incubadas por 14 horas à temperatura de 4°C. As placas foram submetidas a três lavagens, com o tampão PBS - Tween (PBS 0,01 M (pH 7,2), contendo 0,05% de Tween 80). Os sítios de ligações inespecíficas foram bloqueados com 100 µl de PBS - caseína 5% (pH 7,6) por well, durante uma hora a 37°C. As placas foram lavadas três vezes com a solução PBS - Tween. Os soros teste e os soros de referência positivo e negativo foram utilizados na diluição ótima, determinada na titulação com tampão diluente (PBS - Tween). Após a adição de 100 µl dos soros diluídos, as placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos. As placas foram novamente lavadas três vezes com a solução de PBS - Tween e logo após adicionados 100 µl do conjugado anti-IgM bovino-biotina (Monoclonal anti-bovine IgM Biotin Conjugate / Sigma B 0774) diluído em 1: 30 000, de acordo com a recomendação do fabricante. As microplacas foram incubadas a 37°C por uma hora. Após a reação, as placas foram lavadas três vezes com a solução PBS - Tween. Na próxima etapa foi adicionada a Avidina-Peroxidase (Avidin-Peroxidase Conjugate / Sigma A 7419) diluída em 1:100.000, também conforme a indicação do fabricante, em PBS - Tween. As placas foram novamente incubadas a 37°C, por uma hora, e lavadas com PBS - Tween.

Em cada well foi adicionado, logo após o preparo, 100 µl de solução substrato ortofenilenodiamino (OPD) (Apêndice 6.1), incubando-se a reação a 37°C, por 15 minutos. Decorrido esse prazo, a reação foi bloqueada pela adição de 32 µl de ácido sulfúrico 4 N.

A leitura da reação (densidade óptica) foi registrada no leitor de micro-ELISA (Sigma), conforme absorbância em filtro de comprimento de onda (492 nm).

3.5.4 Padronização do teste de ELISA

No estudo foram testados dois tipos de bloqueios, sendo um com caseína 5% e o outro com soro equino 5%, durante uma hora. Estes dois sistemas foram testados em titulações seriadas do antígeno e dos soros de referência positivo e negativo.

Todas as amostras de soros foram testadas para o antígeno *B. bigemina* em duplicata e suas médias calculadas. Para *B. bovis* as amostras foram usadas em diluição única. O desvio padrão das leituras das médias do grupo dos soros negativos foram calculados e usados para o cálculo do nível de discriminação positivo-negativo ("cut off"), de acordo com Richardson et al. (1983). Os valores de absorbância maiores que a média dos soros negativos, somados duas vezes seu desvio padrão, foram considerados positivos, enquanto que os valores menores foram considerados negativos (Wright et al., 1993).

As diluições ótimas de antígeno, soros referência positivo e negativo foram determinados através de titulação em blocos, fazendo-se reagir diluições duplas dos antígenos frente a diluições duplas dos soros anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e negativo. A diluição do conjugado testada foi a recomendada pelo fabricante.

A especificidade de cada teste foi definida como a proporção de amostras de soros negativos detectadas como negativas, e a sensibilidade como a proporção de amostras de soros em períodos determinados do processo de premunicação após inoculações, detectados como positivos.

A validação dos testes de ELISA foi feita utilizando-se amostras de soros de animais importados de áreas livres de carrapatos e de animais, durante o processo de premunicação.

Para minimizar as variações entre procedimentos realizados em dias diferentes, as médias dos valores de absorbâncias foram ajustadas usando-se um fator de correção. Este fator foi calculado a partir das médias das leituras de absorbâncias dos controles positivo e negativo, como descrito abaixo:

$$\text{Fator F} = \frac{Po - No}{Pt - Nt}$$

$$\text{Valor ajustado} = F (St - Nt) + No$$

Po: média das absorbâncias dos 4 controles positivos da placa zero.

No: média das absorbâncias dos 4 controles negativos da placa zero.

Pt: média das absorbâncias dos 4 controles positivos da placa teste.

Nt: média das absorbâncias dos 4 controles negativos da placa teste.

St: média das absorbâncias dos soros teste.

Os valores da leitura de absorbância foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variaram de zero até oito (0 - 8). O limite máximo do nível zero foi determinado pelo valor do "cut off". A partir desse limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram definidos por acréscimo de 35 %, à semelhança do proposto por Wilson et al. (1984).

3.6 Análise estatística

Para comparação dos perfis da resposta imune humoral em soros dos animais, durante o processo de premunicação, empregou-se o teste de Kruskal Wallis para *B. bovis* e o teste Mann Whitney Wilcoxon para *B. bigemina* (Stell & Torrier, 1960).

A utilização de dois testes estatísticos foi devido ao número de grupos diferentes avaliados para cada espécie, três para *B. bovis* e dois para *B. bigemina*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padronização do teste de ELISA para *B. bovis*.

Obteve-se maior discriminação entre positivo e negativo com o bloqueio caseína 5%, em todas as diluições testadas (Tab. 1), consequentemente optou-se pelo emprego desse tipo de bloqueio.

Passos (1993), trabalhando com preparações antigênicas brutas, excluiu a etapa bloqueio, porém observou aumento de reações inespecíficas nos valores de absorbâncias do grupo de soros negativos.

Devido aos parasitos do gênero *Babesia* desenvolverem-se dentro de eritrócitos, as preparações antigênicas brutas frequentemente contêm considerável quantidade de componentes de células do hospedeiro. Estes contaminantes afetam a performance dos testes por causarem aumento de reações não específicas (Böse et al., 1990).

Waltisbuhl et al. (1987), usando fração purificada de eritrócitos infectados por *B. bovis* como antígeno para detecção de anticorpos IgG, verificaram que o bloqueio com gelatina 0,5% apresentou os melhores resultados. Böse et al. (1990), para detecção da mesma classe de imunoglobulina, utilizando um antígeno recombinante de *B. bovis* e um "pool" de conjugados, observaram melhores resultados, empregando o bloqueio com soro equino, quando comparado com gelatina e ovo-albumina.

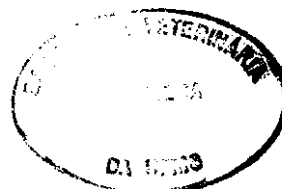


Tabela 1 - Valores de absorbância de soros positivo e negativo em diluições seriadas frente ao antígeno de *B. bovis*, utilizando-se caseína 5% e soro equino 5%, como agentes bloqueadores.

Diluição do antígeno de 1:50						
Diluição do soro						
	1:200		1:400		1:800	
	Ca	SE	Ca	SE	Ca	SE
SP	0,523	0,369	0,434	0,334	0,372	0,332
SN	0,176	0,222	0,126	0,181	0,071	0,088
Diluição do antígeno de 1:100						
Diluição do soro						
	1:200		1:400		1:800	
	Ca	SE	Ca	SE	Ca	SE
SP	0,524	0,425	0,474	0,384	0,441	0,318
SN	0,182	0,224	0,127	0,172	0,057	0,055
Diluição do antígeno de 1:500						
Diluição do soro						
	1:200		1:400		1:800	
	Ca	SE	Ca	SE	Ca	SE
SP	0,516	0,384	0,417	0,347	0,382	0,294
SN	0,202	0,219	0,163	0,162	0,076	0,100
Diluição do antígeno de 1:1 000						
Diluição do soro						
	1:200		1:400		1:800	
	Ca	SE	Ca	SE	Ca	SE
SP	0,460	0,379	0,381	0,314	0,367	0,207
SN	0,192	0,211	0,111	0,159	0,057	0,098

Ca - caseína; SE - soro equino; SP - soro positivo; SN - soro negativo.

Os resultados da titulação em bloco do antígeno e o soro teste mostraram diluição ótima do antígeno de 1:800 para *B. bovis*. Este valor foi selecionado com base nos resultados apresentados na Tabela 1, onde observou-se os maiores valores de absorbância que diferenciaram os soros positivos e negativos entre as diluições do antígeno de 1:500 e 1:1.000, quando testados com a diluição do soro de 1:800. A diluição do conjugado utilizada foi de 1:30.000 para biotina IgM anti-bovino (Sigma) e 1:100.000 para peroxidase avidina (Sigma), de acordo com a recomendação do fabricante, não sendo observada reação inespecífica tanto com soro de referência negativo quanto com o controle do conjugado. Estas diluições foram julgadas como ótimas após titulação em bloco contra soros controles padrão, demonstrando assim discriminação entre o soro positivo e o negativo.

