

TESTE DE CONGLUTINAÇÃO RÁPIDA PARA DIAGNÓSTICO DE ANTICORPOS CONTRA *BABESIA BOVIS*¹

CLAUDIO ROBERTO MADRUGA, RAUL HENRIQUE KESSLER² e MIDORI MIGUITA³

RESUMO - Neste trabalho objetivou-se desenvolver e avaliar um teste de conglutinação rápida para diagnóstico de anticorpos contra *Babesia bovis* (TCR-*B. bovis*), com desempenho similar ao do teste da imunofluorescência indireta. O TCR-*B. bovis* apresentou sensibilidade de 95,7%, especificidade de 97,6% e precisão de 96,5%. Os mesmos parâmetros para imunofluorescência indireta (IFI) foram respectivamente 99,1%, 99,7% e 99,4%. O TCR demonstrou ter capacidade de determinar imunoglobulinas específicas anti-*B. bovis* tão cedo quanto a IFI, após infecção experimental com este hemoprotozoário. As reações cruzadas do TCR-*B. bovis* com soros de animais infectados com *Babesia bigemina* ocorreram em 4% dos soros. O antígeno para TCR produzido com hemácias não parasitadas apresentou 3,5%, 1,5% e 2,2% de reações positivas com soros de animais infectados experimentalmente com *B. bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*, respectivamente. Entretanto, não foi observada nenhuma destas reações positivas com soros de áreas endêmicas com esta preparação de antígeno. Considerando-se os resultados acima e ainda que o antígeno TCR-*B. bovis* se manteve viável após um período de 172 a 245 dias de armazenamento a 4°C, conclui-se que esta prova sorológica poderá vir a ser utilizada em estudos epidemiológicos e na avaliação de medidas preventivas contra esta espécie de *Babesia*.

Termos para indexação: imunofluorescência, imunoglobulinas, hemoprotozoário.

RAPID CONGLUTINATION TEST FOR DIAGNOSIS OF *BABESIA BOVIS* ANTIBODIES

ABSTRACT - The objective of this work was to develop and evaluate a rapid conglutination test (RCT) for detection of antibodies against *Babesia bovis* (*B. bovis*-RCT), with similar performance as the indirect immunofluorescence test. The *B. bovis*-RCT had a sensitivity of 95.7%, a specificity of 97.6% and the precision of 96.5%, the same parameters for the IFAT being 99.1%, 99.7% and 99.4% respectively. The RCT was able to detect immunoglobulins anti-*B. bovis* as early as IFAT after bovine challenge with these hemoprotozoans. *B. bovis*-cross reactions with sera of *Babesia bigemina* infected cattle were 4%. The RCT prepared with non-parasitized erythrocytes (negative antigen) showed 3.5%, 1.5% and 2.2% of positive reactions with sera of animals infected with *B. bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. None of sera from animals in endemic areas had positive reactions with this antigen. Considering these results and the viability of *B. bovis*-RCT (172 to 245 days, stored at 4°C), it can be concluded that this serological test can be used for epidemiological studies and the evaluation of control measures against this species of *Babesia*.

Index terms: immunofluorescent antibodies, immunoglobulins, hemoprotozoans.

INTRODUÇÃO

Na determinação da prevalência da *Babesia bovis* bem como de outros parâmetros epidemiológicos,

tal como taxa de inoculação, as provas sorológicas são fundamentais.

Nos últimos anos houve desenvolvimento de várias técnicas sorológicas com a finalidade de aprimorar na sensibilidade e especificidade (Johnston et al., 1973; Todorovic & Kuttler, 1974; Barry et al., 1982; Waltisbuhl et al., 1987; Chieves et al., 1989; Kung'U & Goodger, 1990). Mais recentemente, foram produzidos antígenos altamente purificados por técnicas de biologia molecular com a produção de subunidades antigênicas de especi-

¹ Aceito para publicação em 27 de agosto de 1997.

² Méd. Vet., Ph.D., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS. E-mail: madruga@cnpgc.embrapa.br

³ Biól., Embrapa-CNPGC. E-mail: midori@cnpgc.embrapa.br

ficidade definida (Goff et al., 1989; Bose et al., 1990), que foram utilizados em testes de imunoadsorção enzimática (ELISA). Apesar destes progressos tecnológicos da sorologia, a sensibilidade conseguida por estes testes não foi efetivamente superior ao da imunofluorescência indireta (Barry et al., 1982; Goff et al., 1989) para que possam alterar a interpretação de um levantamento sorológico. Inclusive, a alta sensibilidade da imunofluorescência indireta possibilitou um elevado grau de concordância com a sonda de DNA (Goff et al., 1988).

