

Desenvolvimento de uma prova de imunoadsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*¹

Cláudio R. Madruga², Flávio R. Araújo³, Ana Paula C. Marques⁴, Cristiano M.E. Carvalho⁴, Flávia Q. Cusinato³, Adalberto J. Crocci⁵, Raul H. Kessler² e Midori Miguita²

ABSTRACT. Madruga C.R., Araújo F.R., Marques A.P.C., Carvalho C.M.E., Cusinato F.Q., Crocci A.J., Kessler R.H. & Miguita M. 2000. [Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Babesia bovis*.] Desenvolvimento de uma prova de imunoadsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 20(4):167-170. Embrapa Gado de Corte, BR 262 Km 4, Campo Grande, MS 79002-970, Brazil.

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to *Babesia bovis* was developed and evaluated in comparison with the indirect fluorescent antibody test (IFAT). The ELISA sensitivity and specificity, estimated with 100 positive sera from cattle experimentally infected with *B. bovis* and 108 negative sera collected from *B. bovis*-free herds, were 98.0% and 98.1%, respectively. Positive and negative predictive values were, respectively, 98.0% and 98.1%, and precision was 98.1%. No cross-reactions were detected with 80 sera from calves experimentally inoculated with *Babesia bigemina*. The ELISA was compared with IFAT using 110 cattle sera from an enzootically stable area and with 168 cattle sera from an enzootically unstable area. In both cases, there was a significant agreement between results of both tests ($P=0.631$ and 0.4725 , respectively). In an epidemiological study performed with ELISA in the Pantanal region of the State of Mato Grosso do Sul with 1,365 cattle sera, 83.9% were positive for antibodies against *B. bovis*, characterizing this region as enzootically stable.

INDEX TERMS: *Babesia bovis*, ELISA, indirect fluorescent antibody test, cattle, epidemiological survey, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil.

RESUMO. Uma prova de imunoadsorção enzimática (ELISA) para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis* foi desenvolvida e avaliada em comparação à imunofluorescência indireta (IFI). A sensibilidade e especificidade do ELISA, determinadas pela análise de 100 soros positivos de bovinos infectados experimentalmente com *B. bovis* e 108 soros negativos colhidos de bovinos livres de infecção por este hemoparasito, foram de 98,0% e 98,1%, respectivamente. Os valores preditivos positivo e negativo foram, respectivamente,

98,0% e 98,1% e a precisão do teste foi de 98,1%. Não foram detectadas reações cruzadas com 80 soros de bezerros experimentalmente inoculados com *Babesia bigemina*. O ELISA foi comparado à IFI usando 110 soros de rebanhos de área de estabilidade endêmica e 168 soros de rebanhos de áreas de instabilidade endêmica. Em ambos os casos, houve concordância significativa ($P=0,631$ e $0,4725$, respectivamente) entre os resultados demonstrados pelos dois testes. Em um estudo epidemiológico realizado com o ELISA na região do Pantanal de Mato Grosso do Sul, com 1.365 soros de bovinos, 83,9% foram positivos para anticorpos contra *B. bovis*, caracterizando a região estudada como endemicamente estável.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Babesia bovis*, ELISA, imunofluorescência indireta, bovino, levantamento sorológico, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil.

INTRODUÇÃO

A babesiose bovina na América Latina é causada por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* cujo único vetor biológico é o carra-

¹Aceito para publicação em 16 de outubro de 2000.

²Embrapa Gado de Corte, BR 262 Km 4, Campo Grande, MS 79002-970; e-mail: madruga@cnpqc.embrapa.br

³Centro de Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP), Campo Grande, MS.

⁴Bolsistas de Iniciação Científica do CNPq.

⁵Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu, Botucatu, SP.

pato *Boophilus microplus*. Essa doença constitui um dos principais fatores limitantes à bovinocultura em áreas tropicais e subtropicais do mundo (Araújo et al. 1998), devido à diminuição da produção de carne e leite, além dos custos indiretos com o tratamento dos animais e com medidas profiláticas.

Os estudos de prevalência destes hemoparasitos são importantes para a determinação da situação epidemiológica em uma região, indicando uma situação de instabilidade ou de estabilidade endêmica e, conseqüentemente, se há ou não a necessidade de adoção de medidas preventivas.

Os testes sorológicos são ferramentas importantes na realização destes estudos epidemiológicos, uma vez que os anticorpos gerados na resposta imune à *Babesia* spp podem ser detectados no soro de bovinos por longos períodos (Böse et al. 1990)

Entre estas provas sorológicas, a imunofluorescência indireta (IFI) e os testes de imunoabsorção enzimática (ELISA) são, provavelmente, as mais utilizadas, devido à elevada sensibilidade na detecção de anticorpos contra *Babesia* spp (Araújo et al. 1998). O ELISA apresenta a vantagem da automação na leitura, permitindo a análise de um maior número de soros.

