



Protocolos para diagnóstico de babesiose e anaplasmosse



*Lenita Ramires dos Santos
Flávio Ribeiro Araújo
Emanuelle Baldo Gaspar
Cláudia Cristina Gúlias Gomes
Ana Maria Sastre Sacco
Magda Vieira Benavides
Carlos Alberto do Nascimento Ramos*



INTRODUÇÃO

Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de doenças transmitidas pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que tem como agentes etiológicos os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, e a riquetsia *Anaplasma marginale*. A ocorrência destas enfermidades tem ampla distribuição, envolvendo áreas de clima tropical e subtropical as quais englobam praticamente todo o território brasileiro.

No Brasil, perdas econômicas consideráveis (estimada em torno de três bilhões de dólares anuais) estão associadas à infestação do rebanho bovino pelo carrapato *R. microplus* (GRISI et al., 2014). As doenças do complexo TPB contribuem para este cenário de prejuízo na pecuária de corte nacional, especialmente em áreas de instabilidade enzoótica.

É preciso considerar que, até o momento, não há um método de diagnóstico laboratorial comercialmente disponível para o diagnóstico de anaplasnose e babesiose.

Neste capítulo são apresentados protocolos selecionados, de técnicas que permitem a detecção da infecção por *Anaplasma marginale* ou *Babesia* sp, quer seja pelo uso de métodos diretos ou indiretos. Algumas destas técnicas têm permitido estudos de prevalência e/ou incidência da doença por diversos grupos de pesquisa em nosso país.

Porém, na ausência de métodos diagnósticos laboratoriais comercialmente disponíveis, as únicas alternativas ao Médico Veterinário de campo são o diagnóstico clínico ou o diagnóstico *post-mortem*, o que pode comprometer a eficiência da determinação do agente etiológico e a escolha da melhor alternativa terapêutica.

DIAGNÓSTICO DIRETO

O diagnóstico laboratorial direto para babesiose e anaplasnose é usado na clínica veterinária para confirmação da suspeita clínica por observação direta do parasito em amostras colhidas do animal suspeito. Também pode ser usado na detecção do parasito em vetores. Diversas técnicas estão disponíveis para este fim e elas incluem detecção dos parasitos no interior de hemácias de sangue periférico a partir de esfregaço sanguíneo, citologia por decalque e, mais recentemente, pela amplificação de fragmentos de DNA (diagnóstico molecular) para os microrganismos em estudo pelo uso da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

ESFREGAÇO SANGUÍNEO DE CAMADA DELGADA

Introdução e princípio da técnica

Este exame consiste na observação de *B. bovis*, *B. bigemina* e/ou *A. marginale* em hemácias de sangue periférico de bovinos. Por ser de fácil execução, baixo custo e alta especificidade, ainda é, atualmente, o método de eleição para a comprovação do diagnóstico clínico no período patente da doença. Também pode ser usado no diagnóstico *post-mortem*.

Material e equipamentos

- Lâminas limpas e secas (lavar com detergente neutro, enxaguar com água destilada e manter em álcool; secar com pano limpo antes do uso);

- Agulha estéril;
- Lápis;
- Lamparina pequena com álcool (opcional);
- Caixa para lâminas;
- Suporte para lâminas;
- Cuba de coloração;
- Corantes (sugere-se coloração pelo método May-Grunwald-Giemsa);
- Metanol;
- Óleo de imersão;
- Microscópio óptico com objetiva de 100 x;
- Ventilador (opcional).

Execução da técnica

1. Usar agulha estéril para fazer pequena punção em vaso sanguíneo da ponta da orelha ou ponta da cauda do bovino.
2. Depositar uma gota do sangue periférico em uma das extremidades da lâmina (Figura 4.1), evitando encostar a orelha ou a cauda na lâmina.
3. Tocar na gota com a borda de uma segunda lâmina, posicionada em ângulo de 45°, de forma que a gota de sangue se espalhe na borda da segunda lâmina (Figura 4.1).
4. Deslizar a segunda lâmina sobre a primeira em movimento homogêneo, de modo a formar uma franja no final da camada (Figura 4.1). Quanto menor o ângulo entre as duas lâminas, mais delgado será o esfregaço (recomendado). Quanto maior a gota de sangue, mais espesso será o esfregaço, característica esta indesejável (MAIOS & MAIOS, 1988).
5. Secar a lâmina ao ar ou ao calor (passando a lâmina cerca de 15 cm de distância da chama do fogo).

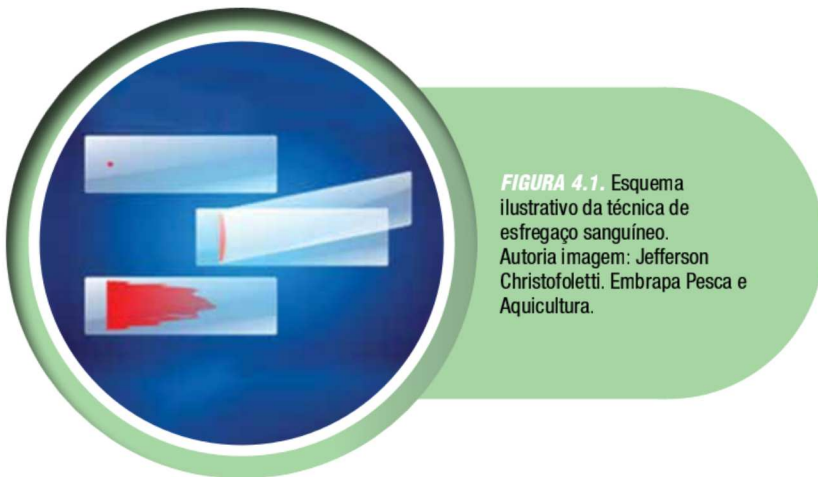


FIGURA 4.1. Esquema ilustrativo da técnica de esfregaço sanguíneo. Autoria imagem: Jefferson Christofletti. Embrapa Pesca e Aquicultura.

6. A identificação da lâmina deve ser feita com lâpis na extremidade espessa do esfregaço.
7. Fixar o esfregaço mergulhando a lâmina em metanol por 5 minutos.
8. Deixar secar ao ar ou em frente a ventilador.
9. Corar a lâmina pelo método de May-Grunwald-Giemsa ou com kit comercial de coloração equivalente.
10. Deixar secar ao ar ou em frente a ventilador.

Análise e interpretação

A lâmina deverá ser examinada em microscópio óptico, em objetiva de 100x, com óleo de imersão. Percorrer a lâmina em sua porção final (área da franja), observando o interior das hemácias. *Babesia bovis* e *B. bigemina* se apresentam em forma de corpúsculos piriformes, geralmente aos pares, ou em forma anelar. Enquanto a *B. bovis* ocupa menos de $\frac{1}{4}$ do eritrócito, a *B. bigemina* ocupa $\frac{3}{4}$ ou mais (Figura 4.2 A e 4.2 B).

Anaplasma marginale é encontrado na forma de pequeno corpúsculo escuro, arredondado, refringente e periférico (Figura 4.2 C). Poderá ser confundido com artefatos de coloração ou com corpúsculos de Howell-Jolly (fragmentos nucleares). Porém, estes não são uniformes em tamanho e posição. Os artefatos de coloração, geralmente, não desaparecem juntamente com o eritrócito ao movimentar-se o micrômetro.