Além da sensibilidade e especificidade, outras características são desejáveis para as provas sorológicas: devem ser de realização simples; econômicas; rápidas na obtenção de resultados; reproduzíveis; e não devem requerer equipamentos especializados, portanto apropriadas para testes a campo. O tipo de teste sorológico que possui estas características adicionais são as aglutinações. Entretanto, a sensibilidade deste tipo de prova normalmente é inferior à das demais. A introdução da conglutinina numa prova de aglutinação, tornando-a uma reação de conglutinação, melhorou consideravelmente a sensibilidade do teste de aglutinação em cartão para o diagnóstico de anticorpos contra *Anaplasma marginale* (Rose et al., 1974). Esta modificação e o modo de preparação do antígeno permite estabelecer a hipótese de que antígenos espécie-específicos dos estágios intraeritrocíticos da *B. bovis* possibilitam o desenvolvimento de testes sorológicos de conglutinação de alta sensibilidade e especificidade similares ao da imunofluorescência indireta.

O presente trabalho objetivou desenvolver e avaliar um teste sorológico com desempenho similar ao do teste da imunofluorescência indireta para o diagnóstico de anticorpos contra *B. bovis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de hemácias parasitadas para a produção de antígeno para as provas sorológicas

Um estabilizado com cepa pura de *B. bovis* isolada no Estado de Mato Grosso do Sul (Kessler et al., 1987) foi a ori-

gem do material para a obtenção do antígeno das provas sorológicas. Bezerros *Bos indicus* da raça Nelore com seis a oito meses de idade, esplenectomizados e provenientes de área livre de carrapato receberam inóculo para a produção de parasitemia. Subinoculações foram realizadas até a obtenção de parasitemia igual a, ou maior que 5% para a imunofluorescência indireta (IFI), e 30%, ou superior, para o teste de conglutinação rápida (TCR). As hemácias parasitadas com porcentagens compatíveis de hemoprotozoários para a obtenção de antígeno para IFI foram colhidas em volume de 100 mL e processadas de acordo com a técnica descrita por Madruga et al. (1986).

Para a produção de antígeno para o TCR, os bezerros com parasitemia apropriada foram canulados na carótida, e foi realizada sangria total destes animais. O sangue foi colhido em frascos contendo citrato de sódio. Após três lavagens com solução tampão fosfato, as hemácias compactadas foram ressuspensas em água destilada estéril na relação 1:5 v/v, e imediatamente congeladas a -80°C, em alíquotas de 100 mL.

Preparação do antígeno de *B. bovis* para o TCR

O sangue foi descongelado e, então, centrifugado a 10000 x g, durante 30 minutos. A seguir, o sedimento foi ressuspensionado em solução tampão fosfato contendo microelementos, cálcio e magnésio (STFM), homogeneizado e dividido em alíquotas de 100 mL. Em seguida, o material foi sonicado a 50 Watts, baixa intensidade, por 30 segundos, e novamente centrifugado como descrito acima. O mesmo procedimento foi repetido duas vezes, tendo como única alteração a lavagem do material com STFM contendo antibióticos penicilina-estreptomicina (STFMA). A concentração da penicilina foi de 100 unidades, enquanto que a da estreptomicina foi de 100 µg por mililitro. Entre cada processo de lavagem, o material foi homogeneizado em um homogeneizador Toen-Broeck. Após a última lavagem, o material foi dividido em alíquotas de cinco mililitros e congelado a -80°C por 24 horas. A suspensão contendo o material antigênico foi descongelado em temperatura ambiente, homogeneizado e submetido à ação do disruptor ultrassônico, como anteriormente mencionado, e centrifugado, por 30 minutos, a 4°C, a 10000 x g. As duas lavagens seguintes utilizaram o tampão de Walpoles, pH 5,0. Após a última lavagem, o corante "fast green" foi adicionado na relação 1:20. O material antigênico foi mantido sob agitação constante a 4°C por 24 horas. O excesso de corante foi removido por centrifugação, e o sobrenadante, descartado. O sedimento final foi ressuspensionado em tampão de Walpoles.

