

ISOLAMENTO DE CEPAS PURAS DE *BABESIA BOVIS*, *BABESIA BIGEMINA* E *ANAPLASMA MARGINALE* EM ÁREA ENZOÓTICA¹

RAUL HENRIQUE KESSLER², CLÁUDIO ROBERTO MADRUGA³,
ELANE FABRÍCIO DE JESUS⁴ e DOMINGOS VIEIRA SEMPREBOM⁵

RESUMO - Foram isoladas cepas puras de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* infestando-se bezerros esplenectomizados com larvas e ninfas, respectivamente, do carrapato *Boophilus microplus*. O *Anaplasma marginale* foi isolado por inoculação de sangue de um bovino portador em bezerro esplenectomizado, seguido de medicação específica com babesicida. As larvas transmitiram somente *B. bovis* quando foram removidas do animal no quinto dia da infestação. Entretanto, quando a remoção foi feita, no sexto dia, houve transmissão de *B. bigemina*. As ninfas e os adultos transmitiram somente *B. bigemina*. Não ocorreu transmissão de *Anaplasma* pelas larvas, ninfas ou adultos.

Termos para indexação: *Boophilus microplus*, transmissão, bezerro.

ISOLATION OF PURE STRAINS OF *BABESIA BOVIS*, *BABESIA BIGEMINA* AND *ANAPLASMA MARGINALE* IN AN ENZOOTIC AREA

ABSTRACT - Pure strains of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* were isolated by placing larvae and nymphs respectively of the tick *Boophilus microplus*, on splenectomized calves. *Anaplasma marginale* was isolated by the inoculation of blood from a bovine carrier into a splenectomized calf, followed by medication with a babesicide. Larvae transmitted *B. bovis* only when removed from the calf on the fifth day of infestation. However, *B. bigemina* was transmitted when ticks were removed on the sixth day. Nymphs and adults transmitted only *B. bigemina*. No transmission of *Anaplasma* by larvae, nymphs or adults occurred.

Index terms: *Boophilus microplus*, transmission, calf.

INTRODUÇÃO

O Estado do Mato Grosso do Sul, onde este trabalho foi desenvolvido, está situado entre os paralelos 17 e 24°S e os meridianos 51 e 58°W. O território apresenta duas características distintas quanto ao relevo: o Planalto da Serra de Maracaju, com altitudes entre 300 a 800 m e o Pantanal, com altitudes entre 83 a 165 m. O clima é predominantemente tropical, com verão chuvoso e inverno seco. A variação de temperatura média anual é de 20 a 25°C. A precipitação média anual varia de 1.200 a 1.400 mm, sendo que cerca de 80% ocorre no período de outubro a abril. A umidade relativa do ar situa-se entre 70% a 76% (Empresa Brasileira de Assistência Técnica e Extensão Rural 1977). A explo-

ração agropecuária é o setor mais forte da economia do Estado. O efetivo bovino conta com cerca de treze milhões de cabeças (Anuário... 1984).

A babesiose e a anaplasmosose dos bovinos são hemoparasitoses enzoóticas na região, sendo transmitidas pelo carrapato *Boophilus microplus* (Madruga et al. 1985a). As condições climáticas permitem o desenvolvimento de, pelo menos, quatro gerações do *B. microplus* e a infestação dos bovinos durante todo o ano, com maior incidência nos meses de agosto, setembro e outubro (Schenk et al. 1983) coincidindo com o período de maior concentração de nascimento de bezerros. Esta situação caracteriza a região como de estabilidade enzoótica, porém com uma população de alto risco representada por bezerros de até quatro meses de idade (Madruga et al. 1984, Madruga et al. 1985b). A maior parte do território nacional onde se criam bovinos apresenta situação enzoótica similar e o único método de profilaxia disponível no Brasil é a "premunição" (Freire 1979) que consiste basicamente na inoculação de sangue de um bovino adulto portador, seguido de observação e tratamento dos casos graves. As limitações deste método, hoje,

¹ Aceito para publicação em 12 de março de 1987.

² Méd.-Vet., Ph.D., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPq), Caixa Postal 154, CEP 79100 Campo Grande, MS.

³ Méd.-Vet., M.Sc., EMBRAPA-CNPq.

⁴ Méd.-Vet., Bolsista do PIEP-CNPq/EMBRAPA-CNPq.