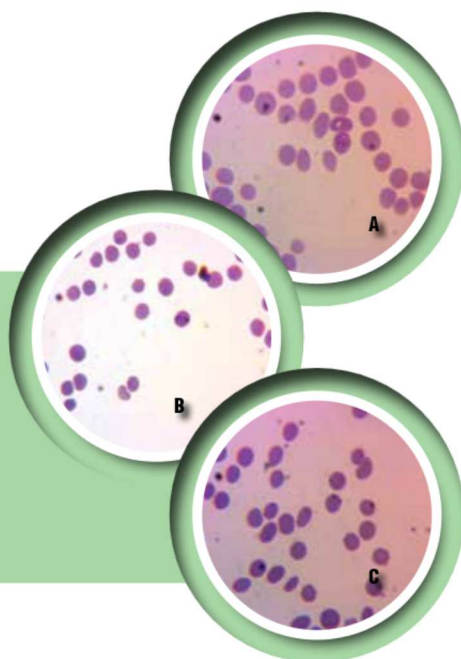


FIGURA 4.2. (A) *Babesia bigemina* (formas anelar e piriforme). (B) *Babesia bovis* (forma piriforme). (C) *Anaplasma marginale*. Imagens de Bernardo M. Franck, Embrapa Pecuária Sul.

Estimativa do percentual de parasitemia em esfregaço sanguíneo de camada delgada

O esfregaço sanguíneo de camada delgada poderá ser usado para estimar o grau de parasitemia do bovino, ou seja, o percentual de eritrócitos infectados. A forma de cálculo é descrita a seguir (IICA, 1987):

- Selecionar uma região da lâmina com vários eritrócitos, porém sem sobreposição destes. Contar o número de eritrócitos total e parasitados.
- Usar leituras de três campos para calcular a média do número total de eritrócitos.
- Percorrer novos campos (para aumentar o número de eritrócitos contados) contabilizando o número de eritrócitos infectados. O número de campos percorridos deverá corresponder aproximadamente a 10.000 eritrócitos em infecções por *B. bovis* e de 1.000 a 5.000 eritrócitos em infecções por *B. bigemina* ou *A. marginale*.
- Usar regra de três para estimar o número de eritrócitos infectados a cada 100 eritrócitos contados.

CITOLOGIA POR DECALQUE (IMPRINT DE ÓRGÃOS)

Introdução e princípio da técnica

A citologia por decalque ou *imprint* no diagnóstico de babesiose e anaplasmoses é indicada em casos de exame post-mortem, quando há suspeita do parasitismo como causa do óbito. Como a velocidade de decomposição dos tecidos é diferenciada entre os órgãos, recomenda-se que nas primeiras oito horas post-mortem o *imprint* seja realizado considerando-se a seguinte ordem de prioridade: rins, coração, baço, fígado e cérebro. Após oito horas, é indicada a seguinte priorização: baço, cérebro, coração, rins e fígado (IICA, 1987).

Material e equipamentos

- Lâminas limpas e secas (Lavar com detergente neutro, enxaguar com água destilada e manter em álcool. Secar com pano limpo antes do uso);
- Cabo e lâmina de bisturi ou tesoura cirúrgica;
- Caixa para lâminas;
- Suporte para lâminas;
- Cuba de coloração;
- Corantes (sugere-se coloração pelo método May-Grunwald-Giemsa);
- Óleo de imersão;
- Microscópio óptico com objetiva de 100 x.

Execução da técnica

1. Seccionar pequeno fragmento do órgão.
2. Encostar a superfície do fragmento na lâmina, de preferência, que contenha capilares de sangue. Não pressionar.
3. Secar a lâmina ao ar.
4. Corar pelo método de May-Grunwald-Giemsa ou com kit de coloração equivalente (OBS: A fixação é parte do processo de coloração).

Análise e interpretação

Examinar a superfície da lâmina em microscópio óptico, objetiva de 100x, com óleo de imersão, à procura de hemácias parasitadas.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA TPB

Diversos métodos foram desenvolvidos ao longo dos anos para o diagnóstico molecular dos agentes da TPB. No entanto, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações (nested-PCR, multiplex-PCR, qPCR, etc.) sobressaíram em relação às demais devido à praticidade, menor custo, e melhores sensibilidade e especificidade.

Inicialmente, devido aos altos níveis de sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico molecular, associados à característica dos agentes de causarem infecções crônicas subclínicas, o diagnóstico molecular da TPB tornou-se extremamente útil em estudos epidemiológicos e experimentos de avaliação vacinal e terapêutica. Porém, sua aplicabilidade clínica permaneceu limitada. No entanto, com o desenvolvimento de técnicas de PCR quantitativa esse cenário está passando por importantes mudanças, e a utilização do diagnóstico molecular da TPB já pode ser considerada.

PCR EM TEMPO REAL (QPCR)

Introdução e princípio da técnica

A PCR em tempo real é um método de diagnóstico molecular baseado na amplificação de fragmentos específicos de DNA, delimitados por iniciadores (*primers*), cuja sinalização referente à amplificação de DNA ocorre por meio de moléculas fluorescentes, sendo a intensidade de fluorescência proporcional à quantidade de fragmentos de DNA gerados.

Basicamente, existem dois sistemas de detecção de amplificação utilizados em qPCR, um sistema baseado em fluoróforos intercalantes e outro baseado em sondas de hidrólise. Cada um dos sistemas apresenta vantagens e desvantagens que devem ser consideradas antes da escolha do método e também na interpretação dos resultados.

PCR EM TEMPO REAL (QPCR) PARA *ANAPLASMA MARGINALE*, *BABESIA BOVIS*

Material e equipamentos

- DNA de *Anaplasma marginale* (controle positivo), DNA de *Babesia bovis* (controle positivo);
- Sybr Green PCR master mix;
- Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*);

Anaplasma marginale (gene *msp5*) apresentados em BACANELLI et al. (2014) (produto de amplificação de 104 pares de bases):

AM1R F: 5' AAGGCGAGGAGC1G11TAAG 3'

AM1R R: 5' CTAC1GCC1CACAAAGGACGA 3'

Babesia bovis (gene *msa2c*) apresentados em RAMOS et al. (2011) (produto de amplificação de 97 pares de bases):

msa2c 2F 5' GGACAAAI^TTAAGCAACCAI^TACAAA3'

msa2c 2R 5' AGC^TTTCC^TTG^TTT^TCGAAT^TTTA^TAA3'

- Água livre de nuclease;
- Microtubos para qPCR (de acordo com o termociclador utilizado);
- Ponteiras com filtro;
- Luvas de látex para procedimento, sem talco;
- Micropipetas;
- Estante para microtubos;
- Gelo ou termobloco;
- Mapa de identificação para o posicionamento dos tubos no termociclador (elaborado pelo usuário);
- Lápis para identificação;
- Termociclador;
- Cabine para PCR;
- DNA das amostras.

Execução da técnica

1. Descongelar todos os reagentes em gelo.
2. Calcular os volumes a serem pipetados de acordo com o número de reações a serem feitas (incluir uma amostra como controle negativo e uma amostra como controle positivo) e na dependência das concentrações dos reagentes. Utilizar os volumes e quantidades abaixo descritas como referência para uma análise:

qPCR para *msp-5*

SYBR Green/ROX PCR master mix – 6,25 µL (ou de acordo com as recomendações do fabricante).