Obtenção do fator sérico bovino (FSB)

O FSB foi obtido a partir de um "pool" de soros de bovinos da raça Nelore clinicamente normais. Estes animais eram livres da infecção por *Babesia*.

Execução do teste de conglutinação rápida para diagnóstico de anticorpos contra *B. bovis*

A prova de conglutinação foi realizada basicamente de acordo com a técnica descrita para a aglutinação em cartão para o diagnóstico de anticorpos contra *A. marginale* (Amerault et al., 1981). Na execução da prova foram utilizados 15 microlitros de soro teste, 30 microlitros de FSB e 15 microlitros de antígeno. Os três componentes foram misturados, e a seguir, agitados em uma placa de vidro. A padronização da prova foi realizada com um grupo de 25 soros de animais infectados com *B. bovis* e apresentando reações positivas na IFI e 25 soros de bovinos não infectados com este hemoprotozoário. A concentração do antígeno foi determinada considerando o tempo de reação e intensidade das aglutinações. O critério para a leitura dos resultados foi o seguinte: negativo (-), sem apresentação de grumos; fraco positivo (+), pouca presença de grumos; positivo (++) , presença regular de grumos; forte positivo (+++), intensa formação de grumos; muito forte positivo (++++), reação muito intensa com formação de um coágulo.

Imunofluorescência indireta

Esta técnica foi realizada de acordo com descrição de Madruga et al. (1986), utilizando isolados do Estado do Mato Grosso do Sul para a preparação do antígeno.

Análise dos soros de animais infectados com *B. bovis*

Foram analisados pelo TCR e IFI, 112 soros provenientes de bezerros infectados com isolados de *B. bovis* do Mato Grosso do Sul.

Determinação do tempo pós-inoculação (PI) para detecção de anticorpos contra *B. bovis*

Cinco bezerros foram infectados com *B. bovis*, e os soros destes animais foram analisados diariamente, até a detecção inicial de anticorpos pelo TCR e IFI. Posteriormente, a análise foi realizada com uma periodicidade variável. Para o exame hemoparasitológico foi empregada a coloração de May-Grunwald-Giemsa.

Determinação de anticorpos em bovinos infectados com diferentes números de *B. bovis*

Para analisar a relação do inóculo com a produção de anticorpos a níveis detectáveis pelo TCR e IFI, dezesseis animais foram divididos em grupos de quatro bezerros. Os inóculos foram os seguintes: 2×10^7 , 10^7 , e 5×10^6 organismos de *B. bovis*. O quarto grupo não foi infectado, permanecendo como grupo-controle. A análise sorológica do TCR e IFI foi realizada semanalmente até a quarta semana PI.

Análise de soros de animais não infectados por *B. bovis*

Foram analisados 295 soros de animais importados ou criados no extremo sul do País, em áreas livres de carrapatos transmissores de organismos do gênero *Babesia*.

Avaliação de reações cruzadas dos soros de animais infectados com *B. bigemina* e *A. marginale*

Foram examinados, com o antígeno TCR-*B. bovis*, 50 soros de animais infectados com *B. bigemina*, e 82 soros de animais infectados com *A. marginale*.

Análise dos soros de animais infectados com *B. bovis* com antígeno negativo

O antígeno negativo foi uma preparação do antígeno de TCR a partir de hemácias obtidas de vários bezerros não infectados, com organismos do gênero *Babesia*. Para esta avaliação os soros testados foram divididos em dois grupos: 1) soros oriundos de animais infectados experimentalmente com *B. bovis*; 2) soros de bovinos infectados naturalmente em diferentes áreas endêmicas do Brasil.

Análise de repetibilidade e longevidade

Duas partidas de antígenos de *B. bovis* foram avaliadas com respeito à longevidade e repetibilidade. Para tal, foram utilizados dez soros negativos e dez soros positivos, separados em pequenas alíquotas de 100 μ L armazenados -20°C. Os exames foram realizados em intervalos médios de 30 dias, e em cada ocasião eram usadas diferentes alíquotas do mesmo soro. Os testes foram executados até os soros positivos diminuírem na intensidade da reação ou até os soros negativos apresentarem reações não-específicas.

