

## EXAMES SOROEPIDEMIOLÓGICOS DA BABESIOSE BOVINA (*Babesia bovis*) ATRAVÉS DE UM TESTE ELISA INDIRETO NO ESTADO DO PARÁ<sup>1</sup>

Francisco V. A. de LIMA<sup>2</sup>  
Éva MOLNÁR<sup>3</sup>  
László MOLNÁR<sup>3</sup>  
Cândida M. S. SILVA<sup>4</sup>

**RESUMO:** Em 31 rebanhos de onze municípios do Estado do Pará, foram colhidas 1 330 amostras de soro para examinar a prevalência de infecção por *Babesia bovis*. Utilizaram-se 105 amostras procedentes do matadouro, de rins e de sangue de animais clinicamente sadios para demonstração direta do parasita através de impressão e esfregaço sanguíneo corados com Giemsa. As amostras de soro foram examinadas através do método ELISA indireto (FAO/IAEA, Vienna). Das 105 amostras preparadas por impressão renal e esfregaço sanguíneo, apenas oito (7,62 %) lâminas de impressão renal resultaram positivas. Das 1 330 amostras de soro, 700 foram positivas, representando 52,63 % de soroprevalência. Embora a soropositividade tenha variado entre 5 e 100 % nos rebanhos estudados, foi encontrado 64,52% (20/31) dos rebanhos em situação de instabilidade enzoótica. Examinando os resultados, segundo a faixa etária, concluiu-se que a proporção da infecção aumenta com o avançar da idade, 6 a 12 meses de idade: 23,61 %; 1 a 2 anos de idade: 31,09 %; 2 a 4 anos de idade: 46,96 %; e maior de 4 anos de idade: 59,89 %. Diante dos resultados apresentados, fica evidenciado que a técnica de ELISA é apta para efetuar exames soropidemiológicos em massa em qualquer território.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** Babesiose Bovina, *Babesia bovis*, ELISA, Estado do Pará.

## SEROEPIDEMIOLOGICAL STUDY OF BOVINE BABESIOSIS (*B. bovis*) BY AN INDIRECT ELISA TEST IN THE STATE OF PARÁ, BRAZIL

**ABSTRACT:** From a total of 31 herds of 11 municipal districts of the Pará State, were collected 1330 samples of blood serum to estimate the prevalence of *Babesia bovis* infection, 105 samples of blood and kidneys from clinically healthy animals were also collected for direct demonstration of the parasite by staining thin bloodsmears and renal smears with Giemsa's. The serum samples were examined by an indirect ELISA test (FAO/IAEA, Vienna). Eight (7,62 %) of the 105 renal smears collected at slaughter-houses were positive. From the 1 330 serum samples, 700 were positive with a prevalence of 52,63 %. In all the herd there were serum-positive animals and the prevalence of serum-positivity ranged between 5 and 100 %. 64,52% (20/31) of the herds were in enzootic instability. Dividing in age groups the following results were obtained: 6 to 12 months of age: 23,61 %; 1 to 2 years old: 31,09 %; 2 to 4 years old: 46,96 %; > 4 years old: 59,89 %, concluding that the infection rate rises with age. The ELISA test is suitable to make seroepidemiological studies of livestock.

**INDEX TERMS:** Bovine Babesiosis, *Babesia bovis*, ELISA, Pará-State.

<sup>1</sup> Aprovado para publicação em 10.03.2000

<sup>2</sup> Médico Veterinário, Aluno de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFPa.

<sup>3</sup> Médico Veterinário, Professor Visitante da UFPa/CNPq.

<sup>4</sup> Médica Veterinária Autônoma.