O uso do conjugado biotina avidina, neste ensaio, não determinou reações inespecíficas no soro de referência negativo e no controle do conjugado. A atividade enzimática proporcionou avaliação da reação através da visualização da cor amarela, de acordo com Engvall & Perlmann (1972). Segundo Wright et al. (1993), em teste de ELISA indireto existe uma relação direta entre a intensidade da cor e a quantidade de anticorpos ligados.

Trabalhos que também utilizaram eritrócitos parasitados por *B. bovis* como fonte de antígeno no teste de ELISA, com sistemas de conjugados distintos, apresentaram resultados semelhantes ao do presente estudo, quanto à atividade enzimática da reação e à boa visualização da cor amarela (Barry et al., 1982; Waltisbuhl et al., 1987; Machado, 1991).

A absorbância média do grupo de soros negativos foi $0,123 \pm 0,050$. Para a determinação do valor do "cut off" utilizaram-se soros dos animais da premunicação, realizada em Tarumã, SP, antes de receberem os inóculos (mesmos animais usados para a determinação da sensibilidade), acrescidos de 35 amostras de soros de animais

importados de áreas livres de carrapatos, colhidos antes da inoculação inicial, oriundos de outras premunições (Apêndice 6.2.1). O valor do "cut off" calculado foi 0,223 para *B. bovis*. Esta metodologia demonstra que a probabilidade dos valores negativos estarem dentro do limiar do "cut off" é de 95%; entretanto há 5% de probabilidade de se obter reações falso positivas, sendo o procedimento indicado quando houver o uso de grande número de soros de referência negativos (> 10) (Savigny & Voller, 1980). Isto representou uma especificidade de 0,94, visto que somente três das 50 amostras testadas dos soros de animais livres de infecção foram detectados como positivos (Tab. 2).

A seleção do valor do "cut off" para o teste determina a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico e o valor preditivo do teste. A especificidade, determinada no teste, demonstrou sua possível utilização em avaliações do estado imune dos animais submetidos ao processo de premunicação.

A sensibilidade do procedimento para *B. bovis* foi de 100% (Tab. 3), visto que todas as amostras de soros (animais dos grupos 1, infestados com larvas de *B. microplus* e grupo 2, inoculados com *Babesia* spp) colhidas em períodos determinados (4ª à 8ª semanas após inoculação inicial) do processo de premunicação foram detectadas como positivas.

Tabela 2 - Sensibilidade e especificidade do teste de ELISA usando o antígeno de *B. bovis*.

Posição das amostras	Proporção
Positivos (animais submetidos à premunicação - Sensibilidade)	1,00 (50/50)
Falsos negativos	0,00 (00/50)
Negativos (animais de áreas livres - Especificidade)	0,94 (47/50)
Falsos positivos	0,06 (03/50)

Tabela 3 - Valores de absorbância de amostras de soros de animais antes e após a primeira inoculação, usando o antígeno de *B. bovis*.

Amostras de soros (número)	Média	Desvio padrão	Número de positivos/total
anti- <i>B. bovis</i> (50)	0,584	0,212	50/50
animais livres (50)	0,123	0,050	03/50

Os valores da sensibilidade e especificidade em uma prova de diagnóstico através da escolha de um valor do "cut off", conduz a variações nos valores destas características que, em geral, ocorrem em ordem inversa, ou seja, o aumento de uma leva à diminuição da outra.

A média dos valores de absorbância do grupo de soros anti-*B. bovis* foi aproximadamente 4,7 vezes maior que a obtida com o grupo de soros dos animais livres da infecção.

A validação do teste de ELISA para *B. bovis* foi feita utilizando-se amostras de soros de animais importados de áreas livres de carrapatos (Tab. 3) e de animais submetidos ao processo de premunicação, obtendo-se o perfil de resposta imune humoral de animais submetidos ao processo de premunicação (Gráf. 1)).

Após a utilização do teste de ELISA e determinação do valor “cut off”, a escala de nível de ELISA (NE) ficou assim definida, para *B. bovis*:

NE	Faixas de absorbância <i>B. bovis</i>
0	0,000 - 0,223
1	0,224 - 0,301
2	0,302 - 0,406
3	0,407 - 0,548
4	0,549 - 0,740
5	0,741 - 0,787
6	0,788 - 0,999
7	1,000 - 1,349
8	> 1,349

As frequências dos níveis de ELISA para o antígeno de *B. bovis*, para determinação da sensibilidade, são apresentadas no gráfico 2. Os valores de absorbância, obtidos destes soros testados, estão apresentados no apêndice 6.2.2.

Nos vários grupos testados, observou-se diferença nos valores de absorbância em um mesmo dia, após infecção, ou seja, um animal em determinado dia, após infecção, apresentou intensidade da resposta imune diferente dos demais animais do mesmo grupo, apresentando até mesmo variações de níveis de ELISA. Foi observado um animal positivo e os demais, do mesmo grupo, negativos. Isto poderia ser atribuído a diferenças individuais e também ao pequeno número de animais utilizados no delineamento experimental para cada grupo.

Gráfico 1 - Medianas dos valores de absorbância⁻¹ de IgM para *B. bovis*, de animais da raça Holandesa, submetidos ao processo de premunição.

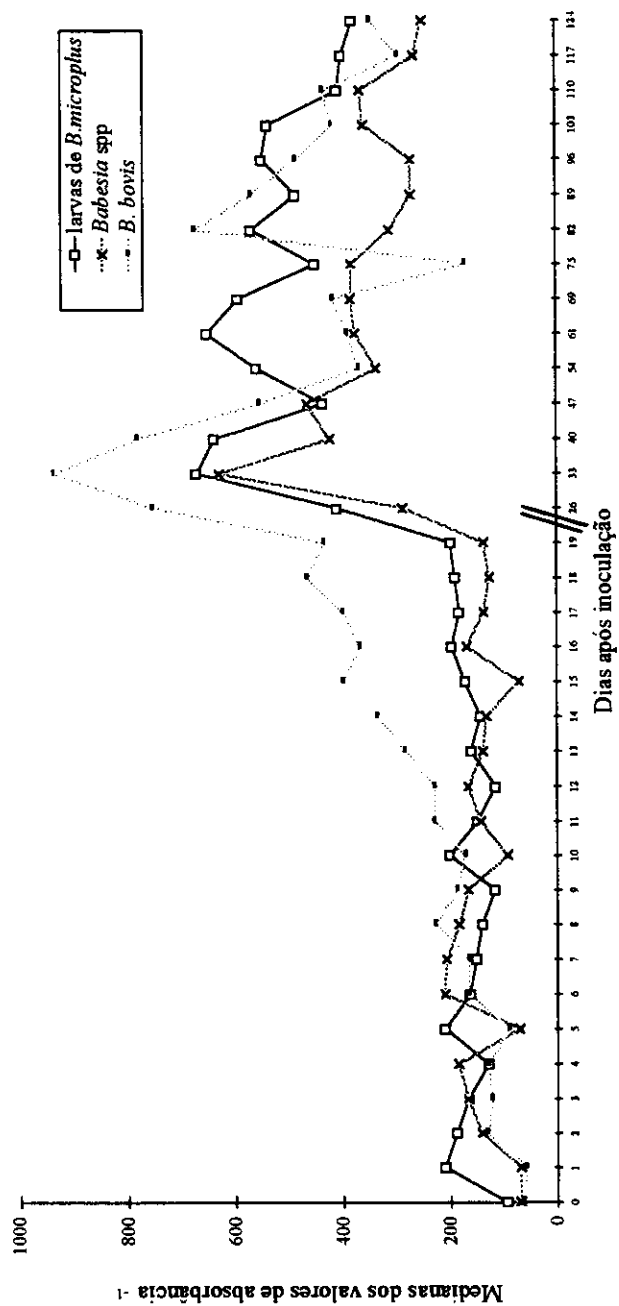
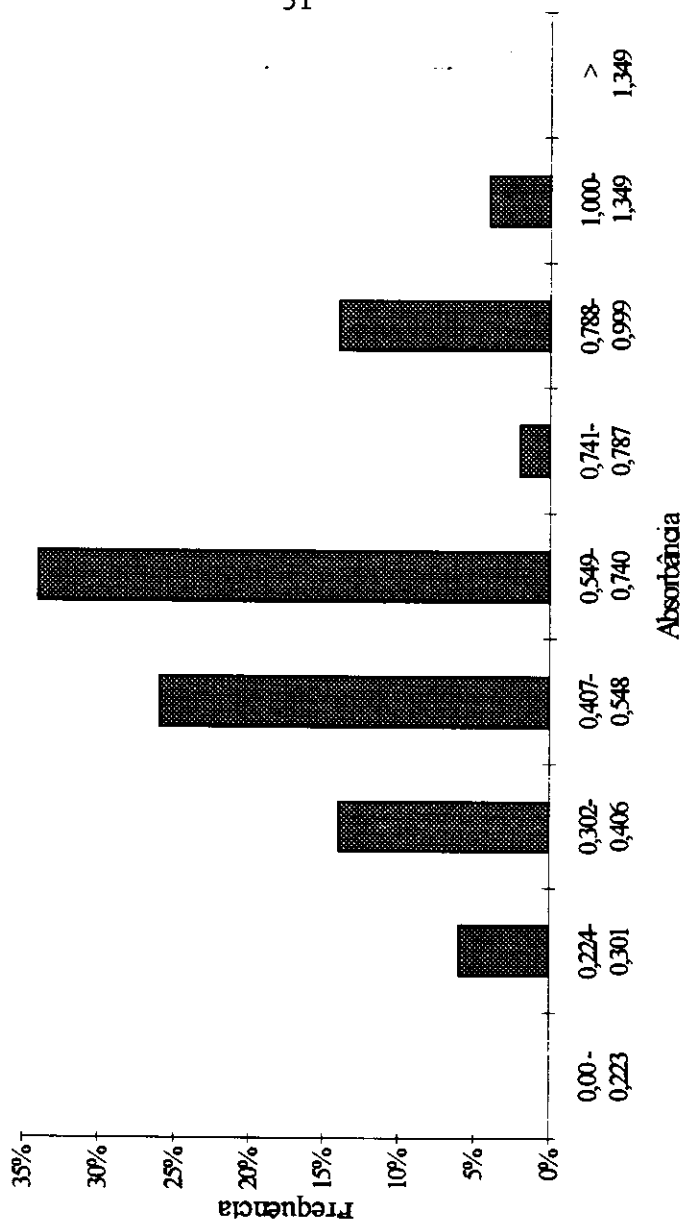