Determinação dos parâmetros de validação do teste

Para determinar matematicamente os parâmetros de sensibilidade, especificidade e precisão, os soros dos ani-

mais conhecidamente positivos foram simbolizados por **a** e por **b** quando as reações eram falso-positivas. Os soros de animais negativos foram representados por **d** quando o resultado era negativo, e, por **c**, quando as reações eram falso-positivas.

Análise estatística

A avaliação estatística do TCR comparativamente a IFI foi realizada com o teste qui-quadrado a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Empregando soros contendo imunoglobulinas específicas contra *B. bovis*, como referência, foi estabelecido que 5% de material sólido deverá ser a concentração apropriada para um antígeno obtido a partir do sangue com parasitemia de 31,5% para *B. bovis*. O tempo para a leitura dos resultados foi estabelecido em cinco minutos, podendo as reações incompletas neste período ser lidas aos sete minutos, pois nos soros negativos não aparecem aglutinações com o passar do tempo (Fig. 1).

Análise dos soros de animais infectados experimentalmente com esta espécie de *Babesia*, resultou em 111 (98,2%) e 107 (95,5%) reações positivas, respectivamente na IFI e TCR. Apesar de uma maior percentagem de soros reagentes na IFI que no TCR, esta não foi superior quando avaliada estatisticamente ($P \geq 0,05$). Na determinação do tempo pós-inoculação para detecção de anticorpos, os exames hemoparasitológico e sorológico na IFI e TCR, indicaram que, em quatro bezerros, a parasitemia ocor-

reu antes que as imunoglobulinas específicas contra *B. bovis* fossem detectadas por estes testes; em dois bezerros, a resolução da parasitemia coincidiu com o aparecimento de anticorpos; no terceiro animal, a parasitemia persistiu três dias após o aparecimento dos anticorpos, e nos dois bezerros restantes, a detecção inicial das imunoglobulinas anti-*B. bovis* não teve relação com a parasitemia. Nos bezerros de números um e três, a IFI foi capaz de determinar, um dia antes da TCR, anticorpos anti-*B. bovis*, enquanto que resultado inverso foi observado no bezerro número cinco. Nos demais animais, as imunoglobulinas específicas contra este hemoparasito foram detectadas inicialmente no mesmo dia, pela IFI e TCR. Após a detecção inicial dos anticorpos, a IFI e o TCR apresentaram reações positivas até o final da avaliação sorológica, que variou de 53 dias PI até 130 dias PI. Portanto, no que concerne ao período de tempo pós-infecção, necessário para detectar as imunoglobulinas iniciais, o TCR não diferiu significativamente da IFI ($P \geq 0,05$), pois nos casos em que houve diferenças, estas não ultrapassaram a um dia com relação à IFI. A constatação de Todorovic & Long (1976), de que a IFI detectou anticorpos contra *B. bovis* quatro semanas antes da fixação de complemento (FC) sugere que o TCR tem um desempenho superior a FC neste aspecto. Comparando os resultados do TCR neste experimento e os de um ELISA preparado com antígeno não purificado de *B. bovis* (Barry et al., 1982), foi constatado que o primeiro teste foi capaz de detectar anticorpos antes que o segundo.