⁵ Téc. Agríc., EMPAER, Caixa Postal 472, CEP 79100 Campo Grande, MS.

são óbvias, porém, por falta de uma tecnologia mais eficiente, é o método adotado pelos veterinários que atuam nas áreas mais problemáticas. O diagnóstico específico e definitivo é baseado no achado do parasito em lâminas de sangue coradas pelos métodos usuais e limita-se, portanto, aos casos clínicos. O diagnóstico sorológico capaz de determinar a situação epidemiológica da população em risco é pouco utilizado e depende, em geral, de antígenos e reagentes importados. Os estudos biológicos e imunológicos, os levantamentos epidemiológicos e o desenvolvimento de métodos mais modernos de profilaxia estão na dependência do isolamento de cepas puras dos organismos envolvidos.

Callow & Hoyte (1961a) isolaram *B. bigemina* de *B. bovis* e *Theileria mutans* por passagem rápida em bezerros esplenectomizados. Os mesmos autores (Callow & Hoyte 1961b) verificaram que a *B. bigemina* era transmitida somente pela ninfa e pelo adulto do *B. microplus*. Mahoney & Mirre (1979) concluíram que a *B. bovis* era transmitida somente pela larva do carrapato. Kessler & Bellato (1981) isolaram cepas puras de *B. bovis* e *B. bigemina* no Estado do Rio Grande do Sul, utilizando estas características de transmissão pelo carrapato *B. microplus*. Guglielmonne et al. (1981) isolaram *B. bigemina* infestando um bezerro com formas adultas do *B. microplus*. Dalgliesh & Stewart (1983) isolaram *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* utilizando a transmissão por larvas, ninfas e adultos não ingurgitados do *B. microplus*, respectivamente. No presente trabalho é descrito o método utilizado para o isolamento de cepas de campo de *B. bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica do Estado de Mato Grosso do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de bezerros suscetíveis

Os bezerros foram obtidos de vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) mantidas em uma área de campo, isolada das demais áreas de criação por cerca dupla de seis fios de arame liso. As áreas estavam distanciadas quatro metros

uma da outra. As vacas receberam, inicialmente, dois banhos com carrapaticidas⁶, à base de Amitraz, com intervalo de uma semana, sendo a reinfestação por carrapatos controlada por banhos a cada quatorze dias. Os bezerros foram criados nesta área até dois ou três meses de idade, quando foram removidos para um prédio de alvenaria e colocados em baias individuais. A ausência de infestação por carrapatos foi comprovada pelo exame externo dos animais, sendo estes pulverizados com um carrapaticida piretróide⁷ à base de Cialotrina, para eliminar uma possível infestação por larvas durante o percurso do campo até as baias. A ausência de infecção por *Babesia* spp. ou *A. marginale* foi verificada por exames de lâminas de sangue coradas por May-Grünwald-Giemsa, antes e após a esplenectomia, e pelos testes sorológicos de imunofluorescência indireta (IFI) para *B. bovis* e *B. bigemina* e aglutinação em cartão⁸ (AC) para *A. marginale*. Os bezerros foram esplenectomizados dez a quinze dias antes de serem utilizados experimentalmente.

Obtenção de carrapatos infectados

Foram colhidas teleóginas caídas de dois bezerros da raça Ibagé (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*) de quatro a cinco meses de idade, infestados naturalmente no campo e colocados em uma baia, sobre um estrado de madeira.

As teleóginas foram colocadas em placas de Petri e incubadas a 28°C ± 1, com umidade relativa de 70% a 90%. Os ovos postos do sexto ao décimo primeiro dia da postura foram misturados e distribuídos em seringas descartáveis adaptadas conforme descrito por Thompson et al. (1978) em quantidades de 0,5 g, correspondente a aproximadamente 10.000 ovos, retornando para incubação nas mesmas condições de temperatura e umidade.

Isolamento das cepas de *B. bovis* e *B. bigemina*

Foram utilizados cinco bezerros (n^{os} 4.992, 5.118, 4.974, 5.092 e 5.044) esplenectomizados. Dois deles (bezerros n^{os} 4.992 e 5.118) foram preparados, inicialmente, colocando-se cápsulas de tecido de musselina de náilon, coladas à pele do animal com cola de sapateiro⁹ conforme descrito por Evans (1978). No bezerro n^o 4.992 foram colocadas 20.000 larvas de dez dias de eclosão, distribuídas em duas cápsulas, de modo a manter uma infestação localizada. No sexto dia, após a infestação, as cápsulas do bezerro 4.992 foram abertas e as metalarvas removidas e transferidas para uma cápsula colada sobre o dorso do bezerro 5.118, onde permaneceram até o final do ciclo parasitário. Como foi observada a presença de ninfas no bezerro 4.992, já no sexto dia, o trabalho foi repetido infestando-se um terceiro bezerro, (n^o 4.974) com aproximadamente 10.000 larvas de nove dias, removendo-se as metalarvas no quinto dia da infestação. Após a remoção das metalarvas, os bezerros foram pulverizados com carrapaticida.