## 1 - INTRODUÇÃO

As babesioses ocorrem em todas as áreas do mundo onde existam carrapatos. A babesiose bovina causada pelas espécies *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* é a mais importante doença de rebanho com envolvimento de carrapato *Boophilus microplus*. Nas áreas tropical e subtropical da América Central e da América do Sul, 70% dos rebanhos vivem dentro de áreas infestadas por esta espécie de carrapato (Montenegro-James, 1992; Martins et al., 1994; Madruga et al., 1996). A babesiose bovina, bem como o *B. microplus*, estão disseminados por todo o território nacional, exceto em uma pequena região no Sul do Rio Grande do Sul (Montenegro-James, 1992). De acordo com Madruga (1984), a perda econômica anual devido à babesiose no Rio Grande do Sul foi estimada em US\$ 99 milhões, pois a enfermidade afeta a produtividade do animal não somente pelas mortes, mas, também, pela perda progressiva de peso, causada tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença (Azambuja et al., 1994).

No Brasil, a babesiose existe enzooticamente, de norte a sul, devido às condições climáticas e ao manejo do rebanho. Embora focos de babesiose tenham sido assinalados em todas as unidades da Federação, o conhecimento dentro de um mesmo Estado ainda é muito incipiente (Serra Freire & Nuernberg, 1995).

A espécie mais patogênica é a *B. bovis*, que assume maior gravidade na América do Sul, Austrália e Europa (Massard, 1978). A prevalência de infecção por *B. bovis* é diferente nas diversas regiões mundiais, muitas vezes apresentando resultados de pesquisas bastante

variados. No Brasil, a situação parece apresentar-se de maneira semelhante: no Mato Grosso do Sul encontrou-se prevalência de 12,89 % (Kessler et al., 1983) e de 19,04 % (Madruga et al., 1983); em Minas Gerais, de 82,50 % (Patarroyo Salcedo et al., 1987) e na Bahia, de 97,20 % (Araujo et al., 1998).

O diagnóstico laboratorial da babesiose pode ser direto (detecção do parasita) e indireto (demonstração de anticorpos por meio de testes sorológicos). Segundo Mahoney (1977), até aquela data, os seguintes testes sorológicos tinham sido utilizados: fixação do complemento (FC), imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HI), imunodifusão (ID), teste de aglutinação e aglutinação em látex. Atualmente, as técnicas mais utilizadas são as de IFI e de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Farias, 1995). Para a demonstração direta do parasita podem ser preparados esfregaços sanguíneos e impressões em lâminas de órgãos colhidos na necrópsia (cérebro, rins, baço e coração), sendo estas impressões as mais indicadas para a detecção de *B. bovis* (Mahoney, 1977; Barbosa et al., 1994; Farias, 1995).

Para o diagnóstico de infecção por *B. bovis* o ELISA tem sido usado desde 1982 (Barry et al., 1982). Durante a última década foram fabricados vários kits de ELISA e estes foram comparados com outras provas (em primeiro lugar com IFI) e, praticamente, há uma concordância que IFI e ELISA são superiores às outras provas (fixação do complemento, hemaglutinação), sendo o ELISA mais prático porque trabalha com uma só diluição (por isso menos trabalhoso) e o julgamento é automatizado excluindo, deste modo, a subjetividade e os erros por causa de indisposição ou cansaço (Waltisbuhl et al., 1987; Cardozo et al., 1992, 1994; Farias, 1995; Molloy et al., 1998).

O presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência da babesiose por *B. bovis* no Estado do Pará e colher alguns dados sobre a característica epidemiológica e a capacidade de demonstração direta do parasita.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

Entre os meses de março e novembro de 1997, foram colhidas 172 amostras de soro sanguíneo bovino de oito rebanhos, sem distinção de raça, idade e sexo, em dois matadouros, sendo que desses animais, de 105 foi realizado também preparo de lâminas com impressão renal e esfregaços sanguíneos com sangue venoso (obtido durante o processo de sangria dos animais). Também foram colhidas 1 158 amostras de soro de animais de vinte e três rebanhos, em uma das quais a babesiose foi diagnosticada clinicamente, tendo contribuído com 98 amostras de soro de animais de diferentes faixas etárias. As amostras de soro foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até análise pelo método ELISA. As lâminas foram coradas com corante Giemsa e examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão, segundo a técnica descrita por Matos & Matos (1988).