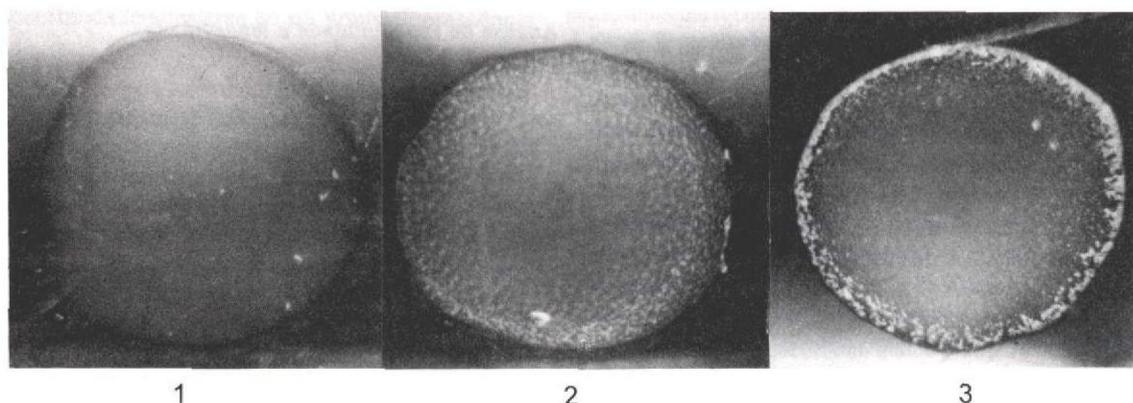


FIG. 1. Intensidade de aglutinação das reações dos testes de congutinação rápida para o diagnóstico de anticorpos contra *B. bovis* e *B. bigemina*. 1 – reação negativa; 2 – fraca positiva; 3 – forte positiva.

Na maioria dos casos, os anticorpos contra *B. bovis* foram detectados após o surgimento, no sangue periférico, destes hemoprotozoários. Esta observação concorda com os resultados verificados com aglutinação capilar (Ross & Lohr, 1968).

Os resultados sorológicos dos animais infectados com diferentes inoculos de *B. bovis* podem ser observados na Tabela 1.

A reação humoral dos bovinos às infecções tem aspectos individuais relacionados à imunidade inata e à capacidade imunológica adaptativa de responder a antígenos específicos de *B. bovis* que, geralmente, estão associados a fatores genéticos. Talvez sejam estas as razões que justificam um maior número de reagentes no grupo infectado com 10^7 organismos de *B. bovis* tanto no TCR como na IFI.

Os resultados dos diferentes grupos sugerem que a IFI possui maior sensibilidade que o TCR, com relação ao número de parasitos inoculados, pois a prova de anticorpos fluorescentes detectou maior número de reagentes. No exame dos soros de bovinos provenientes das regiões livres de *Babesia* detectou-se um soro positivo na IFI e dois no TCR. Estes resultados evidenciam um índice de 0,37% de falsos positivos para a primeira prova sorológica, e 0,68 de falsos positivos para a segunda. O índice de falsos positivos com soros negativos coloca o TCR em nível similar ao da IFI, como foi verificado neste trabalho e em outros que utilizaram esta prova sorológica (Johnston et al., 1973; Madruga

et al., 1986). O índice de falsos positivos do TCR foi também semelhante a um teste de imunoadsorção enzimática que tem antígeno purificado (Waltisbuhl et al., 1987) ou inferior a outro preparado com antígeno não-purificado (Barry et al., 1982). O TCR apresentou, com relação a reações falso-positivas, desempenho superior ao da FC, mesmo aperfeiçoado e adaptado à microtécnica (Mahoney, 1967; Todorovic et al., 1971) e ao da aglutinação em lâmina (Goodger & Mahoney, 1974). Na avaliação de reações cruzadas no TCR, entre os soros de animais infectados apenas com *B. bigemina*, dois apresentaram aglutinação no TCR com antígeno da outra espécie de *Babesia*; ocorreram apenas 4% de reações cruzadas, enquanto que o soro dos bovinos infectados com *A. marginale* proporcionaram 1,22% de reações falso-positivas.

As reações cruzadas em animais infectados com *B. bigemina* talvez estejam associadas a dois fatores: 1) na fase aguda ou de convalescença, estariam presentes em maior concentração imunoglobulinas do isotipo M que possuem menor afinidade pelos determinantes antigênicos dos parasitos que as imunoglobulinas G, devido ao fenômeno da maturação da resposta imunológica; 2) em decorrência da característica hemolítica da infecção, seriam produzidos anticorpos contra o estroma de hemácias, que são mais evidentes também em soros obtidos na fase aguda ou de convalescença. Portanto, a fase da infecção pode ter sido a causa das reações cruzadas verificadas nos soros de animais

TABELA 1. Determinação da sensibilidade dos testes de imunofluorescência indireta (IFI) e de conglutinação rápida (TCR) em detectar anticorpos em bovinos infectados com 2×10^7 (grupo A), 10^7 (grupo B) e 5×10^6 (grupo C) organismos de *B. bovis*.

Tempo pós-inoculação (dias)	Teste sorológico	Grupos experimentais											
		A				B				C			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	IFI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	IFI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	80	80
	TCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	IFI	80	80	0	0	80	80	0	80	80	0	0	80
	TCR	-	+	-	-	++	++	-	+	+++	-	-	-

infectados com *B. bovis* e *A. marginale*; esta última tem também características hemolíticas, pois com os soros de animais que não estavam na fase aguda ou de convalescência de áreas enzoóticas não foram verificadas reações.