Gráfico 2 - Distribuição da frequência de valores de absorbância de IgM para *B. bovis* de animais submetidos ao processo de premunização, da 5ª à 10ª semana após inoculação inicial.



A maioria dos animais do grupo infestado com larvas de *B. microplus* apresentaram parasitemia no início da 3ª semana do experimento. Os animais inoculados com sangue contendo *Babesia* spp apresentaram parasitemia nas 2ª ou 4ª semanas P.I. A parasitemia dos animais do grupo inoculado com *B. bovis* foi detectada a partir da 2ª semana P.I.

Os valores de temperatura retal dos animais aumentaram paralelamente com o acréscimo da parasitemia para *B. bovis*, o mesmo não sendo verificado para *B. bigemina*. A temperatura alcançou valor máximo de 41,7°C. Os valores de hematócrito caíram posteriormente a detecção da parasitemia.

4.2 Padronização do teste de ELISA para *B. bigemina*.

Observou-se também, como no teste de ELISA para *B. bovis*, maior discriminação entre positivo e negativo com o bloqueio caseína 5%, em todas as diluições testadas (Tab. 4).

O uso de antígenos semi-definidos permitiu a padronização do teste e boa reprodutividade dos resultados ao teste de ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG para *B. bigemina*, concordando com O'Donoghue et al. (1985). Estes autores, trabalhando com o sistema de conjugado peroxidase, encontraram melhores resultados bloqueando com soro albumina humana a 1%.

Os resultados da titulação em bloco do antígeno e do soro teste mostraram que a diluição ótima do antígeno de *B. bigemina* era 1:2.000 e a diluição do soro de 1:800. Este valor foi selecionado com base nos resultados apresentados na Tabela 4, onde observou-se discriminação entre os soros positivos e negativos entre as diluições do antígeno de 1:500 e 1:1.000. A diluição do conjugado foi utilizada de 1:30.000 para biotina IgM anti-bovino (Sigma) e 1:100.000 para peroxidase avidina (Sigma), de acordo com a

Tabela 4 - Valores de absorbância de soro positivo e negativo em diluições seriadas para o antígeno de *B. bigemina*, utilizando-se caseína 5% e soro equino 5%, como agentes bloqueadores.

Diluição do antígeno de 1:500									
Diluição do soro									
1:100		1:200		1:400		1:800			
Ca	SE	Ca	SE	Ca	SE	Ca	SE		
SP	0,383	0,401	0,348	0,409	0,319	0,357	0,295	0,329	
SN	0,089		0,059	0,083	0,040	0,097	0,00	0,072	
Diluição do antígeno de 1:1 000									
Diluição do soro									
1:100		1:200		1:400		1:800			
Ca	SE	Ca	SE	Ca	SE	Ca	SE		
SP	0,401	0,400	0,360	0,368	0,327	0,325	0,300	0,307	
SP	0,181	0,200	0,136	0,076	0,080	0,102	0,034	0,058	
Diluição do antígeno de 1:1 500									
Diluição do soro									
1:100		1:200		1:400		1:800			
Ca	SE	Ca	SE	Ca	SE	Ca	SE		
SP	0,351	0,371	0,309	0,351	0,276	0,025	0,301	0,274	
SP	0,102	0,108	0,062	0,091	0,025	0,025	0,024	0,018	
Diluição do antígeno de 1:2 000									
Diluição do soro									
1:100		1:200		1:400		1:800			
Ca	SE	Ca	SE	Ca	SE	Ca	SE		
SP	0,365	0,387	0,338	0,355	0,325	0,355	0,276	0,257	
SP	0,175	0,188	0,102	0,133	0,079	0,085	0,033	0,042	

Ca - caseína; SE-soro equino; SP-soro positivo; SN-soro negativo.

recomendação do fabricante. Estas diluições foram julgadas como ótimas, após titulação em bloco contra soros controles padrão, demonstrando assim discriminação entre o soro positivo e o negativo.

Os ensaios descritos por Machado (1991) utilizando eritrócitos parasitados por *B. bigemina* como fonte de antígeno no teste de ELISA, para detecção de anticorpos IgG e por O'Donoghue et al. (1985) com o uso de antígenos semi-definidos, para detecção de anticorpos IgM e IgG, permitiram, como no presente trabalho, padronização do teste e boa reprodutividade dos resultados, usando os sistemas conjugado fosfatase alcalina e o conjugado peroxidase, respectivamente.

A média de absorbância dos soros negativos foi $0,048 \pm 0,038$. O valor do "cut off" calculado foi 0,124 para *B. bigemina*, representando uma especificidade de 0,94, visto que somente três das 50 amostras testadas dos soro de animais, antes da infecção, foram detectados como positiva (Tab. 5). Para a determinação do valor do "cut off" utilizaram-se os mesmos soros dos animais utilizados no procedimento para *B. bovis* (Apêndice 6 2.1).

A sensibilidade do teste utilizando-se preparação antigênica para *B. bigemina* foi de 94% (Tab. 5), visto que três amostras de soros colhidas em períodos determinados (5ª a 10ª semana após inoculação inicial) do processo de premunicação foram detectadas como negativas.

Tabela 5 - Sensibilidade e especificidade do teste de ELISA usando o antígeno de *B. bigemina*.

Posição das amostras	Porcentagem
Positivos (animais submetidos à premunicação	-
Sensibilidade)	0,94 (47/50)
Falsos negativos	0,06 (03/50)
Negativos (animais de áreas livres - Especificidade)	0,94 (47/50)
Falsos positivos	0,06 (03/50)

A média dos valores de absorbância do grupo de soros anti-*B. bigemina* foi aproximadamente 7,2 vezes maior que a obtida com o grupo de amostras de soros dos animais importados de áreas livres de carrapatos, colhidas antes da primeira infecção.

A validação do teste de ELISA para *B. bigemina* foi feita utilizando-se as mesmas amostras de soros de animais importados de áreas livres de carrapatos (Tab. 6) e de animais submetidos ao processo de premunicação, obtendo-se o perfil de resposta imune humoral de animais submetidos ao processo de premunicação (Gráf. 3).

Gráfico 3 - Medianas dos valores de absorbância $^{-1}$ de IgM para *B. bigemina*, de animais da raça Holandesa, submetidos ao processo de premunicação.