Para o diagnóstico através do Método ELISA, foi utilizado o Babesiosis ELISA kit, preparado pela Animal Production Unit, FAO/IAEA, Agriculture and Biotechnology Laboratory, Agency's Laboratories Division, Seibersdorf, Austria, apresentando as seguintes características: o antígeno foi feito a partir da lise de eritrócitos, lavados com água destilada, livre de oxi-hemoglobina e, posteriormente, liofilizado. A sensibilização das microplacas ocorreu durante uma noite a  $+4^{\circ}\text{C}$ , acondicionadas em saco plástico. Os soros

controle (negativo, fraco e fortemente positivos), apresentando-se liofilizados, mantidos conservados a  $+4^{\circ}\text{C}$ , originaram-se de bovinos. A diluição final dos soros controle e de teste foi de 1:200. O conjugado foi feito a partir de anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgG1 bovina, conjugado com enzima de raiz forte (Horseradish peroxidase, HRPO) e liofilizado. Como substrato, foi usado o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O cromógeno do kit é o Ortho-phenylenediamine Dihydrochloride (OPD), da SIGMA P-8412. E, finalmente, a leitura foi feita em densidade óptica (OD) de 492 nm.

Para análise dos dados, o valor limite ou discriminante (ponto de corte) foi estabelecido através de exames de soros negativos, fraco e fortemente positivos, assegurados com kit ELISA.

## 3 - RESULTADOS

Para examinar as 1 330 amostras de soro foram utilizadas 30 lâminas. Em todas as lâminas foram examinados quatro vezes os soros negativo, fraco e fortemente positivos, assegurados com o kit ELISA, de modo que cada um destes soros conhecidos (padrão) fossem inspecionados 120 vezes. Os resultados destes exames são mostrados no Gráfico 1. O valor limite ou discriminante (ponto de corte) foi determinado, posteriormente, após a conclusão dos exames. É visível que o valor PP (porcentagem de positividade) nunca ultrapassou o valor 19 no caso de soro negativo, cujo valor médio foi 12, e os valores PP do soro fracamente positivo sempre ultrapassaram o valor 30. O valor discriminante igual a 30 foi determinado pela média de absorbância dos soros negativos acrescida de dois e meio desvios padrão.

