

# RESPOSTA IMUNE HUMORAL CONTRA *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) EM BOVINOS SUBMETIDOS A DISTINTAS ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DO CARRAPATO VETOR *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887)

## Immune humoral response against *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) in cattle under different control strategies of the vector tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)

VIEIRA<sup>1</sup> M.L.B., LEITE<sup>2</sup> R.C., MARTINS<sup>3</sup> J.R., SACCO<sup>4</sup>, A.M.S. & SILVA<sup>5</sup> J.G.C.

(1) Prof. Titular Doenças Parasitárias, URCAMP, Bagé, RS, maria\_isabel\_vieira@hotmail.com; (2) Departamento de Med. Vet. Preventiva Escola de Veterinária, UFMG; (3) FEPAGRO-Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS; (4) Centro de Pesquisa Pecuária Sul/Embrapa, Bagé, RS; (5) Prof. Titular, Instituto de Física e Matemática, UFPEL, RS.

**SUMMARY:** This work had the objective of determining the maintenance of the humoral immune response against *Anaplasma marginale* in cattle under distinct methods to control *Boophilus microplus* ticks in the region of Bagé, RS, Brazil. Aberdeen Angus female (127), with ages between 10 to 12 months, were divided into five experimental groups. Animals in group one were treated according to an integrated control program using doramectin, inoculation of attenuated strains of *Anaplasma centrale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* and antiparasitic treatments; animals in group two were treated with rBm 86 antigen associated to tactic treatments with amitraz; animals in group three were treated with ivermectin (3,15%); animals in group four, so called “conventional control” were treated with amitraz, and animals in group five, so called “suppressive” were treated every two weeks with amitraz. Tick counts were carried out every 14 days and serology, by the indirect fluorescent antibody test (IFAT), was carried out every two months for detection of IgG antibodies. The animals were challenged with *B. microplus* infected larvae in november of 2000. The clinical and serological results indicated that the control methods did not interfered with the enzootic stability for anaplasmosis.

**KEY WORDS:** *Boophilus microplus*, *Anaplasma marginale*, Indirect Fluorescent Antibody Test, enzootic stability.

## INTRODUÇÃO

A anaplasmose é uma infecção que pode ser aguda ou crônica nos bovinos, tendo como agente etiológico a rickettsia *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910). Essa enfermidade é mais comumente encontrada nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, causando severos prejuízos ao desenvolvimento da bovinocultura de diversos países, e na fase aguda a mesma pode ser diagnosticada através de esfregaços sanguíneos, porém a parasitemia com frequência é baixa em infecções subclínicas ou crônicas (CALLOW, 1984; SANSOUCY, 1995; NIELSEN *et alii*, 1996).

A transmissão biológica do *A. marginale* por várias espécies de carrapatos ixodídeos foi demonstrada experimentalmente (STILLER & COAN, 1995), sendo que o ciclo evolutivo foi descrito em *Dermacentor* spp. (KOCAN *et alii*,

1989). RIBEIRO & LIMA (1996) observaram que o desenvolvimento de colônias de *A. marginale* no intestino de fêmeas ingurgitadas do *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) comporta-se de forma diferente das observadas em outros carrapatos, como o *Dermacentor andersoni* (KOCAN *et alii*, 1980, 1982) e o *Rhipicephalus simus* (POTGIETER *et alii*, 1983). Essas diferenças podem ser atribuídas às características fisiológicas ou biológicas dos carrapatos de três hospedeiros em relação ao carrapato monoxeno *B. microplus* (RIBEIRO & LIMA, 1996).

Os dípteros são considerados vetores (KUTTLER, 1979) da anaplasmose, sendo que os tabanídeos aparentam ser os transmissores mecânicos mais eficientes. Essa situação também foi observada em áreas em que o carrapato *B. microplus* é considerado um importante vetor (GUGLIELMONE, 1994). Entretanto, os trabalhos experimentais sobre a transmissão

de *A. marginale* por insetos hematófagos apresentam resultados contraditórios, necessitando novas investigações para comprovar a importância epidemiológica dos mesmos (KESSLER, 2001).