Os bezerros foram examinados diariamente, anotando-se a temperatura, o hematócrito e a parasitemia. A

⁶ Triatox.

⁷ Grenade.

⁸ Anaplasmosis Card Test.

⁹ Covulfix.

presença, a morfologia e a percentagem de parasitemia foram determinadas examinando-se lâminas delgadas de sangue coradas por May-Grünwald-Giemsa.

Quando a infecção tornou-se patente, foi feita a transfusão de sangue para outro bezerro esplenectomizado. Amostras de sangue parasitado, adicionadas de 8% de polivinil-pirrolidona¹⁰ e 12% de glicerol¹¹, foram distribuídas em volumes de 1,4 ml em tubos de plástico com tampa de pressão¹² e congeladas em nitrogênio líquido, para serem utilizadas no futuro, na produção de antígenos para testes sorológicos e produção de imunógenos.

Isolamento de *A. marginale*

Foram utilizados dois bezerros (n^os 5.048 e 5.092) esplenectomizados, comprovadamente livres de infecção anterior. O bezerro 5.048 recebeu 100 ml de sangue citratado, colhido de um bezerro de campo que apresentava infecção patente por *A. marginale* (parasitemia = 0,7%) e por *B. bigemina* (parasitemia = 0,07%) sendo imediatamente medicado com babesicida¹³ à base de diaceturato de 4,4 diazoaminodibenzamidina na dose de 3,5 mg/kg de peso vivo.

Os demais procedimentos foram idênticos aos descritos anteriormente.

RESULTADOS

Durante um período de 54 meses, foram criados 48 bezerros na área de pastagem isolada. Deste total, dois apresentaram parasitismo por carrapatos nas fases ninfa e adulto inicial e o soro de um terceiro bezerro foi positivo no teste do IFI para *B. bigemina*. Os bezerros parasitados haviam passado, inadvertidamente, para fora da área isolada. No terceiro bezerro não foi constatado parasitismo por carrapato.

Os animais utilizados no isolamento das cepas *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* não apresentaram infestações por carrapatos ao entrarem para as baias e assim permaneceram livres de infestação até o final do experimento, exceto quando infestados experimentalmente. Os exames diretos e as provas sorológicas foram negativas, comprovando que os animais estavam livres de infecção anterior por *Babesia* e *Anaplasma*. Não foram encontrados outros hemoparasitos nos exames de lâminas de sangue periférico.

Foi constatada a presença de ninfas no bezerro 4.992, no sexto dia após a infestação experimental. No oitavo dia, este bezerro apresentou infecção mista por *B. bovis* e *B. bigemina* com parasitemia inferior a 0,01% para ambas as espécies. No décimo dia, a parasitemia por *B. bigemina* era de 0,15%, e por *B. bovis*, 0,05%, quando o animal foi medicado com babesicida¹⁴ à base de dipropionato de imidocarb na dose de 0,5 mg/kg de peso vivo, e excluído do experimento.

O bezerro 5.118 apresentou uma infecção pura por *B. bigemina*. O parasito foi encontrado em lâminas de sangue periférico a partir do décimo primeiro dia após a infestação com metalarvas. A infecção permaneceu patente por um período de oito meses. O pique máximo de 19,5% de parasitemia ocorreu no décimo quarto dia após a infestação quando a temperatura também atingiu seu nível máximo de 40,3°C. O hematócrito mínimo foi de 8% (84% inferior ao normal) no décimo sexto dia, quando a parasitemia já havia decrescido para 1,4%. O animal recuperou suas condições normais sem auxílio de medicação. O bezerro 5.092, inoculado por via endovenosa com 40 ml de sangue deste animal no décimo terceiro dia quando a parasitemia era de 3,8%, apresentou parasitemia inferior a 0,01% no segundo dia pós a inoculação. A parasitemia máxima de 2,8% e a temperatura máxima de 40,4°C ocorreram no quinto dia, desaparecendo no nono dia, permanecendo a parasitemia negativa por mais dez dias. Quando examinado, 60 dias após, tornou a apresentar parasitemia que variou de 0,01% a 0,29%. O hematócrito mínimo foi de 20% (40% inferior ao normal) no sétimo dia após a inoculação. Este bezerro foi posteriormente medicado com babesicida e reutilizado no isolamento de *A. marginale*.