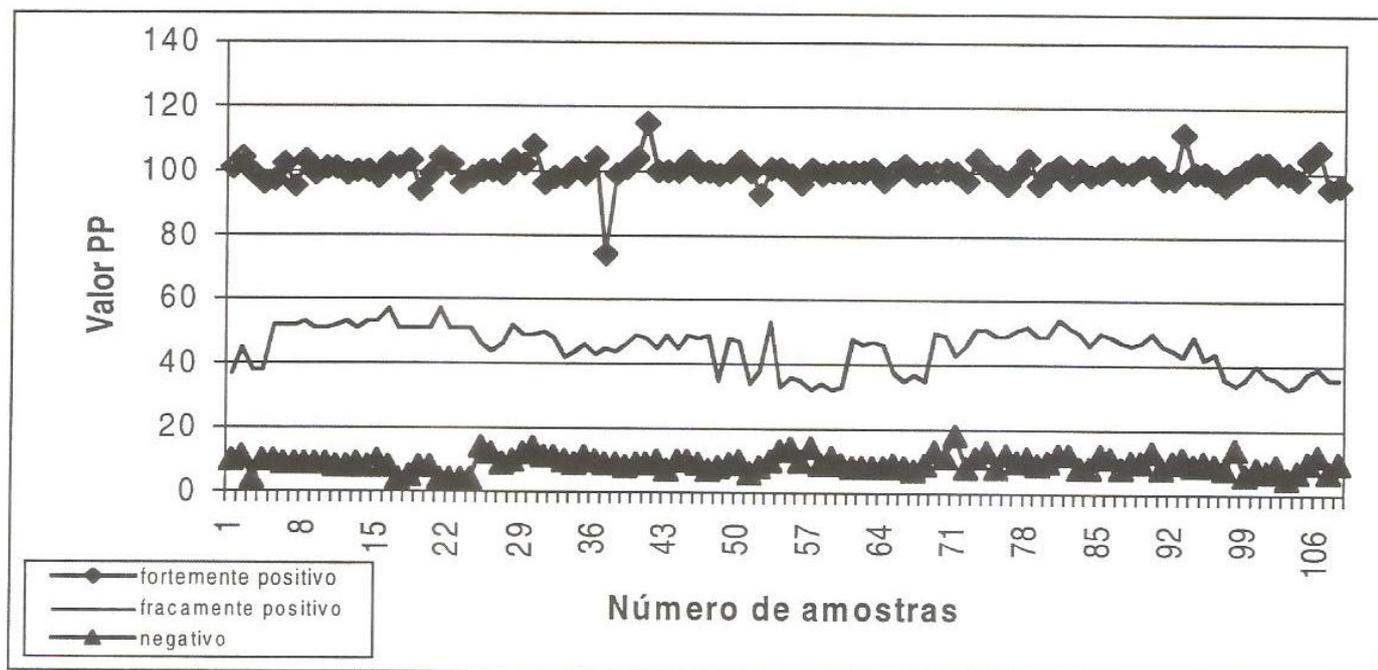


Gráfico 1 - Os valores PP dos soros negativo, fraco e fortemente positivos assegurados com kit ELISA (padrão).

Os resultados sumarizados são mostrados na Tabela 1. De 1 330 amostras de soro oriundas de 31 rebanhos distribuídos em onze municípios do Estado do Pará, afirmaram-se como positivas 700 amostras, o que representa 52,63 % de prevalência. A proporção mais alta

de soroconversão (131/172; 76,16 %) encontrou-se no rebanho oriundo de matadouros. De 105 amostras preparadas por impressão renal, oito (7,62 %) demonstraram-se positivas. Nenhuma das lâminas preparadas com sangue venoso resultaram positivas.

Tabela 1 - Resultados sumarizados do teste ELISA indireto, esfregaços sanguíneos e impressão renal corados através do método Giemsa para diagnóstico de infecção por *Babesia bovis* em bovinos no Estado do Pará, no período de março a novembro de 1997:

Origem das amostras	ELISA			Impressão			Esfregaços		
	Amostras n <sup>o</sup>	Positivas n <sup>o</sup>	%	Amostras n <sup>o</sup>	Positivas n <sup>o</sup>	%	Amostras n <sup>o</sup>	Positivas n <sup>o</sup>	%
22 rebanhos de criatórios	1060	538	50,75	-	-	-	-	-	-
8 rebanhos de matadouros	172	131	76,15	105	8	7,62	105	0	0
1 rebanho com babesiose	98	31	31,63	-	-	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>1330</b>	<b>700</b>	<b>52,63 %</b>	<b>1,05</b>	<b>8</b>	<b>7,62</b>	<b>105</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Nota: sinal convencional utilizado

- Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento

Os resultados do teste ELISA a respeito dos rebanhos sem doença clínica são indicados na Tabela 2. Em dois rebanhos encontrou-se a prevalência menor que 15 % e, em nove, a

proporção de soropositividade foi igual ou superior a 80 %. Em todas as propriedades foi constatada a presença de anticorpos e a ocorrência de soropositividade alternou-se entre 5 e 100 %.

Tabela 2 - Resultados do teste ELISA indireto para diagnóstico de *Babesia bovis* em bovinos sem doença clínica no Estado do Pará, no período de março a novembro de 1997.

