

# OBTENÇÃO DE ISOLADO PURO DE *Anaplasma marginale* EM BEZERROS NEONATOS PRIVADOS DE COLOSTRO

FRANCISCO DE CARVALHO DIAS FILHO,<sup>1</sup> GUIDO FONTGALLAND COELHO LINHARES,<sup>2</sup> SABRINA CASTILHO DUARTE,<sup>3</sup> SÔNIA MARIA SANTANA QUAIOTTI<sup>4</sup> E PAULA MARINA BRITO JORGE<sup>4</sup>

1. Doutorando em Ciência Animal – Sanidade Animal, da Universidade Federal de Goiás (UFG).

2. Professor adjunto da Escola de Veterinária da UFG.

3. Doutoranda em Ciência Animal – Sanidade Animal da Universidade Federal de Goiás.

4. Médica veterinária.

## RESUMO

O trabalho foi realizado com o objetivo principal de obter isolados autóctones puros de *Anaplasma marginale* a partir de amostra de sangue de bovino criado em uma área endêmica para a tristeza parasitária bovina no município de Goiânia. Obteve-se o inóculo para o isolamento de *A. marginale* de animal doador, portador de infecções naturais mistas, após receber tratamento seletivo com dose babesicida esterelizante de dipropionato de imidocarb. Dois dias após esse tratamento, colheu-se dele uma amostra de sangue de 20 mL do animal doador para inoculação em bezerro neonato privado de colostro e livre de infecções por hemoparasitos. Após trinta dias da inoculação, o receptor apre-

sentou febre, apatia e parasitemia patente por *A. marginale*. Amostras de sangue foram então colhidas e preparadas na forma de estabilizados para serem criopreservadas e, assim, comporem banco de isolados de hemoparasitos autóctones. Realizou-se a comprovação da pureza do isolado, concomitantemente, pela demonstração de soroconversão específica, pela reação de PCR e, ainda, pela subinoculação da amostra criopreservada em bezerro suscetível. Constatou-se ainda que o uso de bezerros neonatos privados de colostro, como animais suscetíveis, pode ser considerado como modelo prático, eficaz e relativamente barato para o isolamento de hemoparasitos em regiões endêmicas.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Anaplasma marginale*, anaplasnose bovina, bezerros, isolados.

## ABSTRACT

### *Anaplasma marginale* PURE ISOLATE OBTAINED IN COLOSTRUM-DEPRIVED NEWBORN CALVES

This study was conducted with the objective of obtaining pure autochthonous isolates of *Anaplasma marginale* from blood samples of bovines that have been raised in the tick-borne disease endemic area of the municipality of Goiânia. The inoculum of *A. marginale* was prepared from a donor animal, known to be natural carrier of hemoparasite mixed infections, after treatment with a babesicid sterilizing dose of imidocarb dipropionate. A 20 mL blood sample was collected from the donor animal 2 days post-infection and then transferred to a colostrum-deprived and hemoparasite free newborn calf. The receptor animal showed signs of fever and apathy with patent *A.*

*marginale* parasitemia 30 days after inoculation. Blood sample was then collected and prepared as stabilates to be cryopreserved and to take part of an autochthonous blood parasites isolates library. The isolate purity was assured concomitantly by specific seroconversion tests, by PCR and by finally by the subinoculation of susceptible calves with the cryopreseved stabilates. It was confirmed that the use of colostrum-deprived free newborn calves as susceptible animals may be considered a practical and effective model to obtain pure hemoparasite isolates in endemic areas with additional advantages such as feasibility and low cost.

**KEY WORDS:** *Anaplasma marginale*, isolates, calves, bovine anaplasmosis.

## INTRODUÇÃO

O *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) é uma riquetsia de parasitismo intraeritrocitário obrigatório, que provoca em bovinos a doença conhecida por anaplasmosse (RISTIC & KREIER, 1974). Esta, por sua vez, faz parte do complexo designado de tristeza parasitária bovina, que, geralmente, é responsável por sérios prejuízos à pecuária bovina, como reflexo da alta taxa de mortalidade, perda de peso e diminuição na produção de leite (KESSLER et al., 2004).

O *A. marginale* ocorre endemicamente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, apresentando ampla distribuição geográfica nas Américas, na África e na Austrália (KESSLER & SCHENK, 1998). No Brasil, é endêmico em todo o território, causando importantes problemas sanitários, não somente em áreas de estabilidade enzoótica, mas também em áreas de instabilidade enzoótica (MADRUGA et al., 1985; VIDOTTO, & MARANA, 2001).

A principal forma de transmissão do *A. marginale* ocorre através da participação de artrópodes, como vetores mecânicos ou biológicos, podendo ainda ser transmitida iatrogenicamente (GUGLIELMONE, 1995). A transmissão congênita também tem sido reportada (RIBEIRO et al., 1995). No Brasil, o carrapato *Boophilus microplus* é considerado o seu principal vetor biológico (KESSLER, 2001).