Entretanto, as porcentagens de reações cruzadas não invalidam a especificidade do TCR, pois nenhuma delas proporciona um valor inferior a 95%. A análise com antígeno negativo demonstrou que o estroma presente na preparação antigênica não interfere de forma importante no desempenho do TCR. Isto fica particularmente evidenciado nos soros de bovinos de áreas endêmicas; a maioria é infectada cronicamente com *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.

As aglutinações não-específicas estão, talvez, associadas a antígenos de grupo sanguíneo.

As diferenças entre as provas sorológicas estão associadas à dinâmica de produção dos diferentes isótipos de imunoglobulinas e aos isótipos determinados para cada uma das provas. Durante a fase inicial da infecção primária por *B. bovis*, são produzidas IgM e IgG₁ que são detectadas pela FC, IFI (James et al., 1981), ELISA (O'Donoghue et al., 1985) e provas de aglutinação. Na resposta humoral secundária, há produção de IgM, IgG₁ e IgG₂, mas com a cronicidade da infecção ocorre um declínio na concentração de anticorpos e, exclusivamente, persistem imunoglobulinas da classe IgG (Mahoney, 1979). O isótipo IgG é responsável pelas reações persistentes verificadas na IFI e hemaglutinação indireta. A reação e a intensidade desta na FC dependem da presença de anticorpos fixadores de complemento; o isótipo IgM é o mais eficiente. Por esta razão, a FC é a melhor prova para identificar infecções recentes, mas falha em detectar animais com infecções crônicas, por isso não é uma prova indicada para estudos de prevalência. O TCR, por ser uma prova de congutinação, ocorre em cascata, sendo que a primeira reação ocorre entre antígeno e anticorpo, seguindo a fixação do complemento ao complexo, para, finalmente, a congutina combinar através do componente C3_{bi} do complemento (Lachmann, 1967). Baseado neste mecanismo da congutinação, esta reação depende de anticorpos fixadores de complemento, como na FC. Portanto, esta seria a razão pela qual o TCR detectaria anticorpos por um período

mais curto que a IFI. Entretanto, a sensibilidade do TCR é maior que a da FC, fato que também pode ser observado nos resultados obtidos por Kuttler et al. (1977) com FC, e pela análise estatística, pois o TCR não diferiu da IFI ($P \geq 0,05\%$) no diagnóstico de anticorpos contra esta espécie de *Babesia*. A sensibilidade da IFI e TCR foi de 99,1% e 95,7%, respectivamente. Os resultados evidenciam que a sensibilidade desta prova é semelhante à da IFI, o que também foi verificado por Johnston et al. (1973) e Madruga et al. (1986). A mesma constatação é válida para outros testes sorológicos, reconhecidos por possuir alta sensibilidade, como: a hemaglutinação indireta (Goodger & Mahoney, 1974), o radioimunoensaio (Schuntner & Wright, 1989), ou os mais recentes testes de imunoadsorção enzimática (Barry et al., 1982; Waltisbuhl et al., 1987; Bose et al., 1990; Kung'U & Goodger, 1990). Outros testes de aglutinação obtiveram sensibilidade elevada, tais como o teste de aglutinação em partículas de látex (Lopez & Todorovic, 1978; Montenegro et al., 1981; Chieves et al., 1989) para o diagnóstico de imunoglobulinas específicas contra *B. bovis*, mas apresentaram problemas de especificidade.

A especificidade da prova de anticorpos fluorescentes foi de 99,7% e do teste de congutinação, 97,6%, enquanto que a precisão da prova de imunofluorescência foi de 99,4%, e a de aglutinação, 96,5% (Fig. 2).

A estocagem a 4°C por um período aproximado de seis meses (Tabelas 2 e 3) possibilita a utilização

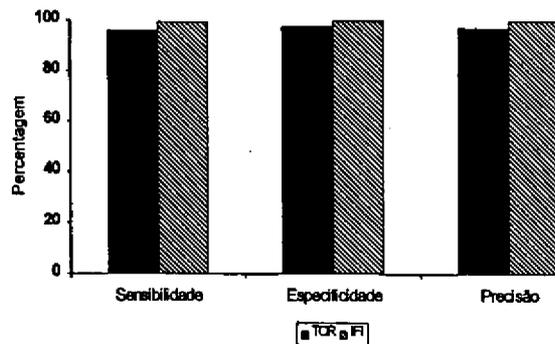


FIG. 2. Sensibilidade, especificidade e precisão do teste de congutinação rápida (TCR) em comparação com a imunofluorescência indireta (IFI) no diagnóstico de anticorpos contra *B. bovis*.