Nº protocolo	Municípios	Amostras (nº)	Negativos (PP<30)	Positivos (PP>30)	% Positivo
66	Paragominas	40	38	2	5,00
14	Sta. Izabel do Pará	249	133	116	46,59
22	Rondon do Pará	6	1	5	83,33
30	Paragominas	20	12	8	40,00
26	Rondon do Pará	16	3	13	81,25
25	Rondon do Pará	53	22	31	58,49
24	Rondon do Pará	29	14	15	51,72
55	Sto. Antonio Tauá	17	5	12	70,59
33	Castanhal	21	11	10	47,62
62	Santarém	15	7	8	53,33
63	Paragominas	118	29	89	75,42
37	Itaituba	11	0	11	100,00
46	Igarapé-Açú	29	12	17	58,62
99	Castanhal	20	11	9	45,00
101	Americano	23	4	19	82,61
127	Santarém	65	31	34	52,31
111	Santarém	4	3	1	25,00
126	Paragominas	203	103	100	49,26
124	Paragominas	12	3	9	75,00
163	Ipixuna	76	54	22	28,95
156	Santarém	20	18	2	10,00
M 17	Sta. Cruz do Arari	49	12	37	75,51
M 15	Castanhal	15	0	15	100,00
M 15S	Castanhal	19	1	18	94,74
M 16 <sup>A</sup>	Castanhal	30	6	24	80,00
M 16R	Castanhal	16	3	13	81,25
M 4	Paragominas	12	0	12	100,00
M 6	Sta. Cruz do Arari	19	9	10	52,63
M 131	Sta. Cruz do Arari	12	10	2	16,67
CE	Castanhal	13	8	5	38,46
30 rebanhos	11 municípios	1232	563	669	54,30

Os resultados, de acordo com a faixa etária do rebanho onde a babesiose foi diagnosticada clinicamente, estão registrados na Tabela 3 e os resultados dos demais animais sem doença clínica encontram-se na Tabela 4. Estes últimos dados demonstram claramente o aumento da proporção de infecção com o avançar da idade.

Tabela 3 - Resultados do teste ELISA indireto para diagnóstico de *Babesia bovis* com as amostras colhidas em rebanho com babesiose clínica no Estado do Pará, no período de março a novembro de 1997.

Faixa etária	Amostras examinadas	Amostras positivas n <sup>o</sup>	Amostras positivas %
6 — 12 meses	16	1	6,25
1 — 2 anos	16	5	31,25
2 — 4 anos	16	3	18,75
> 4 anos	50	22	44,00
Total	98	31	31,63

Tabela 4 - Resultados do teste ELISA indireto para diagnóstico de *B. bovis* em bovinos sem doença clínica, entre os meses de março a novembro de 1997, no Estado do Pará.

Faixa etária	Amostras examinadas	Amostras positivas n <sup>o</sup>	Amostras positivas %
6 — 12 meses	72	17	23,61
1 — 2 anos	119	37	31,09
2 — 4 anos	66	31	46,97
> 4 anos	975	584	59,90
Total	1232	669	54,30

Os resultados sorológicos dos rebanhos sem doença clínica, de acordo com os valores de porcentagem de positividade (PP) são apresentados na Tabela 5. No grupo etário de 6 a 12 meses de idade predominam os valores PP de 0 a 10 (48/72; 66,67 %), sendo que os outros módulos são apresentados com 5,56% (4/72), no máximo. Nos grupos de um a dois anos e de dois a quatro anos de idade, também predominam os valores PP de 0 a 10 (35/119; 29,41 % e 25/66; 37,88 %, respectivamente). Entretanto, os outros módulos sucedem-se a um modelo totalmente diferente: no grupo de dois a quatro anos de idade a distribuição de valores PP é semelhante ao grupo de mais de quatro anos de idade (exceto os valores PP de 0 a 10). Neste último grupo, a distribuição de valores PP mostra uma curva praticamente regular: o número de amostras com aumento de valores PP aumenta gradualmente, culminando com valores PP de 30 a 40 e, após este aumento, diminui gradativamente a proporção de amostras com maiores valores PP.

#### 4 - DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foi utilizado um kit ELISA indireto da FAO/IAEA, melhorado por vários pesquisadores e usado em diferentes países do mundo, entre eles, alguns da América Latina: México (Vazquez et al., 1992), Uruguai (Cardozo et al., 1992, 1994) e Argentina (Echaide et al., 1995). Atualmente, de vários kits produzidos por diferentes firmas, somente este kit da FAO/IAEA está sendo aceito como base de exames comparativos.

Tabela 5 - Resultados do teste ELISA indireto para diagnóstico de *Babesia bovis* em bovinos sem doença clínica segundo os valores PP e faixas etárias, no Estado do Pará, no período de março a novembro de 1997.