No Estado de Goiás, as condições climáticas são propícias ao desenvolvimento do ciclo biológico do *B. microplus*, durante o ano todo. Essa interação agente-ambiente favorável contribui para o estabelecimento de condições epidemiológicas que caracterizam uma situação de estabilidade enzoótica. SANTOS et al. (2001) demonstraram taxa de prevalência de 96,73% (n=521) para os rebanhos bovinos da região, sendo que 100% das propriedades avaliadas (n=25) apresentavam positividade para *A. marginale*.

Os estudos sobre os fenômenos biológicos, epidemiológicos e imunológicos, assim como as pesquisas sobre novas técnicas de diagnóstico e na produção de imunógenos, requerem a disponibilidade de cepas ou isolados que permitam a

obtenção de produtos biológicos purificados. O desenvolvimento de novos métodos científicos depende da utilização de produtos biológicos que atendam às necessidades mínimas necessárias para a padronização deles.

O emprego de bovinos suscetíveis para o isolamento de amostras de hemoparasitos requer a locomoção de animais procedentes de áreas livres (DALGLIESH & STUART, 1983; SCHENK et al., 1993; RUIZ et al., 1999) ou de criações mantidas sob estrito controle contra os vetores, com a finalidade específica de preparar animais para experimentos dessa natureza (KESSLER et al., 1987; KESSLER et al., 1998). Bezerros nascidos de vacas imunes têm sido também utilizados para essa finalidade (KESSLER et al., 1998; BARREIRA et al., 2005, DIAS-FILHO et al., 2005).

Em condições laboratoriais há, como alternativa, o método do isolamento e manutenção de hemoparasitos em meios de cultura de eritrócitos. Apesar de este método ser reconhecido como tecnicamente mais correto, fatores como o custo elevado e a necessidade de técnicos altamente qualificados limitam seu uso mais frequente (BOSE et al., 1995).

O presente trabalho teve como objetivo principal a obtenção de isolados autóctones puros de *A. marginale* para compor banco de isolados de referência regional, a partir de amostra de sangue procedente de bovino portador de infecções naturais mistas com os agentes da tristeza parasitária bovina. Paralelamente, foi avaliado o emprego de bezerros neonatos totalmente privados de colostro, conforme metodologia descrita por DIAS-FILHO et al. (2005).

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção de isolados puros de *A. marginale* foram inicialmente alojados três bezerros receptores totalmente privados de colostro, antes, portanto, de receberem transferência da imunidade materna via colostro. Os animais eram mestiços Holandês/Jersey, com aparente estado de hígidez, nascidos em ambiente livre de carrapatos e confinados em instalações numa área

de isolamento na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (EV/UFG). Medidas de biossegurança foram adotadas para prevenir a entrada de vetores artrópodes. Observaram-se ainda cuidados relativos à alimentação e ao ambiente, no sentido de proporcionar conforto e bem-estar animal. Os bezerros receberam dieta à base de leite *in natura*, na quantidade de três a quatro litros diários.

Para a obtenção do inóculo de campo de *A. Marginale*, preparou-se um bezerro doador, com idade de doze meses, proveniente do rebanho da EV/UFG. O animal foi considerado provável portador de infecção natural por *A. marginale*, com base no fato de ter sido criado em uma área endêmica de permanente exposição ao *B. microplus* e apresentar anticorpos anti-*A. marginale*, detectados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Submeteu-se o doador a tratamento parenteral com dipropionato de imidocarb (Imizot B12, União Química Farmacêutica Nacional S.A.) na dose de 3 mg/Kg de peso vivo, via subcutânea. A dosagem foi assim estipulada visando alcançar um efeito babesicida esterilizante que não comprometesse o estado de portador para *A. marginale* (LOSOS, 1986; IICA, 1987). Dois dias após a administração do fármaco, colheu-se uma amostra de 20 mL de sangue do doador por meio de punção da veia jugular. O sangue retirado foi imediatamente aplicado no bezerro receptor de nº 1, sem anticoagulante.

Após a inoculação e durante todo o período experimental, monitorou-se clínica e laboratorialmente o bezerro, duas vezes ao dia. A temperatura retal e os sinais clínicos eram registrados em fichas individuais. Uma vez verificada alteração nos parâmetros normais, procedia-se à coleta de sangue com anticoagulante para a pesquisa microscópica de parasitos em preparações de esfregaço sangüíneo coradas pelo Giemsa e para a verificação do volume globular (VG) pela técnica do micro-hematócrito. Determinou-se a parasitemia adotando-se a metodologia descrita por IICA (1987).

Quando confirmada a infecção patente por *A. marginale*, colheu-se uma amostra de 20mL de

sangue com anticoagulante EDTA (Anticoagulante Universal, Doles – 1 gota/5mL) para extração de DNA total e outra de 20mL em tubo heparinizado (1mg/mL) para o preparo de estabilizado e criopreservação.