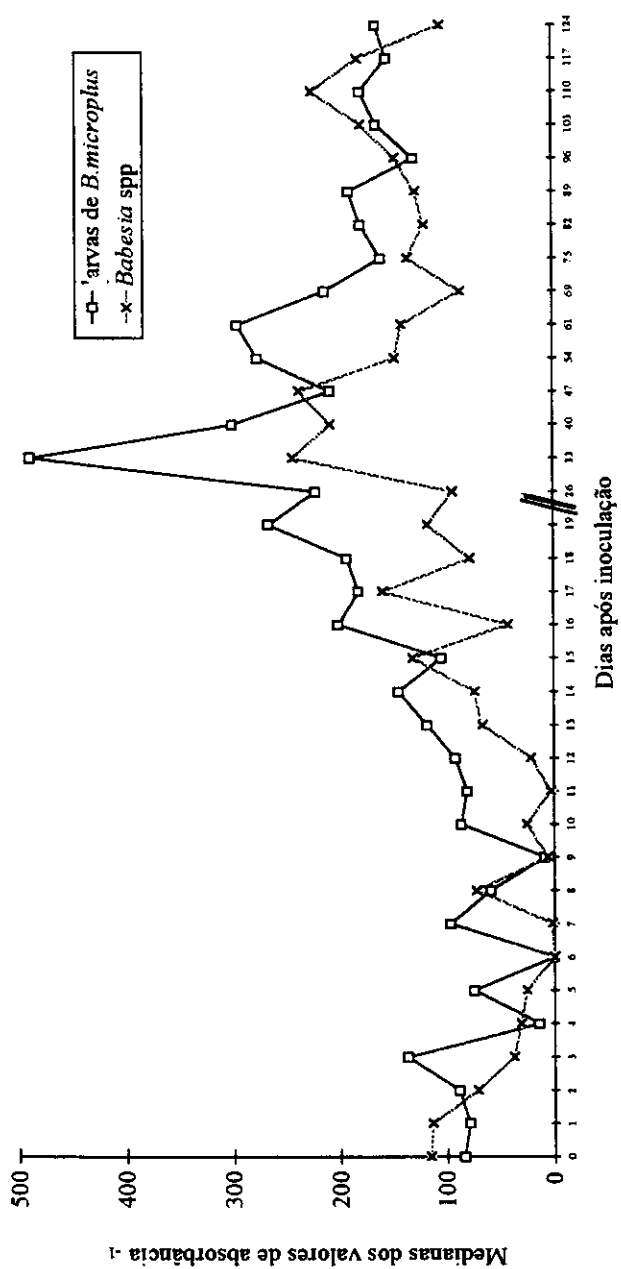


Tabela 6 - Valores de absorbância de amostras de soros de animais antes e após a primeira inoculação, usando o antígeno de *B. bigemina*.

Amostras de soros (número)	Média	Desvio padrão	Número de positivos/total
anti- <i>B. bigemina</i> (50)	0,349	0,276	47/50
animais livres (50)	0,048	0,038	03/50

Após a utilização do teste de ELISA e determinação do valor "cut off", a escala de nível de ELISA (NE) ficou assim definida, para *B. bigemina*:

NE	Faixas de absorbância <i>B. bigemina</i>
0	0,000 - 0,124
1	0,125 - 0,167
2	0,168 - 0,225
3	0,226 - 0,305
4	0,306 - 0,411
5	0,412 - 0,556
6	0,557 - 0,750
7	0,751 - 1,013
8	> 1,013

As frequências dos níveis de ELISA para o antígeno de *B. bigemina*, para determinação da sensibilidade, estão demonstradas no Gráfico 4. Os valores de absorbância, obtidos de cada soro testado, estão apresentados no apêndice 6.2.3.

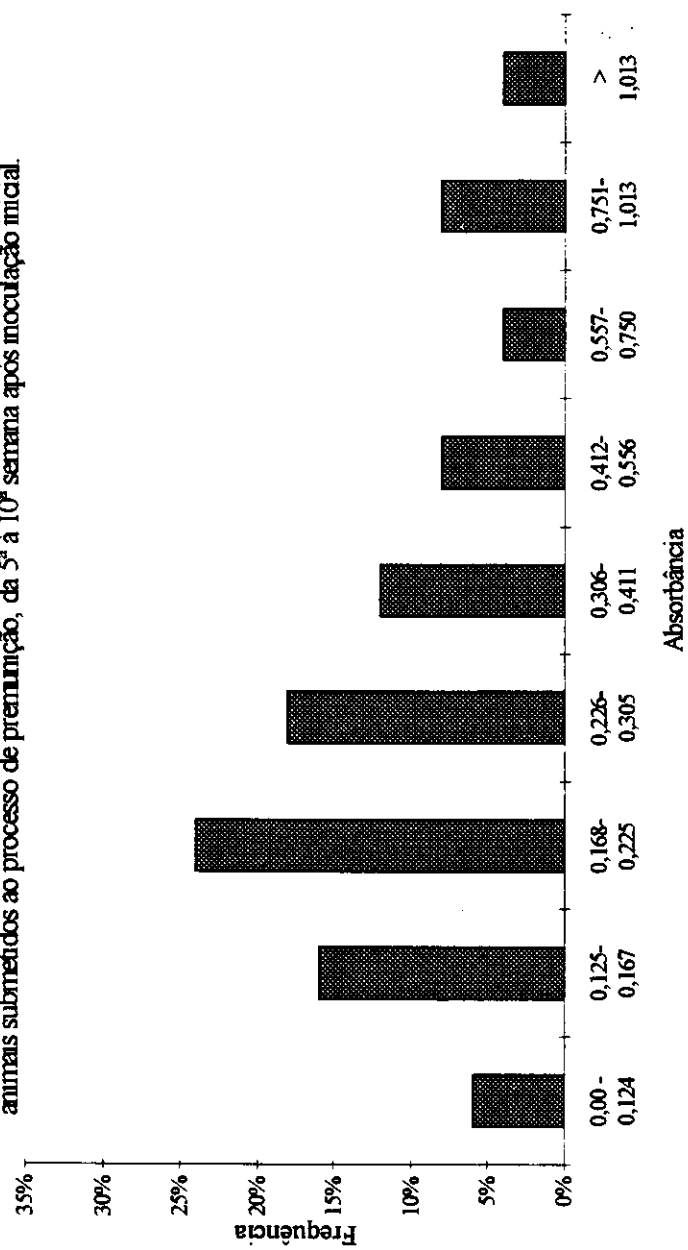
A discriminação entre soros dos animais importados de áreas livres de carrapatos, antes de receberem a primeira inoculação, e os

infectados com os diferentes tipos de inóculos, no processo de premunicação, foi alcançada no procedimento para ambas as preparações antigênicas brutas das duas espécies de *Babesia*.

4.3 Perfil da resposta imune humoral (IgM) de animais submetidos ao processo de premunicação.

Através do teste de ELISA indireto, demonstrou-se a variação da resposta humoral de anticorpos IgM anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em bovinos imunizados com diferentes inóculos. As medianas dos valores de absorbância ⁻¹ de IgM dos animais submetidos ao processo de premunicação estão apresentadas nos gráficos 1 e 3.

Gráfico 4 - Distribuição da frequência de valores de absorbância de IgM para *B. bigemina* de animais submetidos ao processo de premunicação, da 5ª à 10ª semana após inoculação inicial.



O perfil sorológico destes animais não apresentou valores de absorbância de distribuição normal, sendo então avaliados por testes estatísticos não paramétricos (Stell & Torrier, 1960; Savigny & Voller, 1980).

4.3.1 Resposta imune humoral para *B. bovis*.

As medianas dos valores de absorbâncias anti-*B. bovis* foram 0,222, 0,219 e 0,333 para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Estes valores apresentaram variação entre os diferentes grupos de animais (Gráf. 1)).

4.3.1.1 Animais do grupo nº.1, infestados com larvas de *B. microplus*.

Os animais apresentaram-se com valores de absorbância negativos durante as três primeiras semanas, com exceção de alguns animais que se apresentaram positivos no 7º ou 13º dia após inoculação inicial.

A soroconversão geral ocorreu a partir do 19º dia, após inoculação inicial. Os animais apresentaram-se com valores de absorbância positivos até o término do experimento, havendo, porém, queda progressiva a partir do 75º dia após inoculação inicial.

O maior valor de absorbância ocorreu no 33º dia após inoculação inicial (1,027).