TABELA 2. Análise de desempenho do teste de congutinação rápida com antígeno de *B. bovis*: longevidade e repetibilidade I¹.

Número do animal	Tempo pós-preparação do antígeno (dias)									
	0	17	42	71	97	125	155	172	192	209
	Soros negativos									
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Soros positivos									
11	+++	+++	+++	++++	++++	+++	+++	+++	++	+
12	++	++	+	++	++	++	+	+	-	-
13	+++	+++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++
14	++	++	+++	+++	+++	++	+	+	+	-
15	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-
16	+++	+++	+++	++++	+++	+++	++	++	+	+
17	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
18	+++	+++	+++	++++	++++	+++	+++	++	+++	++
19	++	++	+++	++	++	+	+	+	+	-
20	+++	++	++	++	+++	++	+	+	+	-

¹ Repetibilidade da primeira partida de antígeno.

TABELA 3. Análise de desempenho do teste de congutinação rápida com antígeno de *B. bovis*: longevidade e repetibilidade II¹.

Número do animal	Tempo pós-preparação do antígeno (dias)									
	0	30	61	91	120	152	182	212	245	272
	Soros negativos									
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Soros positivos									
11	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
12	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
13	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
14	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
15	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
16	++	+++	+++	++++	+++	+++	++	++	++	+
17	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
18	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
19	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
20	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

¹ Repetibilidade da segunda partida de antígeno.

deste teste em várias regiões brasileiras onde as facilidades de diagnóstico sorológico não existem ou não são empregadas sistematicamente.

CONCLUSÃO

O TCR-*B. bovis* pode ser empregado em estudos epidemiológicos experimentais e na avaliação das medidas preventivas contra *B. bovis*.

REFERÊNCIAS

- AMERAULT, T.E.; ROSE, J.E.; KUTTLER, K.L. Comparative titration of *Anaplasma marginale* antibodies by card agglutination and complement fixation tests. *American Journal Veterinary Research*, v.42, p.1055-1056, 1981.
- BARRY, D.N.; RODWELL, B.J.; TIMMS, P.; MCGREGOR, W. A microplate enzyme immunoassay for detecting and measuring antibodies to *Babesia bovis* in cattle serum. *Australian Veterinary Journal*, v.59, p.136-140, 1982.
- BOSE, 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 native or a recombinant *B. bovis* antigen. *Parasitology Research*, v.76, p.648-652, 1990.
- CHEVES, L.; WAGNER, G.G.; BYERS, P.T.; FRERICH, W.M. Rapid card test for bovine babesiosis. In: NATIONAL VETERINARY HEMOPARASITE DISEASE CONFERENCE, 8., 1989, St. Louis, MI. *Proceedings...* St. Louis, MI: Veterinary Hemoparasitic Disease Research Workers, 1989. p.341-347.
- GOFF, W.; BARBET, A.; STILLER, D.; PALMER, D.; KNOWLES, D.; KOCAN, K.; GORHAM, J.; MCGUIRE, T.C. Detection of *Anaplasma marginale*-infected tick vectors using cloned DNA probe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.85, p.919-923, 1988.
- GOFF, W.L.; PALMER, G.H.; McELWAIN, T.F.; DAVIS, W.C. Development of ELISA diagnostic test for *Babesia* infections using highly immunogenic specie-specific and strain common surface glycoproteins. In: NATIONAL VETERINARY HEMOPARASITE DISEASE CONFERENCE, 8., 1989, St. Louis. *Proceedings...* St. Louis: Veterinary Hemoparasitic Disease Research Workers, 1989. p.353-376.
- GOODGER, B.V.; MAHONEY, D.F. Evaluation of the parasite haemagglutination for the diagnosis of *Babesia argentina* infection in cattle. *Australian Veterinary Journal*, v.50, p.246-249, 1974.
- JAMES, M.A.; LEVY, K.L.; RISTIC, M. Antibody kinetics in response to vaccination against *Babesia bovis*. *American Journal Veterinary Research*, v.42, p.1999-2003, 1981.
- JOHNSTON, L.A.Y.; PEARSON, R.D.; LEATCH, G. Evaluation of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Babesia argentina* infection in cattle. *Australian Veterinary Journal*, v.49, p.373-377, 1973.
- KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R.; JESUS, E.F. de; SEMPREGOM, D.V. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzootica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.22, n.7, p.747-752, 1987.
- KUNG'U, M.W.; GOODGER, B.V. A slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for the diagnosis of *Babesia bovis* infections and for screening of *Babesia* specific monoclonal antibodies. *International Journal of Parasitology*, v.20, p.341-345, 1990.
- KUTTLER, K.L.; ADAMS, L.G.; TODOROVIC, R.A. Comparisons of the complement fixation and indirect fluorescent antibody reactions in the detection of bovine babesiosis. *American Journal of Veterinary Research*, v.38, p.153-156, 1977.
- LACHMANN, P.J. Conglutinins and immunocglutinins. *Advances in Immunology*, v.6, p.479-527, 1967.
- LOPEZ, V.G.; TODOROVIC, R. Rapid latex agglutination (RLA) test for diagnosis of *Babesia argentina*. *Veterinary Parasitology*, v.4, p.1-9, 1978.
- MADRUGA, C.R.; KESSLER, R.H.; JESUS, E.F.; SETE, A.J. do. Imunofluorescência indireta para diagnóstico sorológico de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*. Produção de antígenos com cepas isoladas no Estado de Mato Grosso do Sul e avaliação preliminar do teste. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1986. 6p. (Embrapa-CNPGC. Pesquisa em Andamento, 32).