Primer *forward* (AM1R *msp-5* F) e primer *reverse* (AM1R *msp-5* R) – 50 ng de cada um (referência mencionada anteriormente).

DNA molde – 100 ng (deverá estar concentrado em 1 µL).

Água livre de nuclease (q.s.p.) – 12,5 µL.

qPCR para *msa2c*

SYBR Green/ROX PCR master mix – 6,25 µL (ou de acordo com as recomendações do fabricante).

MgCl₂ – 3 mM.

Primer *forward* (*msa2c* 2F) e primer *reverse* (*msa2c* 2R) – 3 pmol cada um deles (referência mencionada anteriormente).

DNA molde – 50 ng (deverá estar concentrado em 1 µL).

Água livre de nuclease (q.s.p.) – 12,5 µL.

3. Dispor os microtubos para qPCR de acordo com o planejamento registrado no mapa de identificação.
4. Adicionar todos os componentes da reação, exceto o DNA, em um microtubo de 1,5 mL, compondo o *mix* de PCR.
5. Distribuir 11,5 µL do *mix* para PCR em cada microtubo.

6. Adicionar a cada microtubo o seu respectivo DNA, seguindo o mapa de identificação, em volume de 1 μ L.
7. Incluir um microtubo contendo 1 μ L de água livre de nuclease em substituição ao DNA molde, como controle negativo c.
8. Programar no termociclador em tempo real as condições para cada ensaio, como descrito:
 - qPCR para msp-5 *A. marginale*:
 - 50°C – 2 minutos
 - 95°C – 2 minutos
 - 40 ciclos de 95°C – 30 segundos
 - 54°C – 15 segundos
 - qPCR para msa2c *B. bovis*:
 - 50°C – 2 minutos
 - 95°C – 2 minutos
 - 40 ciclos de 95°C – 30 segundos
 - 54°C – 15 segundos
9. Ao término da reação de qPCR, proceder à análise com os dados apresentados pelo sistema (considerando a linha limite ou *threshold line*, entre outros parâmetros).

Interpretação dos resultados

Durante a amplificação, o termociclador calcula a linha limite ou *threshold line*, a partir da qual as amostras são positivas. Após o término da amplificação, há o cálculo da temperatura de dissociação dos produtos. Os corantes intercalantes utilizados em qPCR fluorescem apenas quando eles são ligados à cadeia dupla de DNA (dsDNA). Eles não apresentam fluorescência na presença de DNA de cadeia simples (ssDNA), ou quando os corantes são livres em solução.

Tipicamente, o termociclador é programado para produzir a curva de dissociação depois que os ciclos de amplificação tiverem sido concluídos. Ao final da corrida, o termociclador começa a uma temperatura pré-ajustada (geralmente acima da temperatura de dissociação-1m dos iniciadores) e mede a quantidade de fluorescência. A temperatura da amostra é então aumentada progressivamente e o equipamento continua a medir a fluorescência. Como a temperatura aumenta, ocorre a desnaturação do dsDNA em cadeia simples, e o corante dissocia-se, resultando em diminuição de fluorescência. A alteração no declive desta curva é então traçada como uma função de temperatura para obter a curva de dissociação.

No caso de *B. bovis*, deve-se observar amplificação de um produto (RAMOS et al., 2011) com temperatura de dissociação de 77,41°C ($\pm 0,25^\circ\text{C}$) (Figura 4.3) No caso de *A. marginale* observa-se amplificação de um produto com temperatura de dissociação de 81,19°C ($\pm 0,26^\circ\text{C}$) (BACANELLI et al., 2014).

Considerações

Para interpretação/confirmação dos resultados, deve-se incluir análise da integridade das amostras e capacidade de amplificação da reação (ausência de inibidores) pelo uso de oligonucleotídeos iniciadores para genes constitutivos. Na padronização dos tes-

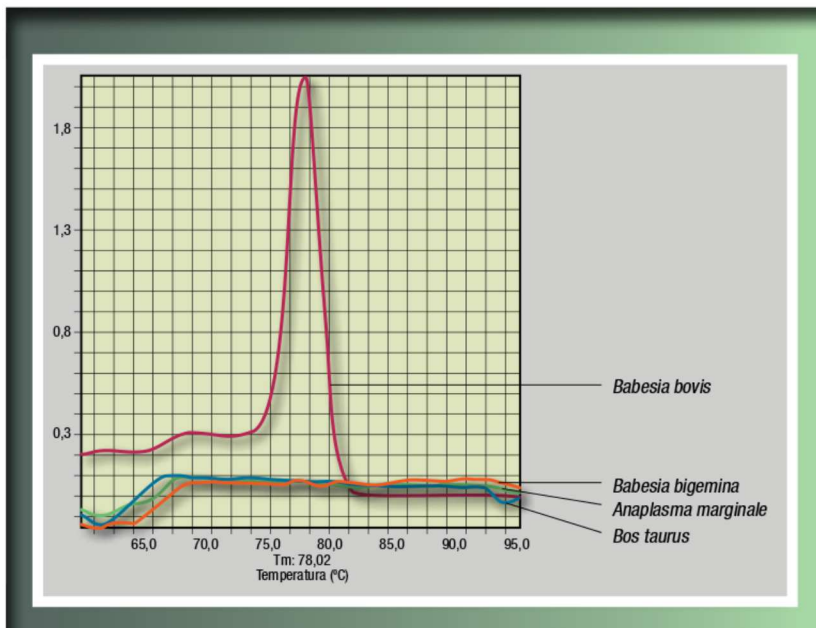


FIGURA 4.3. Curva de dissociação em PCR em tempo real com amostras de DNA de *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *A. marginale* e *Bos taurus* em qPCR para detecção de *B. bovis* (apresentado em Ramos et al., 2011).

tes para qPCR de *A. marginale* e qPCR para *B. bovis* foram utilizados oligonucleotídeos para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -actina, respectivamente.

DIAGNÓSTICO INDIRETO

O diagnóstico indireto para babesiose e anaplasmoze é feito por meio da demonstração de alterações específicas no hospedeiro, as quais ocorrem a partir da interação com o patógeno (produção de anticorpos ou redução de hemácias circulantes), diferentemente do que ocorre no diagnóstico direto, o qual é possível a partir do resultado do isolamento ou observação do agente patogênico. Em muitos casos, a sensibilidade e a especificidade dos testes indiretos, aliados ao baixo custo da técnica, são fatores chave para a escolha do diagnóstico por estes métodos.

MICROHEMATÓCRITO PARA DETERMINAÇÃO DO VOLUME GLOBULAR (VG)

Introdução e princípio da técnica

O volume globular é um parâmetro de estimativa do número e tamanho de glóbulos vermelhos presentes na circulação sanguínea. Em caso de infecções pelos agentes da IPB, há redução do número de glóbulos vermelhos circulantes, em consequência à destruição destas células pelo parasito e/ou pelo organismo. A técnica de microhematócrito consiste na separação dos constituintes do sangue em três partes (eritrócitos, leucócitos + plaquetas e plasma) por meio da centrifugação e é comumente usada para determinação do volume globular.