Ocorreu variação nos valores de absorbâncias entre os animais que receberam o mesmo tipo de inóculo, em decorrência à variação individual e/ou até mesmo pelo pequeno número de animais utilizados no experimento, não propiciando maior confiabilidade nos resultados.

4.3.1.2 Animais do grupo n°2, inoculados com *Babesia* spp.

Os animais apresentaram-se com valores de absorbância negativos durante as três primeiras semanas, com exceção de um animal (número 1188), que apresentou soroconversão no 8° dia após inoculação inicial, alcançando valor máximo de 0,886, ocorrendo decréscimo em seguida; no entanto, estes valores permaneceram positivos até o final do experimento.

Os animais apresentaram soroconversão a partir do 19° dia após inoculação inicial. A data precisamente não foi possível detectar, porque do 19° ao 26° dias após inoculação inicial, não foram feitas colheitas de amostras de soros diários, sendo observado, que na primeira colheita semanal (26° dias após inoculação inicial e na data do desafio), todos os animais apresentavam-se positivos.

Os animais apresentaram-se soropositivos até o término do experimento, havendo, porém, queda progressiva nesses valores.

4.3.1.3 Animais do grupo n°3, inoculados com *B. bovis*.

A soroconversão geral foi alcançada no final da segunda semana, após a primeira inoculação (11° dia). O maior valor de absorbância encontrado no grupo (1,006) ocorreu no 33° dia após inoculação inicial e sete dias após desafio com sangue.

Os animais apresentaram-se soropositivos até o término do experimento, havendo, porém, queda progressiva a partir do 40° dia após inoculação inicial, voltando a aumentar os valores de absorbâncias no 82° dia após inoculação, e decaindo os valores novamente até o término do trabalho.

4.3.2 Resposta imune humoral para *B. bigemina*.

As medianas dos valores de absorbâncias anti-*B. bigemina* foram 0,147 e 0,095 para os grupos 1 e 2, respectivamente. Estas medianas dos valores de absorbância variaram entre os dois diferentes grupos para *B. bigemina* (Gráf. 3).

4.3.2.1 Animais do grupo nº.1, infestados com larvas de *B. microplus*.

A soroconversão nos animais ocorreu na segunda semana após inoculação inicial. A partir desta data, os valores de absorbância aumentaram, atingindo o maior valor no 33º dia após infecção inicial (1,266). Em seguida, os valores foram decaindo progressivamente até o final do experimento. Os animais, porém, apresentaram-se positivos com valores próximos ao do "cut off".

O perfil sorológico desses animais diferem daqueles observados por O'Donoghue et al. (1987). Avaliando um bezerro infectado com estabilizado criopreservado de *B. bigemina*, originado de carrapato adulto *B. microplus*, os autores encontraram os primeiros anticorpos IgM, sete dias após infecção experimental. O pico de intensidade ocorreu de doze a 22 dias após infecção e declinou em níveis baixos 28 dias após infecção.

4.3.2.2 Animais do grupo nº.2, inoculados com *Babesia* spp.

A soroconversão dos animais deste grupo foi observada a partir da quarta semana após inoculação inicial. A soroconversão em alguns animais ocorreu anteriormente, no 8º ou 17º dias após inoculação inicial.

A partir desta data, os valores de absorbância dos animais permaneceram positivos, porém com redução progressiva,

apresentando menores valores do 54º ao 82º dias após inoculação inicial. Logo após, tornaram-se novamente positivos.

Os menores valores de absorvância foram encontrados neste grupo, quando comparados com o grupo 1, infestado com larvas de *B. microplus*.

Os maiores valores de absorvâncias foram encontrados no procedimento usando o antígeno de *B. bovis*. Esse fato provavelmente está relacionado com a preparação antigênica bruta, por ter contaminantes de eritrócitos do hospedeiro, ou mesmo pelo fato dos animais responderem com valores de absorvâncias maiores para esta espécie.

Há vários fatores referentes ao curso inicial e subsequente da infecção por *Babesia*, os quais podem alterar o desenvolvimento da resposta imune. No presente trabalho, para a imunização do grupo 1, com as preparações antigênicas de *B. bovis* e *B. bigemina*, foram usadas larvas de *B. microplus* infectadas por *Babesia*. Nos demais grupos utilizaram sangue infectado por *Babesia* spp, criopreservado. Nas condições naturais a campo, assim como o esquema de imunização usado no grupo 1 do experimento, em que os carrapatos apresentaram o estágio infectante da *Babesia*, o esporozoíto, a resposta imune é diferenciada da resposta imune nos animais dos grupos 2 e 3, onde essa resposta está direcionada contra os estágios do parasito no sangue, trofozoítos e merozoítos, a qual são as formas presentes no inóculo.

Segundo Brown (1991), o desenvolvimento de resposta imune celular para *B. bovis* é diferencial de acordo com a fonte do inóculo utilizada, parasitos derivados de carrapatos ou merozoítos. Consequentemente a este fato, torna-se possível a ocorrência do desenvolvimento de resposta imune humoral também diferencial, de acordo com o tipo de inóculo. Outra diferença entre a infecção artificial do presente estudo e a infecção natural a campo é que, em

áreas endêmicas, os animais estão sob constantes situações de desafio pelos carrapatos. Isto contribui para o desenvolvimento de uma forte resposta imune, não necessitando assim de inoculações em intervalos determinados como nas inoculações artificiais.

No presente estudo os dois grupos testados em ambas as preparações antigênicas brutas (grupo 1, infestado com larvas de *B. microplus* e grupo 2, inoculado com *Babesia* spp.) demonstraram a mesma proporção de animais negativos durante o processo de premunicação, ou seja, resposta imune semelhante, independentemente do tipo de inóculo e qual espécie envolvida. Em áreas endêmicas, onde as infecções pelas duas espécies ocorrem juntamente, a taxa de inoculação de *B. bigemina* é frequentemente maior que aquela de *B. bovis* (Miller et al., 1984).

4.4 Análise estatística

4.4.1 Grupos testados com preparação antigênica de *B. bovis*.

Para *B. bovis*, os resultados da comparação estatística entre os diferentes tipos de inóculos nos determinados períodos de coleta, apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), nos 1º e 5º dias após inoculação inicial do grupo 1, infestado com larvas de *B. microplus*, em relação aos grupos, inoculados com *Babesia* spp. e *B. bovis*, respectivamente. Nesse sentido, a resposta imune humoral destas colheitas, foram significativamente maior quando comparadas com os outros grupos. Este fato pode ser atribuído a uma quantidade maior de anticorpos produzidos, que pode ser devida à variação individual. Entretanto estes valores permaneceram dentro dos valores de absorbâncias negativos.

As outras datas das colheitas não apresentaram diferença significativa até o 14º dia após inoculação inicial. A partir desta data o grupo 3 apresentou diferença significativa do 26º ao 82º dia após inoculação inicial, demonstrando que os animais deste grupo

apresentaram aumento dos valores de absorbância, e assim os animais deste grupo apresentaram resposta imunológica maior que os grupos 1 e 2.

A partir do 82º até o 96º dia após inoculação inicial, o grupo 2 apresentou valores de absorbância com diferença significativa, e estes animais responderam com valor menor que a dos grupos 1 e 3. Nos animais deste grupo foram verificados menores valores de absorbância.

A partir do dia 96º até o final do experimento, os grupos não apresentaram diferença estatística significativa.

4.4.2 Grupos testados com preparação antigênica de *B. bigemina*.

Durante as duas primeiras semanas do experimento, após inoculação inicial, houve diferença significativa, nos 3º, 5º e 11º dias após inoculação inicial entre os dois grupos, infestado com larvas de *B. microplus* e inoculado com *Babesia* spp, podendo ser devido aos maiores valores de absorbância encontrados. Este fato pode ser atribuído à variação individual, havendo nos dias seguintes um decréscimo nestes valores. Esta variação dos valores, apesar de ter apresentado diferença estatística significativa, não interferiram no estado do animal, pois com o aumento os valores não atingiram o valor do "cut off" e, portanto, mesmo com o aumento, estes valores permaneceram negativos.

No 19º dia após inoculação inicial houve diferença significativa. Neste período os animais já apresentaram valores positivos em relação ao "cut off" sendo nesta data o inóculo do grupo 1 (larvas de *B. microplus*) apresentando maior produção de anticorpos em relação ao grupo 2 (inóculo de *Babesia* spp), o mesmo observado ao 68º dia após inoculação inicial.