Valor PP	6-12 meses	%	1-2 anos	%	2-4 anos	%	> 4 anos	%
10	48	66,67	35	29,41	25	37,88	82	8,41
20	3	4,17	25	21,00	3	4,55	134	13,74
30	4	5,56	22	18,49	7	10,61	175	17,95
40	3	4,17	17	14,29	4	6,06	195	20,00
50	4	5,56	10	8,40	9	13,64	162	16,62
60	3	4,17	4	3,36	6	9,09	111	11,38
70	3	4,17	4	3,36	7	10,61	64	6,56
80	1	1,39	1	0,84	1	1,52	34	3,49
90	1	1,39	1	0,84	1	1,52	13	1,33
100	2	2,78	-	-	3	4,55	5	0,51
TOTAL	72		119		66		975	

Nota: Sinal convencional utilizado

- Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento

A determinação do valor discriminante é muito importante. Aumentando este valor, também a especificidade vai crescer, mas a sensibilidade vai diminuir. Neste caso, o número de falso-positivos reduz-se ou estes desaparecem totalmente. Entretanto, pode ocorrer que uma parte dos animais infectados não reajam por causa do baixo nível de anticorpos. Para alcançar o valor mínimo ideal são necessários exames prévios que abrangem a investigação de soros padrões bem conhecidos como negativos, fraca e fortemente positivos, soros colhidos em região com animais certamente infectados e não infectados. Echaide et al.(1995), na Argentina, examinaram 500 soros de novilhas oriundas de territórios livres de babesiose e 500 amostras de animais infectados natural ou experimentalmente. Cardozo et al.(1994), no Uruguai, determinaram o valor discriminante examinando 200 animais não infectados e 80 animais infectados. Nas outras pesquisas na América Latina (Cardozo et al., 1992 e Vazquez et al., 1992), o valor discriminante foi estabelecido através

de exame serial do soro negativo assegurado com o kit ELISA (este valor foi duas vezes mais que o valor médio do soro negativo). O valor discriminante destas quatro pesquisas variou entre 16 e 34.

No Pará, até agora não foram realizadas pesquisas para avaliação da difusão da babesiose causada pela *B. bovis*, por isso, neste trabalho foi possível determinar o valor discriminante somente por exame de soros negativo, fraca e fortemente positivos assegurados junto com o kit ELISA. Poder-se-ia considerar se a determinação do valor discriminante foi correta ou se seria melhor que o fosse determinado em 24 (média de absorbância do soro negativo acrescida de dois desvios padrão) ou em 20, visto que o valor PP nunca ultrapassou o valor 19 no caso dos soros negativos. Nestes casos, o número de animais positivos seria mais alto, visto que o número de amostras com valores PP entre 21 e 30 foi bastante elevado (208/1232; 16,88 %), em primeiro lugar nos animais com mais de um ano de idade (Tabela 5).

Em todos os rebanhos encontraram-se animais soropositivos. Isto não é surpresa, visto que toda a Amazônia é área endêmica onde o carrapato existe durante todo o ano. Em geral, a prevalência mais alta de infecção é encontrada em regiões úmidas tropicais e subtropicais (Montenegro-James, 1992). Segundo o manual da FAO (1984), os problemas em mais altos níveis ocorrem nas áreas de instabilidade enzoótica, ou seja, nos rebanhos onde a prevalência de infecção por *B. bovis* encontra-se entre 15 e 80 %. Aceitando este tipo de avaliação, foram estudados em Santana do Livramento, Rio Grande do Sul, Brasil, 101 rebanhos para detecção de anticorpos de *B. bovis* em bovinos com, aproximadamente, 11 meses de idade, utilizando-se o teste de ELISA da FAO/IAEA (Martins et al., 1994). Um total de 53 % (54/101) dos rebanhos foram encontrados em situação de instabilidade enzoótica e 47 % (47/101) em estabilidade enzoótica, sendo 41 rebanhos nesta classe por causa de prevalência alta (> 80 %) de infecção e seis por baixa prevalência (< 15 %) de anticorpos. Nesta pesquisa, 64,52% (20/31) dos rebanhos encontraram-se em situação de instabilidade enzoótica e 35,48 % (11/31) em estabilidade enzoótica, sendo nove por alta prevalência e dois por baixa prevalência.