Este trabalho descreve o desenvolvimento e padronização de um ELISA, para detecção de anticorpos contra *B. bovis*, que utiliza menor tempo na realização da prova e sua aplicação em um levantamento epidemiológico no Pantanal de Mato Grosso do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Na produção do antígeno para o ELISA, foram utilizados três bezerros esplenectomizados da raça Nelore, livres de carrapatos. O primeiro animal foi inoculado, por via subcutânea, com estabilizado criopreservado contendo 10^8 eritrócitos parasitados por *B. bovis* (Kessler et al. 1998). Logo após o início da parasitemia, 200 mL de sangue deste animal foram inoculados, via endovenosa, no segundo bezerro. Seis dias após a inoculação, 200 mL de sangue do segundo bezerro foram inoculados no terceiro animal. O sangue para produção de antígeno foi colhido no quarto dia pós-inoculação, quando a parasitemia atingiu 24,0% e o animal ainda não apresentava anticorpos contra *B. bovis* na IFI.

O sangue do último bezerro foi mantido a -70°C por 24 horas em alíquotas de 100 mL. Após o descongelamento em temperatura ambiente, foi lavado por centrifugação três vezes, por 15 minutos, a $12.000 \times g$, com salina fosfatada tamponada (PBS) (KH_2PO_4 83,3 mM, Na_2HPO_4 66 mM, NaCl 14,5 mM) pH 7,0. O sedimento foi solubilizado por 30 minutos em tampão de lise (tris 100 mM, EDTA 10 mM, tergitol NP-40 2,0%, *N*-a-p-tosil-L-lisil clorometil cetona 0,2 mM, fenilmetil sulfonil fluoreto 2,0 mM). Na seqüência, o material foi submetido à sonicação, a 35 W, durante 10 minutos, com intervalos de um minuto, para evitar aquecimento. A seguir, o antígeno foi submetido cinco vezes ao congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C , sendo então centrifugado a $23.700 \times g$ durante 60 minutos e o sobrenadante armazenado a -70°C , em alíquotas de 200 mL. A concentração protéica do antígeno, determinada pelo método do reagente de Folin (Lowry et al. 1951), foi de 10,74 mg/mL.

Para execução do ELISA, placas de microtitulação de 96 poços (Costar 3590) foram sensibilizadas com antígeno diluído a 1:500 em

tampão carbonato/bicarbonato (Na_2CO_3 200 mM, NaHCO_3 199 mM), pH 9,2 (100 mL/poço), por pelo menos 12 horas, a 4°C . Quando não utilizadas de imediato, as placas foram congeladas a -70°C . Em seguida, foram feitas cinco lavagens com PBS tween 20 a 0,1% (PBST) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6,4 mM, NaCl 99 mM), pH 7,2, sendo adicionados os soros controle e teste, diluídos a 1:1.000 em PBST, em um volume de 100 mL por poço. As placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 45 minutos, sendo realizadas então cinco lavagens, conforme descrito anteriormente. Em seguida, foram adicionados 50 ml/poço de imunoglobulina de coelho anti-IgG bovina, conjugada com fosfatase alcalina (Sigma A-0705), diluída a 1:12.000 em PBST, sendo as placas novamente incubadas em câmara úmida, por 30 minutos, e depois lavadas 10 vezes com PBST. O substrato p-nitrofenil fosfato (1,0 mg/mL em tampão do substrato: dietanolamina 0,1 M, MgCl_2 0,1 mM, NaCl 0,1 mM) foi adicionado em um volume de 50 mL/poço, sendo a reação parada após 20 minutos com NaOH 0,2 M (100 mL/poço). A leitura dos resultados foi realizada em um espectrofotômetro para microplacas, com filtro de 405 nm. As diluições e tempos de reação citados foram determinados por uma série de experimentos, nos quais obteve-se uma maior diferença nas densidades ópticas (DOs) entre os soros-controle positivos e negativos.

O *cut-off* da prova foi determinado usando a média das DOs de 108 soros de animais livres de infecção por *B. bovis*, mais dois desvios padrões.

A validação do teste (determinação da sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e precisão) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Coggon et al. (1983).

Para determinação da sensibilidade do ELISA, foram analisados 100 soros de bovinos experimentalmente infectados ou vacinados com vacina viva atenuada de *B. bovis*. Para determinação da especificidade, foram analisados 108 soros de animais livres de infecção por *B. bovis*, mantidos na área de isolamento do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Corte), e de animais importados de regiões livres de carrapato, sorologicamente negativos para o referido hemoparasito na IFI.