Nos demais períodos após inoculações iniciais, os dois tipos de inóculos não apresentaram estatisticamente diferença significativa. Sendo assim, proporcionaram uma mesma resposta imune aos animais, ou seja, os animais apresentaram com os diferentes inóculos perfis sorológicos semelhantes.

5 CONCLUSÃO

O teste de ELISA utilizando o sistema biotina - avidina é um método simples e apropriado para detecção de anticorpos IgM contra *B. bovis* e *B. bigemina*, com alta especificidade e sensibilidade.

SUMMARY

ELISA tests (biotin/avidin system) using crude antigenic preparations were standardized for the detection of antibodies IgM against *B. bovis* and *B. bigemina*. Optimal dilutions of antigens, positive and negative reference sera and conjugate were determined by checkerboard titrations. Serum samples of cattle imported from tick-free areas collected before and during a immunization process were tested. Cut-off values (0,223 e 0,124 for *B. bovis* e *B. bigemina*, respectively) were calculated by the mean absorbance of negative sera plus twice their standard deviation. Specific IgM antibodies against *B. bovis* first appeared at the 11° day post-inoculation (p.i.) in animals infested with *Boophilus microplus* ticks and at the 19° day p.i. in animals which had been inoculated with blood. Antibody titers decreased after day 33, however all animals remained positive until the end of the experiment (124 days). A similar antibody curve was observed against *B. bigemina* although the first antibodies were detected at the 14° day p.i. in animals infested with *B. microplus* ticks.

Key-words: *Babesia bovis*, *B. bigemina*, ELISA, IgM, preimmunization

6 APÊNDICE

6.1 Reagentes e soluções

- Solução Cloreto de amônio/Tampão Tris

Solução cloreto de amônio 0,83%. A nove volumes desta solução adicionar um volume de tampão Tris 0,17M pH 7,65. Aquecer a solução em banho maria a 37°C.

- Solução salina estéril 0,85%

PO ₄ HNa ₂	12 g
PO ₄ H ₂ NaH ₂ O	2,2 g
CINa	85,0 g
H ₂ O destilada qsq	1,0 l

- Solução de PBS pH 7,2

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
H ₂ O destilada qsq	1,0 l
Tween 80	Adicionar 0,5 ml para cada litro da solução.

- Solução de PBS pH 7,2, com inibidores de proteases

Solução PBS

PMSF	8,6 mg
TPCK	2,5 mg
TLCK	1,2 mg
EDTA	0,07 g
H ₂ O	100 ml

Dissolver o PMSF, o TPCK e o TLCK em 1 ml de etanol.

- Solução de Alsever pH 6,1

Dextrose	20,5 g
Citrato trissódico bihidratado	8,0 g
Ácido cítrico monohidratado	0,75 g
NaCl	4,2 g
H ₂ O destilada qsq	1,0 l.

- Solução tampão pH 9,6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
H ₂ O destilada	1,0 l

- Solução tampão substrato pH 5,0

Na ₂ HPO ₄	7,19 g
Ácido cítrico	5,19 g
H ₂ O destilada	1,0 l



- Substrato OPD (ortofenilenodiamino)

O substrato foi preparado anteriormente ao uso em frasco escuro, coberto com papel alumínio.

Solução tampão substrato	1,0 ml
OPD	0,2 mg
H ₂ O ₂ (30 vol.)	0,2 µl

6.2 Resultados de ELISA

6.2.1 Valores de absorbância de soros de animais importados de áreas livres de carrapatos, que foram colhidos logo após a chegada dos animais nas fazendas, usados para determinação do "Cut off".

Fazenda	<i>Babesia bigemina</i>		<i>Babesia bovis</i>	
	S.T.	V.A.	S.T.	V.A.
CANA	0,003	0,017	0,054	0,091
CANA	0,022	0,022	0,079	0,124
CANA	0,007	0,018	0,051	0,087
CANA	0,016	0,020	0,043	0,077
CANA	0,040	0,027	0,072	0,115
CANA	0,026	0,023	0,064	0,104
CANA	0,035	0,025	0,072	0,115
CANA	0,472	0,149	0,118	0,118
CANA	0,373	0,094	0,077	0,077
CANA	0,353	0,083	0,028	0,028
CANA	0,446	0,135	0,042	0,042
CANA	0,482	0,155	0,116	0,116
CANA	0,334	0,073	0,062	0,062
CANA	0,091	0,049	0,031	0,031
CANA	0,129	0,096	0,171	0,171
CANA	0,163	0,139	0,094	0,094
CANA	0,119	0,084	0,160	0,160

Continuação

Fazenda	<i>Babesia bigemina</i>		<i>Babesia bovis</i>	
	S.T.	V.A.	S.T.	V.A.
CANA	0,119	0,084	0,094	0,094
Mata Velha	0,057	0,031	0,094	0,143
Mata Velha	0,050	0,029	0,079	0,124
Mata Velha	0,029	0,024	0,084	0,130
Mata Velha	0,050	0,029	0,121	0,179
Mata Velha	0,066	0,033	0,123	0,181
Mata Velha	0,023	0,022	0,091	0,139
Mata Velha	0,000	0,016	0,116	0,172
Mata Velha	0,014	0,020	0,086	0,133
Mata Velha	0,013	0,020	0,070	0,112
Mata Velha	0,045	0,028	0,117	0,173
Mata Velha	0,039	0,026	0,110	0,164
Mata Velha	0,023	0,022	0,088	0,135
Mata Velha	0,054	0,035	0,083	0,117
Mata Velha	0,105	0,065	0,026	0,069
Mata Velha	0,186	0,112	0,162	0,187
Mata Velha	0,164	0,099	0,132	0,160
Pindobas	0,022	0,022	0,066	0,107
Pindobas	0,036	0,026	0,097	0,147
Pindobas	0,027	0,023	0,087	0,134
Pindobas	0,103	0,043	0,160	0,229
Pindobas	0,059	0,031	0,186	0,263
G.D. Lima	0,028	0,023	0,113	0,143
G.D. Lima	0,035	0,025	0,003	0,047
G.D. Lima	0,062	0,032	0,132	0,160
G.D. Lima	0,034	0,025	0,027	0,067
G.D. Lima	0,044	0,028	0,033	0,073
G.D. Lima	0,032	0,024	0,078	0,112

Continuação

Fazenda	<i>Babesia bigemina</i>		<i>Babesia bovis</i>	
	S.T.	V.A.	S.T.	V.A.
G.D. Lima	0,022	0,022	0,000	0,044
G.D. Lima	0,099	0,042	0,154	0,179
G.D. Lima	0,099	0,042	0,074	0,212
G.D. Lima	0,045	0,028	0,191	0,109
G.D. Lima	0,103	0,043	0,115	0,145

6.2.2 Valores de absorvância de soros (IgM) de animais importados, submetidos ao processo de premunicação, que foram colhidos em períodos determinados, após inoculação inicial, usados para determinação da sensibilidade do teste de ELISA para *B. bovis*.

Nº animal	P.I.	S.T.	V.A.	N.E
1032 ¹	33	0,729	0,977	6
1050 ¹	33	0,769	1,027	7
1072 ¹	33	0,671	0,671	6
1127 ¹	33	0,439	0,613	4
1143 ¹	33	0,168	0,273	1
1032 ¹	40	0,845	0,845	6
1050 ¹	40	0,918	0,918	6
1072 ¹	40	0,590	0,590	4
1127 ¹	40	0,409	0,409	3
1143 ¹	40	0,638	0,638	4
1032 ¹	47	0,210	0,326	2
1050 ¹	47	0,297	0,435	3
1072 ¹	47	0,740	0,763	7
1127 ¹	47	0,295	0,433	3

1 - Grupo de animais infestados com larvas de *B. microplus*

2 - Grupo de animais inoculados com sangue (*Babesia* spp)