Historicamente, associou-se a presença do *A. marginale* aos carrapatos do gênero *Boophilus*, no entanto, a erradicação do *B. microplus* de algumas áreas da Argentina não resultou na eliminação desse microorganismo (ANZIANI, 1979), sendo relatada a ocorrência de surtos de anaplasmosose numa região livre desse carrapato ixodídeo (GUGLIELMONE et alii, 1997).

O presente trabalho teve como objetivo observar a manutenção da resposta imune humoral contra o *A. marginale* em bovinos submetidos a distintos métodos de controle do carrapato *B. microplus* na região de Bagé, RS.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS (longitude oeste 55°06' 2" Lon W, 31°20' 13" Lat S, 216 m, 17,9°C, 1264 mm de precipitação anual), no período compreendido entre setembro de 1999 e dezembro de 2000. Utilizaram-se 127 fêmeas da raça Aberdeen Angus, com 10 a 12 meses de idade ao início do experimento, pesando em média 150 kg PV e procedentes de região com infestação por *B. microplus*. Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais, de acordo com o peso corporal e os grupos um, dois, três e quatro constaram de duas réplicas com 14 animais alocados em oito piquetes de 8,53 ha, constituídos por pasto nativo e naturalmente infestados por *B. microplus*. O grupo cinco constou de 15 animais manejados em piquete livre de infestação por esse carrapato.

Em 14 de setembro de 1999 todos os animais foram medicados com Dipropionato de Imidocarb<sup>1</sup> na dose de 2,5 ml/100 kg PV para uniformização dos grupos com relação aos hemoparasitos presentes. No dia 28 de setembro os bovinos foram pesados para a separação dos grupos experimentais e no dia 25 de outubro todos os grupos receberam tratamento acaricida com amitraz<sup>2</sup>, independente da infestação de carrapato observada. Os grupos foram assim constituídos:

**Grupo 1:** Controle Estratégico Integrado: tratado com doramectina<sup>3</sup> em 25/11/1999, 02/02/2000 e 22/05/2000 mais tratamentos anti-helmínticos a base de benzimidazol<sup>4</sup> e vacina refrigerada para Tristeza Parasitária Bovina<sup>5</sup> (TPB) com cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma centrale*, aplicada em dose única dia 19/11/1999.

**Grupo 2:** Antígeno rBm86 recombinado em *Pichia pastoris*<sup>6</sup> 1ª dose - em 29/09/1999; 2ª dose: 25/10/1999; 3ª dose: 25/11/1999 e revacinação semestral. Este grupo recebeu tratamentos táticos com banhos carrapaticidas com amitraz em 16/02/2000, 26/04/2000 e 10/05/2000.

**Grupo 3:** Ivermectina 3,15%<sup>7</sup>: Dose única – 09/11/1999.

**Grupo 4:** Controle Convencional: Banhos de imersão com amitraz: 21/12/1999, 15/02/2000 e 26/04/2000. Os tratamentos foram aplicados quando o nível de infestação excedia os níveis considerados aceitáveis pelos produtores, baseado na presença de fêmeas ingurgitadas.

**Grupo 5:** Supressivo: banhos com amitraz a cada 14 dias durante toda a fase experimental.

As infestações pelo carrapato *B. microplus* ocorridas durante o período foram classificadas de acordo com o modelo populacional da região de Bagé (ALVES BRANCO et alii, 1987) nos seguintes períodos: 1 (novembro/dezembro - 1ª geração); 2 (janeiro/fevereiro - 2ª geração); 3 (março/abril - 3ª geração); 4 (maio/junho); 5 (julho/agosto); 6 (agosto/setembro). A infestação dos bovinos por carrapatos foi avaliada através de contagens de ínstares parasitários entre 4,5 e 8 mm a cada 14 dias de acordo com a técnica de WHARTON & UTECH (1970).