Para a avaliação de reações cruzadas com *B. bigemina*, foram utilizados 80 soros de cinco bezerros (16 soros de cada animal) inoculados experimentalmente com 10^{10} eritrócitos parasitados por este hemoparasito. As coletas foram feitas com intervalo de 15 dias.

O desempenho do ELISA foi comparado ao da IFI, utilizando-se 110 soros provenientes do estado do Rio de Janeiro (área de estabilidade endêmica) e 168 soros da região Sul e Nordeste (áreas de instabilidade endêmica). Esta última prova foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Madruga et al. (1986). A concordância entre os testes sorológicos foi determinada pelo teste de McNemar (Zar 1996).

Um estudo para determinação da prevalência de bovinos soropositivos para *B. bovis* foi realizado com 1.365 amostras de soros de bovinos adultos, de ambos os sexos, predominantemente da raça Nelore, procedentes de quatro municípios do Pantanal de Mato Grosso do Sul. Esta região possui uma área de 140.000 km^2 (Catto 1993) e aproximadamente 3.996.000 cabeças de gado bovino (Silva et al. 1998), correspondendo a 17,96% do efetivo do estado, que é de 22.244.427 cabeças (Min. Agricultura 1998). A região explora, essencialmente, a criação de bovinos de corte, com rebanhos criados extensivamente, constituindo sua principal fonte de renda.

O tamanho da amostra foi determinado através da fórmula do Centro Pan-Americano de Zoonoses (1979), para o estudo de enfermidades infecciosas crônicas, em que:

$$n = p \cdot (100-p) Z^2 / (d \cdot p/100)^2$$

sendo: n=número de amostras; p=prevalência esperada; Z=grau de confiança e d=margem de erro.

Baseado em uma prevalência estimada de bovinos sorologicamente positivos para este hemoparasito de 85,0%, determinada em um estudo piloto com 50 soros por município, com grau de confiança de 95,0% e uma margem de erro de 10,0%, foi estabelecida uma amostra de 71 soros por município. Como havia disponibilidade de um número maior de soros por município, foram analisados 348 soros provenientes de Aquidauana, 618 de Corumbá, 93 de Porto Murtinho e 306 de Rio Verde.

A comparação entre as prevalências de bovinos com sorologia positiva para *B. bovis* entre os quatro municípios foi feita pelo teste de Goodman (Goodman 1965).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média das densidades ópticas dos 108 soros de animais livres de infecção por *B. bovis* foi de 0,041, com desvio-padrão de 0,024, correspondendo a um *cut-off* de 0,089.

Os dados sobre a validação do ELISA estão expostos no Quadro 1. Das 100 amostras de soro de bovinos infectados por *B. bovis* analisadas no ELISA, duas apresentaram reações falso-negativas, correspondendo a uma sensibilidade de 98,0%. Das 108 amostras de soro de bovinos livres de infecção por *B. bovis* testadas no ELISA, duas apresentaram reações falso-positivas, o que corresponde a uma especificidade de 98,1%. Os valores preditivos positivo e negativos foram, respectivamente, 98,0% e 98,1%, enquanto a precisão da prova foi de 98,1%.

Dos 80 soros analisados, provenientes de cinco animais inoculados experimentalmente com *B. bigemina*, nenhum apresentou reação positiva frente ao antígeno de *B. bovis*.

Os dados sobre a comparação do desempenho dos testes

Quadro 1. Resultados do ELISA com soros de bovinos experimentalmente inoculados com *Babesia bovis* ou livres de infecção por este hemoparasito e validação do teste^a

Resultados do ELISA	Infecção dos bovinos por <i>B. bovis</i>		Total
	Positiva	Negativa	
Positivo	98 (a)	2 (b)	100 (a+b)
Negativo	2 (c)	106 (d)	108 (c+d)
Total	100 (a+c)	108 (b+d)	208 (a+b+c+d)

^a Sensibilidade: (a) / (a+c) x 100 = 98/100 x 100 = 98,0%.

Especificidade: (d) / (b+d) x 100 = 106/108 x 100 = 98,1%.

Valor preditivo positivo: (a) / (a+b) x 100 = 98/100 x 100 = 98,0%.

Valor preditivo negativo: (d) / (c+d) x 100 = 106/108 x 100 = 98,1%.

Precisão (a+d) / (a+b+c+d) x 100 = 204/208 x 100 = 98,1%.