Continuação

Nº animal	P.I.	S.T.	V.A.	N.E
1143 ¹	47	0,669	0,901	6
1032 ¹	54	0,328	0,474	3
1050 ¹	54	0,224	0,344	2
1072 ¹	54	0,618	0,674	6
1127 ¹	54	0,396	0,559	4
1143 ¹	54	0,653	0,881	6
1032 ¹	61	0,521	0,716	4
1050 ¹	61	0,171	0,277	1
1072 ¹	61	0,469	0,651	4
1127 ¹	61	0,209	0,325	2
1143 ¹	61	0,515	0,708	4
1032 ¹	68	0,425	0,596	4
1050 ¹	68	0,232	0,354	2
1072 ¹	68	0,424	0,594	4
1127 ¹	68	0,354	0,507	3
1143 ¹	68	0,423	0,593	4
1032 ¹	75	0,431	0,603	4
1050 ¹	75	0,298	0,436	3
1072 ¹	75	0,308	0,449	3
1127 ¹	75	0,366	0,522	3
1143 ¹	75	0,307	0,448	3
1166 ²	33	0,246	0,616	4
1188 ²	33	0,070	0,239	1
1208 ²	33	0,500	1,161	7
1260 ²	33	0,258	0,642	4
1294 ²	33	0,382	0,908	6
1166 ²	40	0,165	0,443	3
1188 ²	40	0,108	0,320	2
1208 ²	40	0,271	0,670	4
1260 ²	40	0,146	0,402	2
1294 ²	40	0,212	0,543	3

Continuação

Nº animal	P.I.	S.T.	V.A.	N.E
1166 ²	47	0,159	0,430	3
1188 ²	47	0,337	0,811	6
1208 ²	47	0,223	0,567	4
1260 ²	47	0,192	0,500	3
1294 ²	47	0,144	0,398	2

6.2.3 Valores de absorbância de soros (IgM) de animais importados, submetidos ao processo de premunicação, que foram colhidos em períodos determinados, após inoculação inicial, usados para determinação da sensibilidade do teste de ELISA para *B. bigemina*.

Nº animal	P.I.	S.T.	V.A.	N.E
1032 ¹	33	0,934	1,250	8
1050 ¹	33	0,946	1,266	8
1072 ¹	33	0,247	0,340	4
1127 ¹	33	0,426	0,577	6
1143 ¹	33	0,195	0,195	2
1032 ¹	40	0,831	0,831	7
1050 ¹	40	0,910	0,910	7
1072 ¹	40	0,206	0,206	2
1127 ¹	40	0,300	0,300	3
1143 ¹	40	0,255	0,255	3
1032 ¹	47	0,831	0,831	7
1050 ¹	47	0,646	0,646	6
1072 ¹	47	0,192	0,192	2
1127 ¹	47	0,208	0,208	2
1143 ¹	47	0,195	0,195	2
1032 ¹	54	0,848	0,848	7
1050 ¹	54	0,276	0,276	3
1072 ¹	54	0,281	0,281	3
1127 ¹	54	0,180	0,180	2

Continuação

Nº animal	P.I.	S.T.	V.A.	N.E
1143 ¹	54	0,143	0,143	1
1032 ¹	61	0,515	0,515	5
1050 ¹	61	0,295	0,295	3
1072 ¹	61	0,153	0,153	1
1127 ¹	61	0,397	0,397	4
1143 ¹	61	0,114	0,114	0
1032 ¹	68	0,359	0,359	4
1050 ¹	68	0,213	0,213	2
1072 ¹	68	0,099	0,099	0
1127 ¹	68	0,366	0,366	4
1143 ¹	68	0,133	0,133	1
1032 ¹	75	0,206	0,206	2
1050 ¹	75	0,160	0,160	1
1072 ¹	75	0,144	0,144	1
1127 ¹	75	0,307	0,307	4
1143 ¹	75	0,135	0,135	1
1166 ²	33	0,612	0,224	3
1188 ²	33	0,324	0,061	0
1208 ²	33	1,076	0,487	5
1260 ²	33	0,681	0,263	3
1294 ²	33	0,997	0,442	4
1166 ²	40	0,454	0,135	1
1188 ²	40	0,626	0,232	2
1208 ²	40	0,902	0,388	4
1260 ²	40	0,608	0,222	2
1294 ²	40	0,563	0,196	2
1166 ²	47	0,452	0,134	1
1188 ²	47	0,967	0,425	5
1208 ²	47	0,677	0,261	3
1260 ²	47	0,666	0,255	3
1294 ²	47	0,607	0,221	2

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, M., ARELLANO-SOTA, C., CERESER, V.H., CORDOVES, C.O., GUGLIELMONE, A.A., KESSLER, R., MANGOLD, A.J., NARI, A., PATARROYO, J.H., SOLARI, M.A., VEGA, C.A., VIZCAÍNO, O., CAMUS, E. Epidemiology of babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.11, n.3, p.713-733, 1992.
- BABES, V. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. *C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci.*, v.107, p.692-694, 1888.
- BARRY, D.N., RODWELL, B.J., TIMMIS, P., MCGREGOR, W. A microplate enzyme immunoassay for detecting and measuring antibodies to *Babesia bovis* in cattle serum. *Aust. Vet. J.*, v.59, p.136-140, 1982.
- BIDWELL, D.E., TURP, P., JOYNER, L.P., PAYNE, R.C., PURNELL, R.E. Comparison of serological tests for babesiosis in British cattle. *Vet. Res.*, v. 103, p. 446-449, 1978.
- BÖSE, R., JACOBSON, R.H., GALE, K.R., WALTISBUHL, D.J., WRIGHT, I.G. An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinant *B. bovis* antigen. *Parasitol. Res.*, v.76, p.648-652, 1990.
- BÖSE, R., JORGENSEN, R.J., DALGLIESH, K.T., FRIEDHOFF, K.T., de VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.*, n.57, p. 61-74, 1995.

BRASIL, A.G., MONMANY, L.F., SÁ, M.L.G., SÁ, N.F.
Premunção contra a tristeza parasitária a campo. *A Hora Veterinária*, n.10, nov/dez, p.4-8, 1982.

BROWN, W.C., LOGAN, K.S., WAGNER, G.G., TETZLAFF, C.L.
Cell-mediated immune responses to *Babesia bovis* merozoite antigens in cattle following infection with tick-derived or cultured parasites. *Infect. Immun.*, v.59, p.2418-2426, 1991.

CORRIER, D.E., GONZALES, E.F., BETANCOURT, A. Current information on the epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Colômbia. In: *Tick borne diseases and their vectors*, ed. J.K.H.Wilde, Lewis Reprints, Tonhidge, p.114-120, 1978.

DALGLIESH, R.J & STEWARD, N.P. Some effectes of time, temperature and feeding ou infection rates with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus* larvae. *Int. J. Parasitol.*, v.12, p.323-326, 1982.

ENGVAL, 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.

FAO/WHO/OIE. Animal Health Yearbook, 1995. v.8, n.1/2. Kouba (Editor), FAO, Rome, 1995.

FARJADO, F. A piroplasmose bovina no Rio de Janeiro. *Rev. Med.*, v.4, p.18-30, 1901.

GOFF, W.L., WAGNER, G.C., CRAIG, T.M., LONG, R.F. The bovine immune response to tick-derived *Babesia bovis* infection: serological studies of isolated immunoglobulins. *Vet. Parasitol.*, v.11, p.109-120, 1982.

GOODGER, B.V. Preparation and assessment of purified antigens in the passive haemagglutination test for bovine babesiosis. *Aust. Vet.*, v. 47, p. 251-255, 1971.

GOODGER, B.V., WRIGHT, I.G., WALTISBUHL, D.J. *Babesia bovis*: the effect of acute inflammation and isoantibody production in the detection of babesial antigens. *Experientia*, v.41, p.1577-1579, 1985.

IICA. Técnicas para el diagnóstico de babesioses e anaplasmoses bovinas. San José, Costa Rica, 79p., 1987.

JAMES, M.A., CORONADO, A., LOPEZ, W., MELENDEZ, R., RISTIC, M. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v.17, p.9-18, 1985.

KESSLER, R.H., FERNANDES, R.E., DUTRA, V., CHAPLIN, E.L. Ocorrência de babesiose cerebral por *Babesia bovis* em bezerros no Rio Grande do Sul. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.8, p.163-168, 1980.

KESSLER, R.H., MADRUGA, C.R., SHENCK, M.A.M., RIBEIRO, O.C. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* (Babes, 1888, Starcovici, 1983) em bezerros do estado do Mato Grosso do Sul. *Pesq. Agrop. Bras.*, v.22, p.1225-1230, 1983.

KESSLER, R.H., MADRUGA, C.R., JESUS, E.F., SEMPREBOM, D.V., VIEIRA-SEMPREBOM, D. Isolation of pure strains of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*: preliminary test. *Pesq. Agrop. Bras.*, v.22, p.1225-1230, 1987.