As larvas de carrapato *B. microplus* utilizadas no processo de desafio foram obtidas a partir de fêmeas ingurgitadas oriundas dos bovinos do próprio experimento. As fêmeas colhidas foram mantidas em estufa BOD, com temperatura de 27°C e umidade relativa superior a 70% e os ovos dos três primeiros dias de postura foram descartados, sendo o restante pesado em porções individuais de 100 mg (em torno de 2000 larvas), que a seguir colocadas em seringas plásticas, fechadas com algodão e mantidas em estufa para eclosão. Nos dias 10, 12 e 14 de novembro de 2000 foi realizado o desafio com 2000 larvas de carrapato *B. microplus* em sete animais separados fortuitamente de cada uma das repetições de todos os grupos.

Os animais submetidos a esse procedimento foram acompanhados três vezes por semana, ou diariamente, quando necessário, em relação aos seguintes parâmetros: parasitemia, volume globular (VG) e temperatura retal. Assim, os resultados encontrados com relação à presença ou não de casos clínicos de TPB indicaram o estado de proteção desses animais frente ao desafio por larvas de carrapato, validando ou não os resultados dos testes de associação linear entre o número de animais com anticorpos anti-*A. marginale* e a intensidade de infestação por carrapato.

A pesquisa de anticorpos da classe IgG foi feita através

<sup>1</sup>Imizol – Laboratório Coopers

<sup>2</sup>Tac-Plus – Milenia Agro-Ciências, S.A., Alvet

<sup>3</sup>Dectomax – Laboratório Pfizer

<sup>4</sup>Ricobendazol – Laboratório Ouro Fino

<sup>5</sup>Eritrovac – Laboratório Hemopar

<sup>6</sup>Gavac – Heber Biotec

<sup>7</sup>Gold – Merial Saúde Animal

da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) a cada dois meses, a partir de novembro de 1999 até setembro de 2000. Esse procedimento foi efetuado no Laboratório de Imunoparasitologia da Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, segundo protocolo preconizado por MADRUGA *et alii* (2001).

Para análise dos resultados foi usado o teste chi-quadrado de Mantel-Haenzel (nível de significância  $\alpha = 0,05$ ) com o objetivo de avaliar a associação linear entre quantidade de animais com anticorpos anti-*A. marginale* e intensidade de infestação por carrapato *B. microplus*. Então, valores observados de P menores que 0,05 ( $P < 0,05$ ) conduzem à decisão de declarar presença de associação linear entre as variáveis estudadas.

Os valores observados das características registradas pós-desafio, tais como temperatura retal e volume globular, foram submetidos ao teste dms de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação do método de controle estratégico integrado (Grupo 1) comprova a eficácia da doramectina frente às infestações pelo *B. microplus*, concordando com os trabalhos de GONZALES *et alii* (1993) e LEITE *et alii* (1995). Com relação aos resultados da resposta imune humoral, foi observado que 100% dos animais mantiveram-se soropositivos ao *A. marginale* durante todo o período experimental, evidenciando que foi mantida a estabilidade para a anaplasmose nas condições desse estudo, conforme pode ser observado na Figura 1.

Na Figura 2 observamos os resultados das médias de carrapatos nos animais imunizados com o antígeno rBm 86 associado com tratamentos táticos com amitraz, registrando-se a ocorrência de duas gerações com maiores números de car-

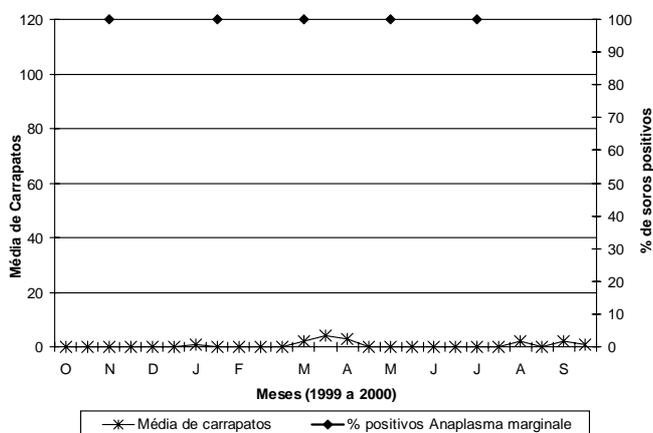


Figura 1. Correlação entre a média de carrapatos *Boophilus microplus* e percentual de soros positivos para o *Anaplasma marginale* em bovinos do grupo tratado com o controle estratégico integrado. Bagé, RS.