Na pesquisa de Martins et al. (1994) o número de tratamentos carrapaticidas aplicados anualmente não teve influência na instabilidade para *B. bovis*. Por outro lado, Cardozo et al. (1994) acreditam que a utilização excessiva de carrapaticidas influenciam os surtos de babesiose, opinião compartilhada por Guglielmone (1995) que obteve resultados semelhantes. Durante este trabalho encontraram-se, em um rebanho, dois animais (três

anos de idade) com sinais clínicos, onde a prevalência de soropositividade foi de 31,63 % (31/98), e no grupo de dois a quatro anos de idade, a proporção encontrada de animais soropositivos foi de 18,75 % (3/16). Acredita-se que estes dados estejam influenciados pela utilização excessiva de carrapaticidas.

O diagnóstico direto de babesiose em laboratório acontece com a demonstração do parasita. Nesse sentido, os resultados desta pesquisa foram muito semelhantes aos encontrados na literatura: nas lâminas preparadas durante o ato da sangria não se encontrou o parasita e nas impressões renais pode-se demonstrá-lo em 7,62 % (8/105) das amostras colhidas. Todas estas lâminas preparadas de sangue e rins originaram-se de rebanhos altamente infectados (a prevalência de soropositividade em quatro rebanhos de onde as amostras foram colhidas foi mais de 80 %; dados não mostrados). Geralmente é aceito que a demonstração de babésias, em primeiro lugar a da *B. bovis*, não é muito fácil e deve ser examinado grande número de hemácias para um diagnóstico certo. Por conta disso, impressionam os resultados divulgados do Marrocos, recentemente (Sahibi et al., 1998), onde foram realizados exames sorológicos (utilizando o teste de IFI) e microscopia (examinando esfregaços de sangue corados com Giemsa) com, praticamente, as duas técnicas apresentando resultados de infecção no mesmo nível.

## 5 - CONCLUSÃO

- a) O teste ELISA indireto pode ser utilizado também nesta região para avaliar a difusão da infecção por *B. bovis*, estando apto para examinar grande quantidade de amostras.

- b) Teoricamente esta região assume características de estabilidade enzoótica, entretanto 64,52% (20/31) dos rebanhos encontraram-se em situação de instabilidade enzoótica segundo as diretrizes da FAO.
- c) A demonstração direta de *B. bovis* através do exame de esfregaços sanguíneos, em animais clinicamente sadios, é raramente bem sucedida. O parasita pode ser visto mais freqüentemente nas hemácias em capilares renais.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, F. R., MADRUGA, C. R., LEAL, C. R., SCHENK, M. A., KESSLER, R. H., MARQUES, A. P., LEMAIRE, D. C. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.*, v.74, p.101-108, 1998.
- AZAMBUJA, C.J., GAYO, V., SOLARI, M., SUAREZ, M., STOLL, M. Biotechnology applied to the detection of infectious agents in cattle. Diagnosis of *Babesia bovis* by PCR. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.3, p.1-4, jan.1994.
- BARBOSA, M. F. R., COSTA, J. O., TAFURI, W. L. Transmissão congênita de *Babesia bovis*: relato de um caso autóctone em Minas Gerais - Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.46, p.519-526, maio, 1994.
- BARRY, D. N., RODWELL, B. J., TIMMS, P., MC GREGOR, W. A microplate enzyme immunoassay for detecting and measuring antibodies to *Babesia bovis* in cattle serum. *Austr. Vet. J.*, v.59, p.136-140, 1982.
- CARDOZO, H., SOLARI, M. A., ETCHEBARNE, J. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of *Babesia bovis* in Uruguai - Regional network for Latin America on animal disease diagnosis using immunoassay and labelled DNA probe techniques. *IAEA-TECDOC.*, v.657, p.185-191, 1992.
- CARDOZO, H., SOLARI, M. A., ETCHEBARNE, J., LARRAURI, J. H. Seroepidemiological study of *Babesia bovis* in support of the uruguayan *Boophilus microplus* control program. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.3, p.5-8, 1994.
- ECHAIDE, S. T., ECHAIDE, J. E., GAIDO, A. B., MANGOLD, A. J., LUGARESI, C. J., VANZINI, V. R., GUGLIELMONE, A. A. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay kit to detect *Babesia bovis* antibodies in cattle. *Prev. Vet. Med.*, v.24, p.277-283, 1995.
- FAO. **Ticks and tick-borne diseases control: a practical field manual.** Rome, 1984. p. 301-621.
- FARIAS, N. A. R. **Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina.** São Paulo: Agropecuária, 1995. 79p. \*
- GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.*, v.57, p.109-119, 1995.
- KESSLER, R. H., MADRUGA, C. R., SCHENK, M. A. M., RIBEIRO, O. C. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* (Babes 1888 Starcovici 1893) em bezerros no Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.18, p.931-935, ago.1983.
- MADRUGA, C. R. **Tristeza parasitária-babesiose e anaplasmosose.** Campo Grande: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte, 1984. p. 18-27, 1984.
- \_\_\_\_\_, AYCARDI, E., PUTT, N. Epidemiologia da anaplasmosose e babesiose em bovinos da região do cerrado do estado de Mato Grosso do Sul: I-Prevalência. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.35, p.631-640, maio, 1983.
- \_\_\_\_\_, SUAREZ, C. E., TERRY, F. M., PALMER, G. H. Conservation of merozoite membrane and apical complex B cell epitopes among *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* strains isolated in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.61, p.21-30, 1996.