- KESSLER, R.H., SASTRE, A.M., MOREIRA, M.A., MADRUGA, C.R., HONER, M.R. Experiencias con vacunas vivas atenuadas de *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma centrale* conservadas por congelación en Brasil. *Rev. Cub. Cienc. Vet.*, v.22, n.3, p.189-196, 1991.
- KUTTLER, K.L. Word-wide impact of babesiosis. In RISTIC, M. *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC Press. Boca Raton, Flórida, p. 2-22, 1988.
- LANE, D. *Antibodies. A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 726 p., 1988.
- LEEFLANG, P. & PERIÉ, N.M. Comparative imunofluorescent studies on 4 *Babesia* species of cattle. *Res. Vet. Sci.*, v.13, p.342-346, 1972.
- LEVINE, L.D. *The protozoan phylum Apicomplexa*. CRC Press, Boca Raton, Flórida, p.435, 1988.
- LIMA, J.D. Premunção: uma alternativa para o controle da tristeza parasitária. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. São Paulo, 22-26 de setembro, 1991. *Anais...* p.39-43, 156p., São Paulo, 1991.
- MACHADO, R.Z. *Estudo de imunidade celular e humoral na babesiose bovina*. Jaboticabal: Universidade Estadual de São Paulo, 1991. 150p. Tese (Livre Docência).
- MACHADO, R.Z., VALADÃO, C.A.A., MELO, W.R., ALESSI, A.C. Isolation of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* merozoites by ammonium chloride of infected erythrocytes. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, v.27, p.2591-2598, 1994.

- MADRUGA, C.R., AYCARDI, E., PUTT, N. Epidemiologia da anaplasmosse e babesiose em bovinos da região do cerrado do estado do Mato Grosso do Sul. I. Prevalência. *Arq. Bras. Med. Vet Zoot*, v.35, n.35, p.631-640, 1983.
- MADRUGA, C.R., AYCARDI, E., KESLLER, R.M., SCHENK, M.A.M., DE FIGUEIREDO, G.R., CUIRVO, J.B.E. Níveis de anticorpos anti *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.19, p.1163-1168, 1984.
- 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.
- MAHONEY, D.F. Bovine babesiosis: an assessment of the significance of complement fixing based upon experimental infection. *Aust. Vet. J.*, v.40, p. 369-375, 1964.
- MAHONEY, D.F. & MIRRE, G.B. A note transmission of *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*) by the one-host tick, *Boophilus microplus*. *Res. Vet. Sci.*, v.26, p.253-254, 1979.
- MAHONEY, D.F. & ROSS, D.R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.*, v.48, n.5, p. 292-298, 1972.
- MAHONEY, D.F., WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V. Immunity in cattle to *Babesia bovis* after single infections with parasites of various origin. *Aust. Vet. J.*, v.55, p.10-12, 1979.
- MAHONEY, D.F. Prospects for an antibabesial vaccine. In: *Babesiosis*. Academic Press, New York. p.555-562, 1981.

- MARTIN, W.J., FINERTY, J., ROSENTHAL, A. Isolation os *Plasmodium berghei* (malária) parasites of ammonium choride lysis of infected erythrocytes. *Nature New Biol.*, v.67, p.260-261, 1971.
- MARTINS, J.R., CORREA, B.L., CERESÉR, V.H., ARTECHE, C.C.P., GUGLIELMONE, A.A. Some aspects of the epidemiology of *Babesia bovis* in Santana do Livramento, Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.3, n.2, p.75-78, 1994.
- McCOSKER, P.J. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M., KRIER, P.J. *Babesiosis*. Academic Press, New York. p.1-24, 1981.
- MILLER, D.K., DIAL, O., CRAIG, T.M., WAGNER, G.G. Serological prevalence of bovine babeiosis in Mali. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v.16, p.71-77, 1984.
- NOGUEIRA, F.R.C., MASSARD, C.L., BARREIRA, J.D. Tristeza parasitária bovina. Epidemiologia, sinais clínicos, diagnóstico, medidas de controle e profilaxia. Min. Agric., EMBRAPA - PESAGRO - RIO, Circ. Téc., n.12, 14 p., 1991.
- O'DONOGHUE, K.T., FRIEDHOFF, O.G., VIZCAINO, O.G., WEYRETER, H. The detection of IgM and IgG antibodies against *Babesia bigemina* in bovine sera using semi-defined antigens in enzyme imunoassays. *Vet. Parasitol.* v.18, p.1-12, 1985.

- OLIVEIRA, J.B., MADRUGA, C.R., MASSARD, J.M., ROCHA, J.M., MENDONÇA, C., BASTOS, J.A., MACHADO, E.H.L., ALVES, L.C. Avaliação do desempenho dos testes de imunofluorescência indireta e de congutinação rápida em animais premunidos contra *Babesia bovis*. *Rev. Bras. Parasit. Vet.*, v.4, n.2, supl.1, p.199, 1995.
- PASSOS, L.M.F. Immunological studies on bovine babesiosis with particular reference to Brazil, using *in vitro* cculture-derived antigens. Edinburgh: Centre for Tropical Veterinary Medicine, 1993. 326p. (Tese de Doutorado).
- PATARROYO, J.H. VARGAS, M.I., BICUDO, P.L. Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brasil. *Vet. Parasitol.*, v.11, p.301-308, 1982.
- PATARROYO, J.H., RIBEIRO, M.F.B., SANTOS, J.L., FARIA, J.E. Epidemiologia das babesioses bovinas no estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.39, n.3, p.422-29, 1987.
- PATARROYO, J.H. *Babesia bovis* (Babes, 1888, Starcovici, 1893) Caracterização, Identificação e Purificação de exoantígenos obtidos de culturas "in vitro". Vacinação Experimental de bovinos. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas-UFMG, 1990. 217p. (Tese de Doutorado).
- 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.
- RICHARDSON, M.D., TURNER, A., WARNOCK, D.W., LLEWELLYN, P.A. Computer-assisted rapid enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serological diagnosis of aspergillosis. *J. Immunol. Meth.*, v.56, p.201-207, 1983.

- 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.
- SAVIGNY, D. & VOLLER, A. The communication of ELISA data from laboratory to clinican. *J. Immun.*, v.1, n.1, p.105-128, 1980.
- SMITH, T. & KILBORNE, F.L. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. *USDA Bu.r Anim. Ind. Bull.*, v.1, p. 7-269, 1893.
- STELL, R.G.D. & TORRIER, J.H. Principles and producedures of statistics. New York, McGraw-Hill Book Company, 481 p., 1960.
- TODOROVIC. R.A. & LONG, R.F. Comparison of indirect fluorescent antibody (I.F.A.) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia* spp. Infection in Colombia cattle. *Tropenmed. Parasitol.*, v.27: p 169-81, 1976.
- UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet. Parasitol.*, v.57, p. 19-41, 1995.
- VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D.E. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.70, p.98-106, 1976.
- WALTISBUHL, D.J., GOODGER, B.V., WRIGHT, I.G., COMMINS, M.A., MAHONEY, D.F. An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitol. Res.*, v. 73, p. 126-131, 1987.



- WEILAND, G. & REITER, I. Methods for the measurement of the serological response to *Babesia*. In RISTIC, M. *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC Press. Boca Raton, Flórida, p.143-162, 1988.
- WILCHEK, M. & BAYER, E.A. The avidin-biotin complex in immunology. *Immunol. Today*, v.5, n.2, p.39-43, 1984.
- WILSON, R.A., CHARLES PERROTTA, Jr., ECKROADE, R.J. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay that Measures Proctive Antibody Levels to Newcastle Disease Virus in Chickens. *Avian Diseases*, v.28, n.4, p.1079-1085, 1984.
- WOODFORD, J.F., JONES, T.W., RAE, P.F., BOID, R., BELL-SAKYI, L. Seroloepidemiological studies of bovine babesiosis on Pemba Island, Tanzania. *Vet. Parasitol.*, v.37, p.175-184, 1990.
- WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V., LEATCH, G., AYLWARD, J.H., RODE-BRAMANIS, K., WALTISBUHL, D.J. Protection of *Babesia bigemina* - immune animals against subsequent challenge with virulent *Babesia bovis*. *Infect. Immun.*, v.55, n.2, p.364-368, 1987.
- WRIGHT, I.G. Immunodiagnosis of and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp and *Anaplasma* sp in domestic animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.9, n.2, p.345-356, 1990.
- WRIGHT, P.F., NILSSON, E., VAN ROOIJ, E.M.A., LELENTA, M., JEGGO, M.H. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.12, n.2, p.435-450, 1993.