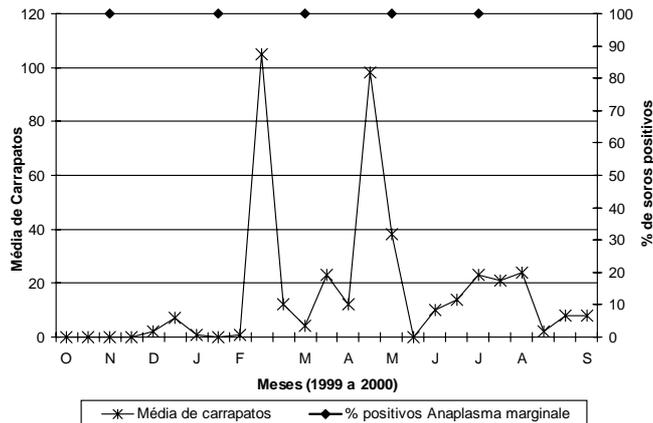


Figura 2. Correlação entre a média de carrapatos *Boophilus microplus* e percentual de soros positivos para o *Anaplasma marginale* em bovinos do grupo vacinado com o antígeno rBm 86. Bagé, RS.

rapatos ao longo do período experimental (entre fevereiro e maio), correspondendo a segunda e terceira geração de carrapato dessa região. Os resultados sorológicos indicaram que 100% dos animais mantiveram presença de anticorpos anti-*A. marginale* durante o período analisado.

O uso da ivermectina 3,15% determinou que os animais permanecessem com baixa infestação por carrapato *B. microplus* do 1º ao 3º período (1ª a 3ª geração) evidenciando seu longo poder profilático, conforme já descrito por BORDIN (1999) e BRIDI *et alii*, (2000). Foi observado que alguns ínstares parasitários começaram a surgir a partir do 4º período (entre junho e julho), conforme visto na Figura 3.

A presença de 100% de animais soropositivos para o *A. marginale* durante o período experimental indica que a baixa infestação por *B. microplus* não interferiu na manutenção da resposta imune humoral para aquele patógeno.

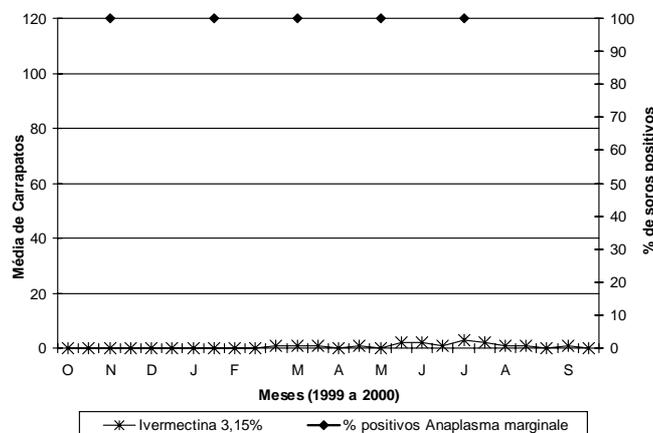


Figura 3. Correlação entre número de carrapatos *Boophilus microplus* e percentual de soros positivos para o *Anaplasma marginale* em bovinos do grupo tratado com a ivermectina 3,15%. Bagé, RS.