Material e equipamentos

- Seringas e agulhas para coleta de sangue;
- Tubos para coleta de sangue com anticoagulante;
- Rack para tubos;
- Tubo capilar;
- Massa de modelar;
- Centrifuga com rotor para tubo capilar de micro hematócrito;
- Cartão para análise do volume globular.

Execução da técnica

1. Coletar cerca de 3 mL de sangue em tubo com anticoagulante.
2. Inverter lentamente o tubo para promover a mistura do sangue com o anticoagulante. Manter a amostra a 8°C até a execução da análise.
3. Inverter lentamente o tubo para homogeneização da amostra de sangue.
4. Preencher o tubo capilar até, aproximadamente, dois terços do comprimento do tubo.
5. Vedar o lado com sangue usando massa de modelar ou em chama azul com o auxílio de bico de Bunsen.
6. Dispor os microcapilares na centrifuga com a extremidade fechada apoiada na base externa do círculo, distribuindo os microcapilares de forma balancear o peso na centrifuga.
7. Centrifugar por 5 minutos a 10.000 rotações por minuto (RPM).

Análise e interpretação

A leitura pode ser feita em cartão para microhematócrito que acompanha a centrifuga ou em aparelho apropriado. A relação entre o volume total de sangue e o volume de eritrócitos será expressa em porcentagem no cartão, correspondente à faixa de eritrócitos (porção vermelha). O valor encontrado deve ser comparado aos valores de referência normais de volume globular para bovinos.

SOROLOGIA (OU IMUNODIAGNÓSTICO)

A palavra sorologia originalmente refere-se à identificação da presença de antígenos ou anticorpos no soro (parte que permanece líquida após a coagulação de um fluido

orgânico, especialmente o sangue), ainda que, atualmente este conceito tenha sido ampliado para uma definição mais abrangente que engloba qualquer método que envolva a detecção e/ou quantificação de interações antígeno-anticorpo, mesmo que esta não seja realizada em fluidos animais. Neste sentido, pode-se considerar sorologia um significado para imunodiagnóstico.

As técnicas sorológicas podem ser divididas em diferentes categorias. Esta categorização das técnicas varia um pouco conforme o autor. Uma maneira simples de se agrupar as técnicas sorológicas leva em consideração a forma de observação da interação antígeno-anticorpo. Neste sentido macrotécnicas são as quais a detecção da interação é visível a olho nu, tais como aglutinação, hemoaglutinação, precipitação, imunodifusão. Já nas microtécnicas para a detecção da interação antígeno-anticorpo é necessário algum tipo de equipamento. Estas técnicas incluem o radioimunoensaio (RIA), a imunofluorescência (RI ou RIFI) e o ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA). Neste item estão descritos como protocolos de microtécnicas ELISA e RIFI, e como protocolo de macrotécnica a aglutinação em látex.

Os soros controles utilizados em sorologia e diagnóstico de babesiose e anaplasose devem ser obtidos considerando-se alguns critérios, a saber: o soro negativo deverá ser obtido de bovino sem contato prévio com *B. bovis*, *B. bigemina* ou *A. marginale*, preferencialmente, proveniente de área livre destes parasitos/riquétsia. O soro controle positivo forte deverá ser obtido de bovino com parasitemia patente para o patógeno para o qual servirá de controle (avaliado previamente por meio de técnicas diretas de diagnóstico). Não devem ser usados soros de animais com infecção mista. Já o soro controle positivo fraco poderá ser obtido com diluições do soro positivo forte.

IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA

Introdução e princípio da técnica

No ensaio de imunofluorescência indireta (IFI), a detecção da reação se dá pelo uso de anticorpos marcados com fluorocromos. Estas substâncias têm a capacidade de absorver energia luminosa, tornando-as excitadas por um espaço de tempo extremamente curto (10^{-9} a 10^{-7} segundos), para em seguida emití-la em um comprimento de onda maior, na forma de fluorescência, ao retornarem ao seu estado normal.

Os fluorocromos mais usualmente empregados são os derivados da rodamina e o isotiocianato de fluoresceína (FITC), os quais emitem fluorescência vermelha e verde, respectivamente. A imunofluorescência indireta para babesiose e anaplasose é baseada na reação de anticorpos específicos presentes no soro bovino com os parasitas (*B. bovis*, *B. bigemina* ou *A. marginale*) presentes em lâmina de microscopia. Para a revelação, utiliza-se conjugado (normalmente anti-IgG bovina) marcado com fluorocromos para evidenciar a reação em microscópio de epifluorescência.

Em uma reação positiva o soro teste contendo anticorpos contra os parasitas interage com o antígeno na lâmina e a fluorescência é observada quando o conjugado é adicionado. Já a reação negativa há ausência de fluorescência.

A descrição abaixo apresenta um protocolo de imunofluorescência indireto padronizado para detecção de anticorpos anti *B. bovis*, *B. bigemina* ou *A. marginale*, baseado nas publicações de Madruga et al., 1986, Sacco, 1996 e Madruga et al., 2001.

Material e equipamentos

Para preparo do antígeno

- Sangue de animal doador com parasitemia patente para cada um dos agentes patogênicos;
- Citrato de sódio 3,8%;
- Tubos de centrifugação;
- Tampão salina tamponada (PBS) pH7,2 (7,5 mM Na₂HPO₄; 2,3 mM KH₂PO₄; 145 mM NaCl) ou solução salina;
- Centrifuga refrigerada;
- Lâminas de vidro;
- Papel macio (absorvente);
- Papel alumínio.

Para imunofluorescência

- Antígeno de *B. bovis*, *B. bigemina* ou *A. marginale*, previamente distendido em lâmina de vidro lisa e armazenada a -20°C ou -80°C;
- Soro controle negativo e soro controle positivo específico;
- Soros testes;
- Anti-IgG bovina marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC);
- Tampão salino-fosfatado (PBS) pH 7.2 (7,5 mM Na₂HPO₄; 2,3 mM KH₂PO₄; 145 mM NaCl);
- Solução de lavagem final pH 7,0 (44,3 mM Na₂HPO₄; 27,8mM KH₂PO₄);
- Microscópio de epifluorescência;
- Câmara úmida;
- Microtubos e/ou placa de ELISA de 96 orifícios;
- Estufa;
- Cubas para lavagens de lâminas;
- Micropipetas;
- Esmalte escuro;
- Seringa de 1 mL;
- Freezer -80°C (ou botijão de nitrogênio líquido) e -20°C;
- Balança de precisão;
- Agitador orbital;
- Ponteiras descartáveis;
- Ventilador (opcional).

Diluição dos soros

	TESTE	CONTROLE +	CONTROLE -
<i>Babesia</i>	1:160 e 1:320	1:160	1:160
<i>Anaplasma</i>	1:320 e 1:640	1:320	1:320

As diluições indicadas para os soros testes e controles foram determinadas por ensaios prévios de padronização da técnica, na qual os soros foram diluídos de forma seriada em base dois.

Definição da diluição de uso do conjugado anti-IgG bovina/FITC

Definição do título: Preparar diluições crescentes do conjugado em PBS em base 2 (Ex.: 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 ou mais, se necessário) e analisar a fluorescência de cada diluição com soros controle positivo (C+) e negativo (C-), em triplicatas. A diluição de uso será a anterior a partir da qual a fluorescência começa a perder a intensidade.