O bezerro 4.974 infestado com 10.000 larvas de *B. microplus*, as quais foram removidas no quinto dia da infestação, apresentou parasitemia por *B. bovis* de 0,01% no décimo quarto dia. A parasitemia máxima foi de 0,14% no décimo sexto dia, quando a temperatura também atingiu o nível máximo de 41,5°C. O hematócrito mínimo foi de 21% (47,5% inferior ao normal) no vigésimo quarto dia, quando não era possível detectar o parasito em esfregaços delgados de sangue periférico. O animal recuperou suas condições normais sem auxílio

¹⁰ Polivinil-pirrolidona, peso molecular 25.000 a 30.000.

¹¹ Glicerol P.A. Reagen.

¹² Laborlex.

¹³ Ganaseg Solução injetável.

¹⁴ Imizol Injetável.

TABELA 1. Período de incubação, parasitemia máxima, temperatura máxima e decréscimo do hematócrito de bezerros esplenectomizados, inoculados com *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* transmitidos por carrapatos e por inoculação de sangue parasitado.

	Período incubação (dias)	Modo de inoculação	Parasitemia máxima		Temperatura máxima		Decréscimo do hematócrito		Observações
			(%)	(dia)	(%)	(dia)	(%)	(dia)	
<i>B. bovis</i>									
Bezerro 4.974	14	10.000 larvas	0,14	16	41,5	16	47,5	24	recuperou
Bezerro 5.044	5	200 ml sangue do 4.974 c/0,08% Parasitemia	10,4	7	41,0	5	45,0	7	morreu
<i>B. bigemina</i>									
Bezerro 5.118	11	metalarvas	19,5	14	40,3	14	84	16	recuperou
Bezerro 5.092	2	40 ml sangue do 5.118 c/3,8% Parasitemia	2,8	5	40,4	5	40	7	recuperou
<i>A. marginale</i>									
Bezerro 5.048	11	100 ml sangue	40,6	19	41,0	19	74	22	medicado
Bezerro 5.092	4	200 ml sangue do 5.048 c/3,7% Parasitemia	72,0	11	41,0	12	74	12	medicado

de medicação. Observado por mais doze meses não apresentou parasitemia detectável em lâminas de sangue periférico. A transfusão de 200 ml de sangue deste bezerro, quando a parasitemia era de 0,08%, resultou na infecção patente do receptor (bezerro 5.044) no quinto dia, com parasitemia de 0,07%, temperatura de 41,0°C e hematócrito de 29% (27,5% inferior ao normal). Este animal morreu no sétimo dia, quando a parasitemia era de 10,4% a temperatura 32,8°C e o hematócrito 22% (45% inferior ao normal).

O bezerro 5.048 que recebeu 100 ml de sangue de um portador de *A. marginale* e *B. bigemina*, sendo concomitantemente medicado com babesicida, apresentou parasitemia de 0,03% por *A. marginale* onze dias após a inoculação. A parasitemia máxima foi de 40,6%, 19 dias após a inoculação, quando a temperatura máxima foi de 41°C. O hematócrito mínimo foi de 9% (74% inferior ao normal) no vigésimo segundo dia. Este animal foi medicado com cloridrato de oxitetraciclina¹⁵, na dose de 20 mg/kg de peso vivo. O bezerro 5.092, inoculado com 200 ml de sangue deste mesmo animal quando a parasitemia era de 3,7% no décimo quinto dia, apresentou parasitemia de 0,01% por *A. marginale* quatro dias após a inoculação. A parasitemia máxima atingiu 72% e a temperatura máxima 41°C no décimo primeiro dia. O hematócrito decresceu 74% de seu valor normal no décimo segundo dia. Este animal foi também medicado com cloridrato de oxitetraciclina na mesma dose aplicada no

anterior. Nenhum destes animais apresentou infecção por *Babesia*. Os resultados são apresentados resumidamente na Tabela 1.