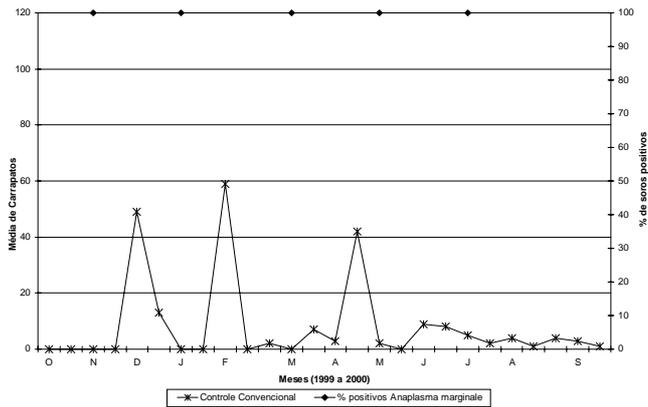


Figura 4. Correlação entre o número de carrapatos *Boophilus microplus* e percentual de soros positivos para o *Anaplasma marginale* em bovinos do grupo tratado com o controle convencional Bagé, RS.

Os resultados com relação à contagem de carrapatos do grupo convencional, evidenciaram que as três gerações de *B. microplus* descritas por ALVES BRANCO *et alii* (1987) foram mantidas nesse grupo, uma vez que os tratamentos carrapaticidas usados permitiram a manutenção do modelo populacional desse carrapato ixodídeo, conforme visto na Figura 4. O fator que definiu o momento dos tratamentos foi o grau de infestação do rebanho, através da visualização de ínstares adultos, situação esta já verificada por ROCHA (1996). A média de carrapatos observada no primeiro banho carrapaticida foi de 64, no segundo banho, 81 e no terceiro 66, sendo que os mesmos foram aplicados na 1ª, 2ª e 3ª geração, respectivamente. Em trabalho realizado no estado de Minas Gerais, por LEITE & ROCHA (1999) com o objetivo de determinar o número de carrapatos que definia o momento de aplicação do acaricida nas propriedades, registrou-se que a média geral entre todas as contagens foi de 78,6 carrapatos por animal, portanto assemelhando-se com o observado no presente estudo.

Os animais do grupo submetido ao controle convencional mantiveram durante o período experimental 100% dos animais com anticorpos anti-*A. marginale*. A falta de associação linear entre as variáveis deve-se ao fato de todos os animais serem soropositivos no período avaliado nos grupos um, dois, três e quatro.

Nos três primeiros períodos analisados (novembro-março) foi observado que 100% dos animais do grupo medicado supressivamente encontravam-se soropositivos para o *A. marginale*, enquanto que de maio a setembro, 86% dos animais eram sororeagentes. Esta situação permitiu que a estabilidade enzoótica para a anaplasmose fosse mantida em animais livres de infestação pelo carrapato *B. microplus*, conforme pode ser evidenciado na Figura 5. Este fato merece especial atenção, pois sugere a possibilidade de ter ocorrido

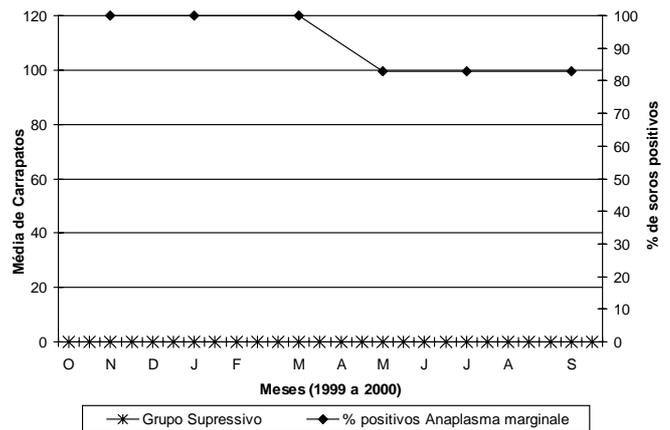


Figura 5. Correlação entre número de carrapatos *Boophilus microplus* e percentual de soros positivos para o *Anaplasma marginale* em bovinos do grupo medicado supressivamente Bagé, RS.

a inoculação dessa rickettsia por outros vetores mecânicos, contrapondo os resultados encontrados por GUGLIELMONE (1995) e KESSLER (2001) que consideraram que a anaplasmose era estável onde o carrapato *B. microplus* é endêmico e que a situação tende a apresentar um quadro de instabilidade em áreas considerada marginais para este carrapato. Deve-se também levar em conta que este grupo foi tratado com amitraz, produto que não atua contra os insetos hematófagos (KESSLER, 2001), e por consequência, não impediria a transmissão mecânica desse patógeno.