- MAHONEY, D. F. Babesia of domestic animals. In: KREIER, J. P. (Ed.). **Parasitic protozoa**. New York: Academic Press, 1977. v.4, p.1-52.
- MARTINS, J. R., CORREA, B. L., CERESÉR, V. H., ARTECH, 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, p.75-78, fev.1994.
- MASSARD, C. L. Biologia e epidemiologia da tristeza parasitária. SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE PARASITOSE DE BOVINOS, 1., 1978, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 1978. p.279-283..
- MATOS, M. S., MATOS, P. F. **Laboratório clínico médico-veterinário**. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1988, p. 93.
- MOLLOY, J. B., BOWLES, P. M., BOCK, R. E., TURTON, J. A., KATSANDE, T. C., KATENDE, J. M., MABIKACHECHE, L. G., WALDRON, S. J., BLIGHT, G. W., DALGLIESH, R. J. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bovis* in cattle in Australia and Zimbabwe. **Prev. Vet. Med.**, v.33, p.59-67, 1998.
- MONTENEGRO-JAMES, S. Prevalence and control of babesiosis in the Americas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, p.27-36, 1992. (Suplemento 3).
- PATARROYO SALCEDO, J. H., RIBEIRO, M. S. B., SANTOS, J. L., FARIA, J. E. Epidemiologia das babesioses bovinas no Estado de Mato Grosso. I-Prevalência de anticorpos fluorescentes na Zona da Mata-MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.39, p.423-429, 1987.
- SAHIBI, H., RHALEM, A., BERRAG, B., GOFF, W. L. Bovine babesiosis. Seroprevalence and ticks associated with cattle from two different regions of Morocco. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.29, p.213-218, 1998.
- SERRA FREIRE, N. M., NUERNBERG, S. O carrapato e a tristeza parasitária bovina no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.17, p.257-259, jun.1995.
- VASQUEZ, Z. G., CRUZ, R. R., SALGADO, N. S., ESPIN, A. The use of ELISA for the diagnosis of *Babesia bovis* in cattle in Mexico – Regional network for Latin America on animal disease diagnosis using immunoassay and labelled DNA probe techniques. **IAEA-TECDOC.**, v.657, p.179-184, 1992.
- WALTISBUHL, D. J., GOODGER, B. I. V., WRIGHT, J. G., COMMINS, M. A., MAHONEY, D. F. A enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. **Parasitol. Res.**, v.73, p.123-131, 1987.