Recomenda-se manter alíquotas pequenas para evitar descongelamentos frequentes de todo o conjugado na retirada de amostras. Além disso, a repetitividade de um novo conjugado poderá ser aferida comparando-se o resultado de soros conhecidos avaliados concomitantemente ao conjugado de partida anterior.

Preparação de antígeno para imunofluorescência

1. Coletar sangue de animal com infecção única (*B. bovis* ou *B. bigemina* ou *A. marginale*) e parasitemia patente utilizando citrato de sódio (3,8%) na proporção de 1:10 (1 parte de citrato + 9 partes de sangue).
2. Distribuir em tubos e centrifugar a 1.600 x g por 15 minutos sob refrigeração (4°C).
3. Retirar o plasma e a camada de leucócitos. Retirar o máximo que for possível da camada de leucócitos.
4. Suspender as hemácias em solução tampão fosfato (pH 7,2) ou salina.
5. Centrifugar por 15 minutos 1.600 x g sob refrigeração.
6. Retirar o sobrenadante e leucócitos (pequena camada branca logo acima da grande camada vermelha composta por hemácias).
7. Suspender as hemácias com as mesmas soluções. Centrifugar em condições idênticas às anteriores. Este processo deve ser repetido três vezes.
8. Após a última centrifugação, o volume final de hemácias deve ser ajustado com tampão salina fosfatada pH 7,2 para 50% a 60% do volume final. Fazer hematócrito para conferir. Se não estiver neste valor, concentrar por centrifugação ou diluir.
9. Utilizar lâminas novas para confecção dos esfregaços. O esfregaço deve ser delgado, porém não muito fino – homogêneo e sem cauda.
10. Secar as lâminas ao ar ou com auxílio de um ventilador.
11. Após a completa secagem, embalar cada lâmina em papel macio e cobrir grupos de cinco lâminas com papel alumínio.
12. Armazenar à temperatura de -80°C em embalagem que não permita ficar úmido. O armazenamento de lâminas a -20 °C pode ser feito para uso imediato (duração até 6 meses).

Execução da técnica – Imunofluorescência Indireta

1. Transferir as lâminas de antígeno do freezer para estufa a 37°C por 10 minutos.
2. Fazer círculos de 4 mm com esmalte sobre a distensão (sugestão de 21 círculos por lâmina) com o auxílio de uma agulha em seringa de 1 mL contendo o esmalte.

3. Diluir os soros teste para *Babesia* spp. 1:160 e 1:320 e *A. marginale* 1:320 e 1:640 em PBS 1x.
4. Distribuir uma gota dos soros teste (aproximadamente 10 µL) de acordo com o modelo de lâmina das Figuras 4.4 e 4.5.
5. Em cada lâmina, adicionar 10 µL dos soros controles positivo forte, positivo fraco e negativo.
6. Incubar por 30 minutos a 37°C em câmara úmida.
7. Lavar as lâminas 3 vezes em PBS pH 7,2, sob fraca agitação, por 10 minutos.
8. Aguardar secagem (pode ser usado ventilador).
9. Adicionar 10 µL de anticorpo anti-IgG bovina conjugado com FITC, diluído conforme definido em ensaio anterior, em cada área de reação em local escuro.
10. Incubar as lâminas por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida.
11. Lavar duas vezes em PBS durante 10 minutos e uma vez em solução de lavagem final (pH 7,0) por 5 minutos.
12. Colocar para secar em local escuro.
13. Visualizar em microscópio de epifluorescência em objetiva de 40x.

FIGURA 4.4. Esquema da distribuição dos soros controle (em negrito) e dos soros teste para *Babesia*. Adaptado de Madruga et al. (2001).

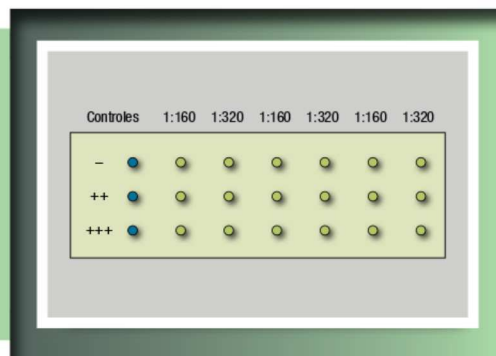
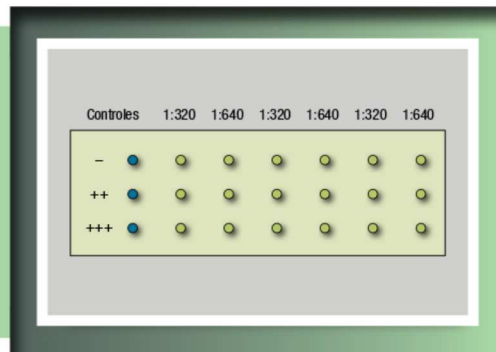


FIGURA 4.5. Esquema da distribuição dos soros controle (em negrito) e dos soros teste para *Anaplasma marginale*. Adaptado de Madruga et al. (2001).



Análise das lâminas e interpretação

Examinar cada campo em microscópio de epifluorescência. Iniciar leitura pelos campos controle para confirmar a qualidade das reações. Proceder leitura dos demais campos classificando-os como positivo fraco (++) , positivo forte (+++) ou negativo (-). Indicar como resultado positivo do soro teste a maior diluição positiva forte para cada amostra.

Considerações

É possível visualizar a reação da IFI até mesmo no dia posterior à execução da técnica, desde que a lâmina fique sob refrigeração, no escuro. Como se trata de um processo longo, a interrupção da técnica após a lavagem do soro é perfeitamente aceitável, não apresentando interferência no resultado final desde que a lâmina esteja seca e seja guardada em recipiente protegido, sob refrigeração. Ao aplicar os soros testes e controles não arranhar ou raspar a superfície da lâmina, especialmente com a ponta da ponteira, para evitar a retirada do antígeno, assim como não se deve misturar o conteúdo dos círculos/poços.

ENSAIO IMUNOADSORVENTE LIGADO À ENZIMA (ELISA – ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Introdução e princípio da técnica

O ensaio imunoadsorvente ligado à enzima, ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) é um ensaio imunoenzimático, pois faz uso de anticorpos e antígenos e depende de enzimas ligadas a um destes reagentes para a detecção da reação. É um teste muito utilizado para o diagnóstico de doenças, tanto na medicina humana, quanto na veterinária.

Para este teste, um dos componentes é imobilizado fisicamente em uma fase sólida (poço da placa, usualmente de poliestireno). Na sequência são adicionados vários reagentes em solução aquosa, que são incubados em diferentes passos, com lavagens entre cada um dos passos. Na etapa final do teste a reação da enzima ligada ao antígeno ou anticorpo, com seu substrato e cromógeno específico, promove uma mudança de cor no líquido final, que permite a mensuração da quantidade de analito (antígeno ou anticorpo, dependendo do tipo de teste). A leitura quantitativa é baseada na intensidade de luz absorvida por espectrofotometria. A sensibilidade do teste depende da amplificação de sinais durante a reação.