Os resultados observados nas condições do presente experimento, sugerem que além dos fatores de resistência natural (LEVY *et alii*, 1982), o constante desafio por *A. marginale* em todos os grupos, permitiu a produção de anticorpos possibilitando que houvesse um equilíbrio na relação hospedeiro-parasito, de forma a impedir o surgimento de altos níveis de parasitemia, que associado aos outros parâmetros analisados, como temperatura retal e volume globular, não indicaram necessidade de tratamento específico para a anaplasmose bovina, concordando com KUTTLER & TODOROVIC (1973) que citaram que os animais que se recuperam de uma infecção permanecem portadores, e são geralmente resistentes a manifestações clínicas severas em casos de reinfecção. Além disso, há evidências que a imunidade protetora nas infecções por essa rickettsia tem a participação das respostas imune humoral e celular (PALMER & McELWAIN, 1995). A imunidade protetora contra os organismos do gênero *Anaplasma* é desenvolvida após a recuperação da infecção aguda natural ou pela imunização com organismos vivos ou mortos, frações de membrana ou com proteínas de superfície purificadas, que apresentam epítomos apropriados para células B e T (TEBELE *et alii*, 1991; MUSOKE *et alii*, 1997). Na resposta imune humoral, a síntese inicial é de imunoglobulina

da classe M (IgM), que é coincidente com o início da parasitemia. Em seguida, durante a fase patente da infecção, surge a imunoglobulina G (IgG). Até trinta dias após a crise hemolítica, as proporções são em média 25% de IgM e 75% de IgG. No período de infecção crônica, a proporção de IgG aumenta (MURPHY *et alli*, 1966). Tais anticorpos têm sido associados à resistência adquirida à infecção por *Anaplasma*, porque foi demonstrado que os anticorpos contra os corpúsculos iniciais dessa rickettsia neutralizam a infectividade desses (PALMER & McGUIRRE, 1984). A importância dos anticorpos na proteção contra *A. marginale* é ratificada porque os bezerros, com baixo nível ou inexistência de anticorpos colostrais, desenvolvem anaplasmose em regiões de estabilidade endêmica (MADRUGA *et alii*, 1985).

Baseado nos resultados observados nas condições experimentais, os diferentes métodos de controle para o *B. microplus* não apresentaram nenhuma interferência na manutenção da endemicidade da anaplasmose bovina. Necessita-se, sem dúvida, de um melhor esclarecimento dos mecanismos de transmissão do *A. marginale* tanto relacionados a esse ixodídeo como aos dípteros hematófagos, o que possibilitará uma nova abordagem epidemiológica dessa enfermidade na região estudada.

## AGRADECIMENTOS

À Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS por viabilizar a execução desse projeto nesse centro de pesquisa e ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte/Embrapa, especialmente ao Dr. Cláudio Roberto Madruga e equipe do Laboratório de Imunoparasitologia pela ajuda nas análises da RIFI.