Quadro 2. Comparação entre o ELISA e a IFI na detecção de anticorpos contra *Babesia bovis* em 110 soros de bovinos de áreas de estabilidade endêmica do estado do Rio de Janeiro

Técnica	ELISA+	ELISA -	Total
IFI +	79	3	82
IFI -	3	25	28
Total	82	28	110

Quadro 3. Comparação entre o ELISA e a IFI na detecção de anticorpos contra *Babesia bovis* em 168 soros de bovinos de áreas de instabilidade endêmica dos estados da Bahia, Paraná e Rio Grande do Sul

Técnica	ELISA +	ELISA -	Total
IFI +	65	13	78
IFI -	18	72	90
Total	83	85	168

Quadro 4. Prevalência de bovinos soro-reagentes para *Babesia bovis*, através do ELISA indireto, em cinco municípios do Pantanal de Mato Grosso do Sul

Municípios	Nº de soros analisados	Nº de soros positivos (%)
Aquidauana	348	275 (79,0)c*
Corumbá	618	558 (90,3)b
Porto Murtinho	93	90 (96,8)a
Rio Verde	306	222 (72,5)c
Total	1.365	1.145 (83,9)

* Proporções seguidas de letras iguais não diferem significativamente (P>0,05) (Goodman 1965).

de ELISA e IFI na detecção de anticorpos contra *B. bovis* em soros de bovinos provenientes de regiões de estabilidade e instabilidade endêmica estão ilustrados nos Quadros 2 e 3, respectivamente.

Em relação à análise dos soros de bovinos provenientes de região de estabilidade endêmica, foi constatada concordância entre os resultados do ELISA e da IFI pelo teste de McNemar (X=0,17 e P=0,631). Também foi constatada concordância entre os dois testes sorológicos em relação aos soros de bovinos das áreas de região de instabilidade endêmica (X=0,52 e P=0,4725).

Das 1.365 amostras de soros bovinos procedentes de quatro municípios do Pantanal de Mato Grosso do Sul analisadas, 1.145 apresentaram anticorpos específicos para *B. bovis*, resultando em uma prevalência de 83,9% (Quadro 4).

Todos os municípios apresentaram altas taxas de bovinos soro-reagentes para *B. bovis*, podendo ser classificadas como de estabilidade endêmica para este hemoparasito, à semelhança do que ocorre na região de Cerrado deste estado (Madruga et al. 1987).

As taxas de soroprevalência observadas nos municípios estudados foram semelhantes aos reportados por Salcedo et al. (1987) na Zona da Mata de Minas Gerais (82,5%), Araújo et al. (1997) na Bahia (97,2%) e por Soares et al. (2000) na mesorregião Norte do Rio de Janeiro (90,9%), onde foram encontradas situações de estabilidade endêmica para *B. bovis*. Porém, foram superiores às encontradas por Alves (1987) em Garanhuns, Pernambuco (27,9%); Madruga et al. (1993) no Boqueirão (56,9%) e Cariri (35,8%), na Paraíba; e Menk et al. (1999) em Juazeiro (56,4%) e Uauá (63,7%), no semi-árido da Bahia, onde foram caracterizadas situações de instabilidade endêmica para *B. bovis*.

Os municípios de Aquidauana, Corumbá, Porto Murtinho e Rio Verde, possivelmente, apresentam condições favoráveis ao desenvolvimento do carrapato *B. microplus* durante a maior parte do ano, possibilitando a infecção dos bovinos desde os primeiros meses de vida, razão pela qual não são necessárias medidas de imunização contra este hemoparasito.

O ELISA desenvolvido para a detecção de anticorpos contra *B. bovis*, apresentou alta sensibilidade e especificidade, semelhantes às obtidas em outros ELISAs com antígeno bruto, a partir de hemácias parasitadas (Gonçalves & Passos 1995) ou com antígeno de subunidade recombinante (Waltisbuhl et al. 1987). A sensibilidade deste ELISA também foi similar ao da imunofluorescência indireta (Madruga et al. 1986), que até o presente, tem sido o teste sorológico de referência para o diagnóstico de anticorpos contra *B. bovis*.

Outro fator que evidencia a alta sensibilidade e especificidade deste ELISA é o elevado grau de concordância com a IFI, com os soros da área de estabilidade endêmica e das áreas de instabilidade endêmica.

Apesar dos desempenhos semelhantes do ELISA e IFI, o primeiro teste apresenta a vantagem de possuir a leitura automatizada, o que permite analisar um número maior de soros. Ademais, esse teste é executado em um período de tempo menor que os outros desenvolvidos até o presente (Waltisbuhl et al. 1987, Böse et al. 1990, Machado et al. 1997).