Existem, na literatura, diversos testes de ELISA padronizados para a pesquisa de IgG para o diagnóstico de babesiose e anaplasmoze. A grande maioria destes é de ELISA indireto, mas também já foram padronizados diversos testes de ELISA competitivo. Neste livro serão abordados estes dois tipos de teste. Além destes, já foram padronizados ELISA de captura para pesquisa de antígeno de *A. marginale* (TRUEBLOOD et al., 1991), e testes indiretos para a pesquisa de IgM produzida em resposta à infecção por *Babesia* (RUIZ et al., 2001; GONÇALVES et al., 1999).

ELISA INDIRETO

O ELISA indireto para diagnóstico de babesiose e anaplasmoze é um teste no qual o componente imobilizado na fase sólida (placa) é um antígeno de *B. bovis* ou *B. bigemina*

ou *A. marginale*, respectivamente, e os analitos pesquisados são anticorpos produzidos contra estes parasitas (normalmente IgG).

O antígeno imobilizado na placa pode ser tanto antígeno bruto de *Babesia* ssp. ou *A. marginale*, quanto proteínas recombinantes específicas obtidas por meio da tecnologia do DNA recombinante. Neste capítulo será apresentado protocolo de ensaio indireto de detecção de anticorpos anti-*A. marginale* por ELISA o qual se utiliza uma proteína recombinante como antígeno para adsorção nos poços.

ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-A. MARGINALE

Material e equipamentos

- Proteína recombinante MSP-5 (rMSP-5) truncada (ARAÚJO et al., 2006);
- Placas de 96 poços (Costar 3590 – Corning);
- Tampão salino-fosfatado (PBS) pH 7,2;
- Polisorbato 20 (Iween 20®);
- Leite em pó desnatado;
- Estufa 37°C;
- Anti IgG bovina/peroxidase;
- Ortofenilenodiamina (OPD) – 5 mg/pastilha;
- H₂O₂;
- H₂SO₄ 2,5 N;
- Espectrofotômetro de placas que permita leitura em 490 nm.

Execução da técnica

1. Sensibilizar a placa de 96 poços com rMSP-5 truncada (13 ng/poço – em volume de 100 µL) diluída em PBS-Iween® 0,1% (PBS-I) por incubação a 4°C por 12 horas. Descartar todo o volume.
2. Realizar o bloqueio de sítios inespecíficos com 100 µL de PBS-I 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado, por uma hora a 37°C.
3. Após descartar a solução de bloqueio, lavar a placa por 5 vezes com PBS-I.
4. Diluir a 1:600 os soros testes, controles positivos e negativos, em PBS-I e aplicar 100 µL/poço.
5. Incubar por uma hora a 37°C.
6. Descartar as amostras teste e controles dos poços e lavar a placa por 5 vezes com PBS-I.
7. Adicionar o conjugado anti-IgG bovina/peroxidase (Sigma), diluído 1:10.000 em PBS-I e aplicar 100 µL/poço.
8. Incubar por 30 minutos a 37°C.
9. Repetir procedimento de lavagem com PBS-I, 5 vezes.
10. Dissolver a pastilha de cromógeno/substrato ortofenilenodiamina (OPD/H₂O₂), conforme instruções do fabricante, e aplicar a solução em volume de 50 µL/poço. Parar a reação após cinco minutos pela adição de H₂SO₄ 2,5 N em volume de 100 µL/poço.
11. Proceder a leitura em espectrofotômetro para microplacas em comprimento de onda de 490 nm.

Interpretação do resultado

A absorbância dos soros controle negativo deve ser usada para a determinação do ponto de corte (*cut off*). Primeiramente calcula-se a média da densidade ótica (DO) da duplicata de cada controle negativo. Depois, calcula-se a média e o desvio padrão (DP) das DOs dos controles negativos. Comumente, para o cálculo do ponto de corte soma-se a média das DOs dos controles negativos com dois ou três desvios padrão ($cut\ off = DO\ \bar{X} + 2xDP$ ou $cut\ off = DO\ \bar{X} + 3x\ DP$).

Sugere-se, no entanto, utilizar o método de determinação de *cut off* apresentado por Frey et al. (1998). Estes autores desenvolveram um cálculo de *cut off* estatisticamente definido e apresentaram uma tabela com valores multiplicadores de desvio padrão para cálculo do *cut-off* ($\bar{X} + DPf$, em que f é o fator multiplicador).

De acordo com a publicação mencionada pode-se apresentar os seguintes exemplos: se forem utilizados 10 soros controle negativo, com um intervalo de confiança de 95%, deve-se multiplicar 1,923 ao DP dos controles negativos e somar o valor encontrado à média da DO dos controles negativos ($cut\ off = DO\ \bar{X} + DPx1,923$). Se, desejando-se o mesmo intervalo de confiança, forem utilizados 12 soros controle negativo, deve-se multiplicar 1,869 ao DP dos controles negativos e somar o valor encontrado à média da DO dos controles negativos ($cut\ off = DO\ \bar{X} + DPx1,869$). Quanto maior o número de amostras e menor o intervalo de confiança desejado, menor o fator de multiplicação dos DPs que se somarão à média das DOs para o cálculo do *cut off*. A tabela completa com os valores que podem ser utilizados para este cálculo está disponível na publicação citada. Para a padronização do teste ELISA indireto com MSP-5 truncada, conforme aqui descrito, foram utilizados 12 controles negativos e estabelecido o nível de confiança como de 99%.

Após o cálculo do *cut off*, todas as amostras com DO superior a este são consideradas positivas, e as com DO inferior, negativas.

Além disso, como a absorbância das amostras é proporcional à quantidade de anticorpos no soro, um controle positivo pode ser usado para o cálculo de porcentagem de positividade, que oferece uma medida relativa (em relação ao controle positivo utilizado) da concentração de antígenos ou anticorpos na amostra [$PP = (\bar{X}\ DO\ amostra\ teste / \bar{X}\ DO\ controle\ positivo) x 100$, em que $PP =$ porcentagem de positividade].

ELISA COMPETITIVO

Princípio da técnica

Nesta técnica de ELISA existe competição entre amostras teste e reagentes conjugados com enzima e, ao contrário do ELISA indireto, quanto mais positiva a reação, menor a intensidade de cor produzida durante a revelação, sendo o resultado expresso como porcentagem de inibição em relação a um controle negativo (poços nos quais não havia o competidor, ou seja, não havia nem amostra teste nem amostra controle).

Existem na literatura diversos testes de ELISA competitivo padronizados para babesiose e anaplasmoze. O antígeno utilizado para a adsorção das placas pode ser tanto extrato (antígeno bruto), quanto proteínas recombinantes, tais como RAP1a de *B. bigemina* (Goff et al., 2008), RAP1 de *B. bovis* (Goff et al., 2006), MSA-2c de

B. bovis (DOMINGUEZ et al., 2004) ou MSP-5 de *A. marginale* (VIDOTTO et al., 1998; KNOWLES et al., 1996; TORIONI de ECHAIDE et al., 1998). Vale a pena mencionar que, para o teste competitivo faz-se necessário a obtenção de anticorpo monoclonal específico contra *B. bovis*, *B. bigemina* ou *A. marginale* conjugado com peroxidase, no entanto estes anticorpos não são disponibilizados comercialmente no Brasil.

Para fins didáticos será descrito abaixo o protocolo de ELISA competitivo para *B. bovis*, conforme Goff et al., (2003) e Goff et al., (2006).