## SUMÁRIO

Esse trabalho teve como objetivo observar a manutenção da resposta imune humoral do *Anaplasma marginale* em bovinos submetidos a distintos métodos de controle do carrapato *Boophilus microplus*, na região de Bagé, RS, Brasil. Foram utilizadas 127 fêmeas Aberdeen Angus entre 10 a 12 meses de idade, divididas em cinco grupos experimentais. O grupo um foi tratado com o controle estratégico integrado medicado com doramectina, mais inóculo com cepas atenuadas de *Anaplasma centrale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e tratamentos antiparasitários; o grupo dois foi tratado com o antígeno rBm 86 e tratamentos táticos com amitraz; grupo três medicado com ivermectina (3,15%); grupo quatro, denominado de “convencional”, foi tratado com banhos com amitraz; e o grupo cinco, chamado de “supressivo”, com tratamentos a cada duas semanas com amitraz. A contagem de

carrapatos foi feita a cada 14 dias e a sorologia foi realizada a cada dois meses através da reação de Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos da classe IgG. Os animais foram desafiados com larvas de carrapatos de *B. microplus* em novembro de 2000. Os resultados indicaram que os métodos de controle usados para o carrapato *B. microplus* não interferiram na estabilidade enzoótica para a anaplasmose.

**PALAVRAS CHAVE:** *Boophilus microplus*, *Anaplasma marginale*, reação de Imunofluorescência Indireta e estabilidade enzoótica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-BRANCO, F.P.J.; PINHEIRO, A.C.; MACEDO, J.B.R. (1987). Prevalência estacional do *Boophilus microplus* em bovinos das raças Hereford e Ibagé. *Med. Vet. Parasitol.*, Centro Nacional de Pesquisas de Ovinos, Embrapa, 5: 223-228.
- ANZIANI, O.S. (1979). Anaplasmosis en áreas libres de garrapatas. *Mem. Reunión Anual Informe Téc.* INTA, Rafaela, p.63-68.
- BORDIN, E.L. (1999) Ivomec Gold – Uma Opção no Controle Integrado de Parasitos. In: *Seminário Brasileiro De Parasitologia Veterinária, Xi, Seminário De Parasitologia Veterinária Dos Países Do Mercosul, Ii E Simpósio De Controle Integrado De Parasitos De Bovinos, II*, 1999, Salvador, *Anais...* Salvador, p.67.
- BRIDI, A.A.; CARVALHO, L.A.; CRAMER, L.G.; LANGHOFF, W.K. (2000). Weight gain of beef cattle in a one year parasite control program using Ivomec Gold. XXI World Buiatrics Congress of the World Association for Buiatrics. Punta del Este, p.51-60.
- CALLOW, L.L. (1984). Arthropod-borne rickettsias of the blood. In: *PROTOZOAL AND RICKETTSIAL DISEASES*, 5: 174-201.
- GONZALES, J.C.; MUÑIZ, R.A.; FARIAS, A.; GONÇALVES, L.C.B.; REW, R.S. (1993). Eficácia terapêutica e persistência de doramectin contra *Boophilus microplus* em bovinos. *Vet. Parasitol.*, 49: 107-119.
- GUGLIELMONE, A.A. (1994). Epidemiologia y prevención de los hemoparasitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en la Argentina. In: NARI, A., FIEL, C. *Enfermedades parasitarias de importancia economica en bovinos. bases epidemiológicas para su prevención y control*. Montevideo: Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. p. 461-479.
- GUGLIELMONE, A.A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.*, 57: 109-119.