DISCUSSÃO

A obtenção de animais experimentais livres de infecção anterior por *Babesia* e *Anaplasma* tem sido um problema limitante para o desenvolvimento da pesquisa sobre estas hemoparasitoses em países tropicais como o Brasil, cujas áreas livres são restritas e, em geral, distantes dos centros de pesquisa. A maioria dos trabalhos publicados se refere à aquisição de animais criados em áreas livres do carrapato e, conseqüentemente, de babesiose e anaplasiose (Callow & Hoyte 1961a,b, Mahoney & Mirre 1979, Dalgliesh & Stewart 1983) ou removidos para baias isoladas logo após o nascimento (Kessler & Bellato 1981). A obtenção de animais criados em áreas livres, apesar de ser o ideal, torna-se muito onerosa e quase impraticável em determinadas circunstâncias, e a remoção de bezerros logo após o nascimento apresenta dificuldades inerentes à criação de animais privados do colostro ou, quando ministrado o colostro, à manutenção destes animais por longos períodos até que ocorra a eliminação total de anticorpos colostrais que podem interferir nos resultados da pesquisa. No presente trabalho demonstrou-se a possibilidade de obtenção de animais susceptíveis, mantidos a campo, desde que observadas algumas medidas de isolamento. A frequência dos banhos carrapaticidas não apresentou nenhum inconveniente com relação à saúde das matrizes. Em virtude da baixa probabilidade de rein-

¹⁵ Terramicina LA - Solução injetável.

festação, o risco de desenvolvimento de cepas de carrapato resistentes aos carrapaticidas, nestas circunstâncias, nos parece também bastante baixo. Entretanto, esta possibilidade deve ser considerada com relação à população de carrapatos existentes fora da área de isolamento.

O método de isolamento de cepas puras de *B. bovis* e *B. bigemina* utilizando as características de transmissão destes parasitos pelo carrapato *B. microplus*, mostrou-se prático e seguro. Os resultados obtidos estão em concordância com os publicados por Callow & Hoyte (1961a,b), Mahoney & Mirre (1977), Kessler & Bellato (1981) e Dalgliesh & Stewart (1983). Tendo-se o cuidado de transferir as metalarvas de um bezerro para outro até o quinto dia de infestação, isto é, antes que as primeiras ninfas tenham a oportunidade de se alimentar no primeiro bezerro, é possível isolar as duas espécies, *B. bovis* e *B. bigemina*, simultaneamente, utilizando-se apenas dois animais.

O isolamento de *A. marginale* por inoculação de sangue de um portador concomitantemente com a medicação babesicida, conforme descrito por Uilenberg (1971) é um método prático e econômico, uma vez que é necessário somente um bezerro que poderá ser mantido por um longo período como portador crônico da cepa isolada. Entretanto, quando existe o risco de transmissão de outros agentes como *Eperythrozoon* e *Theileria*, o método descrito por Dalgliesh & Stewart (1983) deve ser considerado.

A esplenectomia dos animais a serem utilizados no isolamento de cepas puras, além de aumentar a suscetibilidade (Riek 1968, Klaus & Jones 1968, Murphy et al. 1966) viabilizando a infecção por pequenos inóculos, permite o prévio monitoramento de infecções latentes tanto por *Babesia* e *Anaplasma* como por *Eperythrozoon* e outros agentes infecciosos. Uma vez isoladas as cepas, as colônias de carrapatos poderão ser infectadas especificamente para estudos sobre transmissão, biologia e imunologia, infectando bovinos intactos ou esplenectomizados, a campo ou em laboratório, a produção de antígenos e vacinas e estudos de sensibilidade a drogas.

CONCLUSÕES

1. É possível fazer-se o isolamento de cepas puras de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, em

áreas enzoóticas, desde que se tomem as medidas de isolamento das matrizes que produzirão os bezerros livres, de modo a evitar a reinfestação por carrapatos.

2. A utilização das características de transmissão destas espécies pelo carrapato *B. microplus* é um método prático e seguro para o isolamento de *B. bovis* e *B. bigemina*.

3. O isolamento de *A. marginale* por transfusão de sangue de um portador, concomitantemente com a medicação com um babesicida, é um método prático quando não existe o risco de transmissão de outros agentes infecciosos, resistentes aos babesicidas.

4. O uso de receptores esplenectomizados para o isolamento de cepas puras, além de aumentar a suscetibilidade viabilizando a infecção por pequenos inóculos, permite a identificação prévia de infecções latentes que de outra maneira permaneceriam despercebidas.