REFERÊNCIAS

- Alves L.C. 1987. Prevalência da babesiose em gado leiteiro no município de Garanhuns, estado de Pernambuco. Tese de Mestrado, FMVZ-USP, São Paulo. 124p.
- Araújo F.R., Madruga C.R., Almeida M.A.O., Leal C.R.B. & Miguita M. 1997. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de aglutinação rápida. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 6:111-115.
- Araújo F.R., Madruga C.R., Leal C.R.B., Schenk M.A.M., Kessler R.H., Marques A.P.C. & Lemaire D.C. 1998. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.* 74:101-108.
- Böse R., Jacobson R.H., Gale K.R., Waltisbuhl D.J. & Wright I.G. 1990. An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinant *B. bovis* antigen. *Parasitol. Res.* 76:648-652.
- Catto J.B. 1993. Endoparasitos de animais domésticos do Pantanal. VI Congresso Internacional de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa, Salvador, Bahia, p.148-154. (Resumo)
- Centro Pan-Americano de Zoonoses 1979. Procedimientos para Estudios de Prevalencia por Muestreo. Ramos Mejia, Buenos Aires. 35 p. (Nota Técnica 18, Rev. 1)
- Coggon T., Rose G. & Barker D.J. 1983. Measurement, error and bias, p. 20-25. In: Coggon T., Rose G. & Barker D.J. (ed.) *Epidemiology for the Uninitiated*. BMJ Publishing Group, London.
- Gonçalves P.M. & Passos L.M.F. 1995. Utilização do teste de ELISA (sistema biotina-avidina) para detecção de anticorpos anti-*Babesia bovis*. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 4 (supl.1): 216.
- Goodman L.A. 1965. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics* 7:247-254.
- Kessler R.H., Schenk M.A.M., Madruga C.R. & Gomes A. 1998. Viability of a method for the isolation of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* to create a strain bank from five physiographical regions of Brazil. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 7:91-94.
- Lowry O.H., Rosenbush B.N.J., Farr A.L. & Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Machado R.Z., Montassier H.J., Pinto A.A., Lemos E.G., Machado M.R., Valadão I.F., Barci L.G. & Malheiros E.B. 1997. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Vet. Parasitol.* 71:17-26.
- Madruga C.R., Kessler R.H., Jesus, E.F. & Sete A.J. 1986. Imunofluorescência indireta para diagnóstico sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*: produção de antígeno com cepas isoladas no estado de Mato Grosso do Sul e avaliação preliminar do teste. *Pesquisa em Andamento* 32, Embrapa-CNPDC, Campo Grande, MS. 6p.
- Madruga C.R., Honer M.R., Schenk M.A.M. & Curvo J.B.E. 1987. Avaliação preliminar dos parâmetros epidemiológicos da tristeza parasitária bovina em Mato Grosso do Sul. *Pesquisa em Andamento* 38, Embrapa-CNPDC, Campo Grande, MS. 7p.
- Madruga C.R., Honer M.R., Andreotti R., Araújo F.R. & Santarém V. 1993. Simulação e sorologia no mapeamento da instabilidade endêmica das babesioses: um estudo nas regiões do Boqueirão e Cariri, estado da Paraíba. VIII Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Londrina, Paraná. (Resumo P1)
- Menk J.C., Almeida M.A.O., Madruga C.R. & Araújo F.R. 1999. Levantamento sorológico da *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, no semi-árido baiano, pela técnica de imunoadsorção enzimática (ELISA). XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Salvador, Bahia, p.205. (Resumo)
- Min. Agricultura 1998. Caracterização da agropecuária no estado de Mato Grosso do Sul. Secretaria de Desenvolvimento Rural, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasília. 89p.
- Salcedo J.H.P., Ribeiro M.F.B., Santos J.L. & Faria J.E. 1987. Epidemiologia das babesioses no estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos fluorescentes na "Zona da Mata", MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 39:423-429.
- Silva R.A., Eiguez A., Morales G., Eulert E., Montenegro A., Ybanez R., Seidl A., Martin A., Davila R. & Ramirez L. 1998. Bovine trypanosomiasis in bolivian and brazilian lowlands. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93:29-32.
- Soares, C.O., Souza, J.C.P., Madruga, C.R., Madureira, R.C., Massard, C.L. & Fonseca, A.H. 2000. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. *Pesq. Vet. Bras.* 20: 75-79, 2000.
- Waltisbuhl D.J., Goodger B.V., Wright I.G., Commins M.A. & Mahoney D.F. 1987. An enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitol. Res.* 73:126-131.
- Zar J.H. 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey. 718p.