- GUGLIELMONE, A.A.; ABDALA, A.A.; ANZIANI, A.; MANGOLD, A.J.; VOLPOGNI, M.M.; VANZINI, V.R. (1997). Different seasonal occurrence of anaplasmosis outbreaks in beef and dairy cattle in an area of Argentina free of *Boophilus microplus* ticks. *Vet. Quart.*, 19: (1): 32-33.
- KESSLER, R.H. (2001). Considerações sobre a transmissão do *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras.*, 21 (4): 177-179.
- KOCAN, K.M.; HAIR, J.A.; EWING, S.A. (1980). Ultrastructure of *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) in *Dermacentor andersoni* (Stiles) and *Dermacentor variabilis* (Say). *Am. J. Vet. Res.*, 41: 1966-1976.
- KOCAN, K.M.; EWING, S.A.; HOLBERT, D.; HAIR, J.A. (1982). Morphology characteristics of colonies of *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) in midgut epithelial cell of *Dermacentor andersoni* (Stiles). *Am. J. Vet. Res.*, 43: 586-593.
- KOCAN, K.M.; STILLER, D; GOFF, W.L.; EDWARDS, W.E.; WICKWIRE, K.B.; STICH, R.W.; YELLIN, T.N.; EWING, S.A.; PALMER, G.H.; BARRON, S.J.; HAIR, J.A.; McGUIRE, T.C. (1989). The developmental cycle of *Anaplasma marginale* in *Dermacentor* spp. Proc. 8<sup>th</sup> Nat. Hemoparasite Disease Conf., St. Louis, p.149-160.
- KUTTLER, K.L.; TODOROVIC, R.A. (1973). Techniques of preimmunization for the control of anaplasmosis. In: *Proceed. of the 6<sup>th</sup> National Anaplasmosis Conf.*, Stilwater, Oklahoma, p.106-125.
- KUTTLER, K.L. (1979). Current anaplasmosis control techniques in the United States. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 50: 314-320.
- LEITE, R.C.; MUNIZ, R.A.; OLIVEIRA, P.R.; GONÇALVES, L.C.B.; REW, R.S. (1995). Efficacy of doramectin against natural infestations of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 4 (1): 53-56.
- LEITE, R.C.; ROCHA, C.M.B.M. (1999). Contagem de carrapatos em bovinos no momento do banho carrapaticida em rebanhos leiteiros. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, n.1, p.41-42.
- LEVY, M.G.; CLABAUGH, G.; RISTIC, M. (1982) Age resistance in bovine babesiosis. Role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. *Infect. Immun.*, 37: 1127-1131.
- MADRUGA, C.R.; KESSLER, R.H.; GOMES, A.; SCHENK, M.A.M.; ANDRADE, D.F. de (1985). Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesq. Agrop. Bras.*, Brasília, 20 (1): 135-142.
- MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. (2001). *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Campo Grande, Embrapa Gado de Corte, 360p.
- MURPHY, F.A.; OSEBOLD, J.W.; AALUND, O. (1966). Kinetics of the antibody response to *Anaplasma marginale* infection. *J. of Infec. Diseases*, 116: 99-106.
- MUSOKE, A.J.; McKEEVER, D.; NENE, A. (1997) Subunit vaccines for control of tick borne diseases implications for the future. *Parassitologia*, 39: 131-137.
- NIELSEN, K.; SMITH, P.; GALL, D.; DE ECHAIDE, S.T.; WAGNER, G.; DAJER, A. (1966). Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. *Vet. Parasitol.*, 67: 133-142.
- PALMER, G.H.; McGUIRE, T.C. (1984). Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J. of Immunology*, 133: 1010-1015.
- PALMER, G.H.; McELWAIN, T.F. (1995) Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet. Parasitol.*, 57: 233-253.
- POTGIETER, F.T; KOCAN, K.M.; McNEW, R.W., EWING, S.A. (1983). Demonstration of colonies of *Anaplasma marginale* in the midgut of *Rhipicephalus simus*. *Am. J. Vet. Res.*, 44: 2256-2261.
- RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D. (1996). Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.*, 61: 31-39.
- ROCHA, C.M.B.M. (1996) *Caracterização da percepção dos produtores de leite do município de Divinópolis/MG sobre a importância do carrapato Boophilus microplus e fatores determinantes das formas de combate utilizadas*. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 205p.
- SANSOUCY, R. (1995). Livestock-a driving force for food security and sustainable development. *World Anim. Rev.*, 84/85: 5-17.
- STILLER, D & COAN, M.E. (1995). Recent developments in elucidating tick vector relationship for anaplasmosis and equine piroplasmiasis. *Vet. Parasitol.*, 57: 97-108.
- TEBELE, N.; McGUIRE, T.C.; PALMER, G.H. (1991). Introduction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infec. Immunity*, Washington, 59: 3199-3204.
- WHARTON, R.H.; UTECH, K.B.W. (1970). The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. *J. Aust. Entomol. Society*, 9 (2): 117-182.