REFERÊNCIAS

- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DE MATO GROSSO DO SUL. Campo Grande, Fundação Instituto de Desenvolvimento de Mato Grosso do Sul, 1984. 796p.
- CALLOW, L.L. & HOYTE, H.M.D. The separation of *Babesia bigemina* from *Babesia argentina* and *Theileria mutans*. *Aust. Vet. J.*, 37:66-70, 1961a.
- CALLOW, L.L. & HOYTE, H.M.D. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* spp. and the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.*, 37:381-90, 1961b.
- DALGLIESH, R.J. & STEWART, N.P. The use of tick transmission by *Boophilus microplus* to isolate pure strains of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* from cattle with mixed infections. *Vet. Parasitol.*, 13:317-23, 1983.
- EMPRESA BRASILEIRA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. Coordenadoria Regional, 2. Mato Grosso do Sul; subsídios para o diagnóstico do estado. Campo Grande, 1977. 123p.
- EVANS, D.E. *Boophilus microplus* ecological studies and a tick fauna synopsis related to the developing cattle industry in the Latin American and Caribbean region. London, CNA, 1978. 283p. Tese Doutorado.
- FREIRE, N.S. Tristeza parasitária bovina no Brasil; retrospectiva. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE PARASITÓSES DOS BOVINOS, 1., Campo Grande, 1975. Anais. Campo Grande, EMBRAPA-CNPGC, 1975. p.271-8.
- GUGLIEMONE, A.; BERMUDEZ, A.; HADANI, A.; MANGOLD, A.; VANZINI, V.; LUCIANI, C. de; RIOS, L.G.; GALLATTO, C. Aislamiento de una ce-

- pa de *Babesia bigemina* por la parasitación de un ternero con *Boophilus microplus* adultos. *Gac. Vet.*, 43: 341-7, 1981.
- KESSLER, R.H. & BELLATO, V. Measurement of the protective immune response to *Babesia bovis* culture derived antigens. 1. Isolation of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* strains from Rio Grande do Sul, Brazil. s.l., s.ed., 1981. 7p. Trabalho apresentado no "II Research Coordination Meeting Coordinated Research Programme on the Use of Isotope Techniques in Research and Control of Ticks and Tick Borne Diseases", Nairobi, Quênia, 1981.
- KLAUS, G.G.B. & JONES, E.W. The immunoglobulin response in intact and splenectomized calves infected with *Anaplasma marginale*. *J. Immunol.*, 100(5): 991-9, 1968.
- MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M.; FIGUEIREDO, G.R. de; CURVO, J.B.E. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesq. agropec. bras.*, 19(9): 1163-8, 1984.
- MADRUGA, C.R.; BERNE, M.E.A.; KESSLER, R.H.; GOMES, R.F.C.; LIMA, J.G.; SCHENK, M.A.M. Diagnóstico da tristeza parasitária bovina no Estado de Mato Grosso do Sul; inquérito de opinião. Campo Grande, EMBRAPA-CNPGC, 1985a. 42p. (EMBRAPA-CNPGC. Circular técnica, 18)
- MADRUGA, C.R.; KESSLER, R.H.; GOMES, A.; SCHENK, M.A.M.; ANDRADE, D.F. de. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore e Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesq. agropec. bras.*, 20(1): 135-42, 1985b.
- MAHONEY, D.F. & MIRRE, G.B. A note on the transmission of *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*) by the one-host tick, *Boophilus microplus*. *Res. Vet. Sci.*, 26:253-4, 1979.
- MURPHY, F.A.; OSEBOLD, J.W.; AALUND, O. Kinetics of the antibody response to *Anaplasma marginale* infection. *J. Infect. Dis.*, 116:99-111, 1966.
- RIEK, R.F. Babesiosis. In: WEINMAN, D. & RISTIC, M., ed. *Infectious blood diseases of man and animals*. New York, Academic, 1968. p.218-68.
- SCHENK, M.A.M.; GOMES, A.; EVANS, D.; BERNE, M.E.A. Epidemiologia do *Boophilus microplus* nas condições do cerrado. Campo Grande, EMBRAPA-CNPGC, 1983. 5p. (EMBRAPA-CNPGC. Pesquisa em andamento, 23)
- THOMPSON, K.C.; ROA, J.E.; ROMERO, N.T. Anti-tick grasses as the basis for developing practical tropical tick control packages. *Trop. Anim. Health Prod.*, 10:179-82, 1978.
- UILENBERG, G. Notes sur les babésioses et l'anaplasmose des bovines Madagacear. VI. Prémunition artificielle, *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 24:23-5. 1971.