- MAHONEY, D.F. Bovine babesiosis: Preparation and assessment of complement fixing antigens. *Experimental Parasitology*, v.20, p.32-241, 1967.
- MAHONEY, D.F.; KERR, J.D.; GOODGER, B.V.; WRIGHT, I.G. The immune response off cattle to *Babesia bovis* (Syn. *B. argentina*). Studies on the nature and specificity of protection. *International Journal of Parasitology*, v.9, p.297-306, 1979.
- MONTENEGRO, S.; JAMES, M.A.; LEVY, M.G.; PRESTON, M.D.; ESPARZA, H.; RISTIC, M. Utilization of culture derived soluble antigen in the latex agglutination test for bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, v.8, p.291-297, 1981.
- O'DONOGHUE, P.J.; FRIEDHOFF, K.T.; VISCAINO, O.G.; WEYRETER, H. The detection of IgM and IgG antibodies against *Babesia bigemina* in bovine sera using a semi-defined antigens in enzyme immunoassays. *Veterinary Parasitology*, v.18, p.1-12, 1985.
- ROSE, J.E.; AMERAULT, T.E.; ROBY, T.O. Roles of conglutinin, complement and antibody size in the card agglutination test for bovine anaplasmosis. *American Journal of Veterinary Research*, v.35, p.1147-1151, 1974.
- ROSS, J.P.J.; LOHR, K.F. Serologic diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. *Research in Veterinary Science*, v.9, p.557-562, 1968.
- SCHUNTNER, C.A.; WRIGHT, I.G. Detection of *Babesia bigemina* in cattle by a radioimmunoassay incorporating specifically depleted antigen. *Veterinary Parasitology*, v.31, p.229-241, 1989.
- TODOROVIC, R.A.; KUTTLER, K.L. A babesiosis card agglutination test. *American Journal Veterinary Research*, v.35, p.1347-1350, 1974.
- TODOROVIC, R.A.; LONG, R.F. Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia* spp. infections in Colombian cattle. *Zeitschrift fur Tropenmedizin Parasitologie*, v.27, p.169-181, 1976.
- TODOROVIC, R.A.; VISCAINO, O.G.; ADAMS, L.G. The detection of babesial antibodies by the complement fixation technique. *Revista do Instituto Colombiano Agropecuario*, v.6, p.213-233, 1971.
- WALTISBUHL, D.J.; GOODGER, B.V.; WRIGHT, J.G.; COMMINS, M.A.; MAHONEY, D.F. An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitology Research*, v.73, p.126-131, 1987.