ELISA COMPETITIVO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI *B. BOVIS*

Material e equipamentos

- Proteína recombinante rRC1 (porção C-terminal de RAP-1 *Rhoptry associated protein*);
- Placas para ELISA tipo “*medium binding*”;
- Tampão salino-fosfatado (PBS) pH 7,2 com 20 mM MgCl₂;
- Tampão salino-fosfatado pH 7,2 com 0,2% de polisorbato 20 (PBS-I);
- Tampão salino-fosfatado (PBS) pH 7,2 com 0,2% de polisorbato 20 e 20 % de leite desnatado (PBS-I leite);
- Plataforma agitadora rotativa;
- Anticorpo monoclonal BABB-75A4;
- Anti IgG de camundongo conjugada com peroxidase;
- Ortofenilenodiamina (OPD) – 5 mg/pastilha H₂SO₄ 2N;
- Espectrofotômetro de placas que permita leitura em 492 nm.

Execução da técnica

1. Diluir o antígeno [proteína recombinante rRC1 (porção C-terminal de RAP-1 *Rhoptry associated protein*) de *B. bovis*] de modo a colocar 5 ng de proteína por poço (50 ng/mL) em PBS contendo MgCl₂ 20 mM.
2. Colocar 100 µL de antígeno diluído/poço em placa de 96 poços de poliestireno com tratamento do tipo “*medium binding*”.
3. Incubar por uma noite a 4°C, em câmara úmida.
4. Descartar todo o volume dos poços e bloquear os sítios inespecíficos da placa pela adição de 200 µL/poço de solução de bloqueio (PBS-I leite).
5. Incubar por 1 hora a temperatura ambiente em plataforma rotativa.
6. Descartar a preparação de antígeno e lavar as placas com PBS-I por três vezes.
7. Colocar 100 µL de soros teste, controles positivos ou negativos em cada poço, sem diluir.
8. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida.
9. Descartar todo o volume de soros/controles que estava na placa e lavar as os poços com PBS-I por três vezes.
10. Adicionar 100 µL/poço de anticorpo monoclonal BABB-75A4 de modo a colocar 50 ng/poço (500 ng/ml).
11. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida.
12. Lavar com PBS-I por três vezes.

13. Adicionar 100 µL/poço de anticorpo anti IgG de camundongo conjugada com peroxidase diluído em PBS-1 (cada novo lote deve ser titulado para definir a concentração de uso, ou pode-se usar a concentração de uso indicada pelo fabricante).
14. Lavar três vezes em PBS-1, deixar 30 a 60 segundos descansando com este tampão de lavagem e lavar mais três vezes.
15. Adicionar 50 µL/poço de solução de revelação. A solução de revelação pode ser preparada com 0,5 mg/mL de orto fenilenodiamina (OPD) diluída em tampão citrato-fosfato, acrescido de 1 µL/mL de H₂O₂, ou, preferencialmente, pela adição de pastilhas pré-preparadas que contenham OPD, H₂O₂ e sais tamponantes em água, conforme recomendado pelo fabricante. A solução de revelação deve ser preparada no escuro (frascos âmbar ou envoltos em papel alumínio) poucos minutos antes de serem usadas, para evitar a oxidação. Caso no momento do uso uma coloração amarelada for percebida na solução esta deverá ser descartada.
16. Incubar por cerca de 10 minutos, no escuro.
17. Parar a reação com solução parada 2N H₂SO₄ (25 µL/poço) após 10 minutos.
18. Efetuar a leitura a 492nm para testes revelados com OPD ou 450 nm para testes revelados com tetrametilbenzidina (TMB).

Interpretação dos resultados

A porcentagem de inibição das amostras pode ser calculada da seguinte maneira: % inibição = $[1 - (\text{DO da amostra} - \text{DO branco}) / (\text{DO controle sem amostra} - \text{DO branco})] \times 100$. Para este teste específico, de acordo com Goff et al., 2006, o *cut off* é de 21%, ou seja, para porcentagem de inibição superior a 21% a amostra é considerada positiva, e sendo inferior a este ponto de corte é considerada negativa.

AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX

Introdução e princípio da técnica

Complexos insolúveis, visíveis a olho nu, podem ser formados pela capacidade que anticorpos específicos têm de formarem ligações cruzadas entre antígenos. Esta propriedade caracteriza o que é visto nas reações de aglutinação utilizadas como diagnóstico sorológico. Tais reações podem ser diretas (quando os anticorpos se ligam diretamente ao antígeno particulado) ou indireta, quando o teste de aglutinação emprega a adsorção de anticorpos ou antígenos solúveis na superfície de micropartículas inertes (suportes).

Um suporte muito empregado são micropartículas de poliestireno (látex), que não interferem na reação antígeno-anticorpo e são homogêneas quanto ao tamanho. É possível também utilizar métodos automatizados quantitativos como a absorção da luz (turbidimetria) ou a dispersão da luz (nefelometria), melhorando a sensibilidade do teste. Aqui está descrito um método de aglutinação indireta (com látex) para detecção de anticorpos específicos contra *A. marginale* em amostras de soro de bovinos (como descrito em Ramos et al., 2014) na qual é utilizada como antígeno uma proteína recombinante denominada MSP-5 (SILVA et al., 2006).

Material

Para preparo da suspensão de látex/rMSP-5

- Partículas de látex com 0,8 µm de diâmetro;
- Tampão salino-fosfatado (PBS) pH 7,2;
- Proteína recombinante MSP-5 (rMSP-5) solubilizada em 2% de SDS (conforme descrito por Lechtzier et al. 2002);
- Tampão salino-fosfatado (PBS) contendo 0,01% de azida sódica, 0,05 mg/mL de BSA e 5% de glicerol.

Para o teste de aglutinação

- Suspensão látex/rMSP-5;
- Cartões de aglutinação de fundo escuro;
- Soros teste e controles positivo e negativo;
- Bastão de vidro.

Execução da técnica

Preparação da suspensão de látex/rMSP-5

1. Diluir a suspensão de partículas de látex (0,8 µm de diâmetro) a 1% em PBS.
2. Centrifugar a suspensão a 3.500 x g por 45 minutos.
3. Remover o sobrenadante e ressuspende as partículas novamente a 1%, mas agora em uma preparação de proteína recombinante (rMSP-5) solubilizada em 2% de SDS e diluída para concentração de 0,5 mg/mL em PBS).
4. Incubar a mistura (látex/rMSP-5) por 24 horas em temperatura ambiente com agitação constante.
5. Após este período de incubação, as partículas de látex sensibilizadas com rMSP-5 devem ser recuperadas por centrifugação a 3.500 x g durante 45 minutos e ressuspendidas em PBS com 0,5 mg/mL de BSA (como uma solução de bloqueio de sítios livres).
6. Incubar em temperatura ambiente novamente, sob agitação constante.
7. Em seguida, lavar com PBS e centrifugar a 3.500 x g por 45 minutos.
8. Repetir o item 7 para uma segunda lavagem.
9. Diluir as partículas de látex sensibilizadas com rMSP-5 a 1% com PBS contendo 0,01% de azida sódica, 0,05 mg/mL de BSA e 5% de glicerol.
10. Manter o teste de aglutinação preparado (rMSP-5/LA1) armazenado a 4°C até o momento do uso.

Teste de aglutinação com suspensão de látex/rMSP-5 de *A. marginale*

1. Realizar os testes em cartões de aglutinação escuros, utilizando a suspensão de látex/rMSP5 e amostras de soro testes em temperatura ambiente.
2. Colocar um volume de 10 µL de soro teste e 30 µL de suspensão de látex/rMSP5 previamente homogeneizado em uma das áreas do cartão de aglutinação.
3. Misturar os dois volumes com auxílio de um bastão de vidro.

4. Agitar o cartão de aglutinação onde está sendo realizada a reação de aglutinação com dois ou três movimentos basculantes.
5. Deixar em repouso por 3 minutos e proceder à leitura.

Interpretação do teste

A partir da observação a olho nu de aglutinação ou ausência de aglutinação, as amostras são classificadas apenas como positivas (+) ou negativas (-).

Considerações

Também existem padronizados testes imunocromatográficos para diagnóstico tanto de *B. bovis* quanto de *B. bigemina* (KIM et al., 2007; 2008). Testes imunocromatográficos são métodos simples baseados na migração de líquido através de uma membrana de nitrocelulose (semelhante a um papel). A grande vantagem deste tipo de teste é ser um teste rápido, de fácil execução e que dispensa aparelhos para leitura, tendo, portanto, perspectivas para realização a campo. Porém, até o momento este teste não está disponível no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, F. R.; MELO, E. S. P.; RAMOS, C. A. N.; SOARES, C. O.; ROSINHA, G. M. S.; ELISEI, C. **ELISA com MSP5 recombinante truncada para detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* em bovinos**. Embrapa Gado de Corte: Campo Grande, 2006, 25 p. (Documentos, 163).
- BACANELLI, G. M.; RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R. Molecular diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle: quantitative evaluation of a real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) based on msp5 gene. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 29-33, 2014.
- DOMINGUEZ, M.; ZABAL, O.; WILKOWSKY, S.; ECHAIDE, J.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; ASENZO, G.; RODRÍGUEZ, A.; ZAMORANO, P.; FARBER, M.; SUAREZ, C.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. Use of a monoclonal antibody against *Babesia bovis* merozoite surface antigen-2c for the development of a competitive elisa test. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, p. 165-170, 2004.
- FREY A.; CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v. 221, n. 1-2, p. 35-41, 1998.
- GONÇALVES, P. M.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Detection of IgM antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 1, p. 11-17, 1999.
- GOFF, W. L.; MCELWAIN, T. F.; SUAREZ, C. E.; JOHNSON, W. C.; BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D. P. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a rhoptry-associated protein 1 epitope specifically identifies *Babesia bovis*-infected cattle. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 1, p. 38-43, 2003.
- GOFF, W. L.; MOLLOY, J. B.; JOHNSON, W. C.; SUAREZ, C. E.; PINO, I.; RHALEM, A.; SAHIBI, H.; CECL, L.; CARELLI, G.; ADAMS, D. S.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P.; MCELWAIN, T. F. Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Babesia bovis*. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 13, n. 11, p. 1212-1216, 2006.
- GOFF, W.L.; JOHNSON, W.C.; MOLLOY, J.B.; JORGENSEN, W.K.; WALDRON, S.J.; FIGUEROA, J.V.; MATTHEE, O.; ADAMS, D.S.; MCGUIRE, T.C.; PINO, I.; MOSQUEDA, J.; PALMER, G.H.; SUAREZ, C.E.; KNOWLES, D.P.; MCELWAIN, T.F. Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Babesia bigemina* antibodies in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 9, p. 1316-1321, 2008.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANCADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. L. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

- IICA – Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. **Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina**. 2ª edição. San José, Costa Rica: IICA, 1987. 79 p.
- KIM, C.M.; BLANCO, L.B.; ALHASSAN, A.; ISEKI, H.; YOKOYAMA, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I. Development of a rapid immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of bovine babesioses caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 78, n. 1, p. 117-121, 2008.
- KIM C, ALHASSAN A, VERDIDA RA, YOKOYAMA N, XUAN X, FUJISAKI K, KAWAZU S, IGARASHI I. Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 2, p. 137-143, 2007.
- KNOWLES D, TORIONI DE ECHAIDES, PALMER G, MCGUIRE T, STILLER D, MCELWAIN T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, 1996.
- LECHTZIER, V.; HUTORAN, M.; LEVY, T.; KOTLER, M.; BRENNER, T.; STEINITZ, M. Sodium dodecyl sulfate treated proteins as ligands in ELISA. **Journal of immunological methods**, v. 270, n. 1, p. 19-26, 2002.
- MADRUGA, C. R., KESSLER, R. H., SACCO, A. M. S., JESUS, E. F., MIGUITA, C. T. Produção de antígeno e análise preliminar do teste de imunofluorescência indireta para o diagnóstico de anticorpos contra *Anaplasma marginale*. Campo Grande: Pesquisa em andamento. No.931.p.1-4, 1986.
- MADRUGA, C. R., ARAÚJO, F. R., SOARES, C. O. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360p.
- MATOS, M. S.; MATOS, P. F. **Laboratório clínico médico-veterinário**. 2ª. Ed. Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Atheneu, 1988. 238 p. (Série medicina veterinária).
- RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R.; SOUZA, I. I. F.; BACANELLI, G.; HERA, L. L.; RUSSI, L. S.; OLIVEIRA, R. H. M.; SOARES, C. O.; ROSINHA, G. M. S.; ALVES, L. C. Real-time polymerase chain reaction based on *msa2c* gene for detection of *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 1, p. 79-83, 2011.
- RAMOS, C. A.; ARAÚJO, F. R.; SANTOS, R. C.; MELO, E. S.; SOUSA L. C.; VIDAL, C. E.; GUERRA, N. R.; RAMOS, R. A. Development and assessment of a latex agglutination test based on recombinant MSP5 to detect antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 199-204, 2014.
- RUIZ, P. M. G.; PASSOS, L. M. F. P.; MACHADO, R. Z.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for detection of IgM antibodies to *Babesia bigemina* in cattle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 2, p. 237-240, 2001.
- SACCO, A. M. S. Babesiose bovina: avaliação de diferentes imunógenos no processo de imunização de bovinos e da resposta humoral produzida, através da RIFI e ELISA. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais, ICB, 236 p. (Registro: 053:96), 1996.
- SILVA, V. M. G.; ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R. M.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H.; ALMEIDA, M. A. O.; FRAGOSO, S. P.; SANTOS, L. R.; RAMOS, C. A. N.; BACANELLI, G.; TORRES JÚNIOR, R. A. A. Comparison between indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Anaplasma marginale* antibodies with recombinant major surface protein 5 and initial body antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 511-516, 2006.
- TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D.P.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; SUAREZ, C.E.; MCELWAIN, T.F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 777-782, 1998.
- TRUEBLOOD, E. S.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Detection of *Anaplasma marginale* rickettsemia prior to onset of clinical signs by using an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.7, p.1542-1544, 1991.
- VIDOTTO, M.C.; VIDOTTO, O.; ANDRADE, G.M.; PALMER, G.; MCELWAIN, T.; KNOWLES, D.P. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in Parana state, Brazil, by MSP-5 competitive ELISA. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 849, p. 424-426, 1998.