A extração de DNA foi realizada empregando-se *kit* comercial (GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Biosciences). Testaram-se amostras de DNA total pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com a finalidade de comprovar a identidade molecular e a pureza do isolado. Realizaram-se as reações de PCR adotando-se três protocolos diferentes. Nos dois primeiros, foram empregados os pares de iniciadores GAU9/GAU10 e GAU6/GAU7 para a amplificação espécie-específica de fragmentos do gene SSU RNAr de *Babesia bovis* (541 pares de base – pb) e de *Babesia bigemina* (685 pb), respectivamente, conforme LINHARES et al. (2002). No terceiro ensaio de PCR empregaram-se iniciadores específicos para o fragmento de 409 pb do gene MSP1 de *A. marginale*, segundo BARBET & ALLRED (1991). Os testes de PCR também foram aplicados à amostra de DNA total, extraído do sangue coletado no dia –1 da inoculação no receptor.

A amostra de 20mL de sangue heparinizado foi aliqüotada em tubos plásticos de 3 mL, com tampa rosqueável (Techno Plastic Products, TPP®), para a criopreservação sob a forma de estabilizado, em solução PBS/DMSO, conforme IICA (1985).

Do bezerro receptor nº 1 ainda colheram-se amostras de sangue sem anticoagulante para a obtenção do soro, no dia -1 da inoculação e 21 dias após o início da parasitemia patente por *A. marginale*. Estas foram utilizadas para a demonstração de soroconversão específica pela RIFI.

Executaram-se os testes sorológicos de RIFI em diluições seriadas do soro na escala de 1:10, a partir de 1:80 e até 1:5.120, segundo metodologia descrita por TODOROVIC & LONG (1976). O conjugado (FITIC anti-IgG bovina, Sigma) foi utilizado na diluição de 1:350, conforme prévia titulação. Formularam-se reações com antígenos totais de *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, preparados em lâminas individualizadas, de acordo

com IICA (1987). Os antígenos foram preparados na Universidade Federal de Minas Gerais e gentilmente cedidos pelo Dr. José Divino Lima.

Com a finalidade de comprovar a pureza e a viabilidade do isolado criopreservado de *A. marginale* obtido no bezerro nº 1, uma amostra de 3mL do mesmo foi subinoculada no bezerro nº 2. Para este último executaram-se procedimentos idênticos aos do bezerro nº 1. Os bezerros nº 3 e 4 foram mantidos como controle, durante todo o experimento, sob as mesmas condições dos anteriores, sem contudo receberem algum tipo de inóculo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bezerro receptor nº 1, inoculado com amostra de sangue procedente de bovino portador

de infecção natural de *A. marginale*, apresentou aumento da temperatura retal no 30º dia pós-inoculação. Nesta mesma ocasião foi detectada infecção patente com parasitemia de 1% para *A. marginale*, ao exame microscópico do esfregaço sangüíneo. O período prepatente observado ocorreu, portanto, dentro do intervalo esperado para a enfermidade, entre 20 a 40 dias, como registrado por RISTIC (1981).

A eletroforese dos produtos de PCR revelou o fragmento espécie-específico de 409 pb do gene MSP1 apenas nas reações realizadas com DNA total extraído no dia da parasitemia patente, tanto do bezerro nº 1 como do nº 2. Os resultados dos ensaios de PCR para *B. bovis* e *B. bigemina* foram negativos para todas as amostras de DNA procedentes de ambos os bezerros receptores (Quadro 1).

**QUADRO 1.** Resultados das reações de PCR em amostras de DNA extraídas de sangue de bezerros suscetíveis, um dia antes da infecção experimental com amostra de campo de *A. marginale* (D-1) e no primeiro dia de parasitemia patente (PP).

PCR espécie-específico	Bezerro nº. 1		Bezerro nº. 2	
	<i>D-1</i>	<i>PP</i>	<i>D-1</i>	<i>PP</i>
<i>A. marginale</i>	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.
<i>B. bovis</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
<i>B. bigemina</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Neg.= resultado de PCR negativo; Pos.= resultado de PCR positivo.

Os resultados referentes aos exames de RIFI para *B. bigemina* e *B. bovis* foram negativos tanto para as amostras de soros coletadas no dia anterior à inoculação como naquelas referentes ao 21º dia após o início da parasitemia patente por *A. marginale*. Por outro lado, os testes de RIFI evidenciaram soroconversão específica para *A. marginale*, nos dois bezerros receptores, os quais apresentaram títulos iguais a zero no dia -1 da inoculação e 1:1.280 (bezerro nº1) e 1:680 (bezerro nº 2) no 21º dia após o início da parasitemia.

A soroconversão, demonstrada em amostras pareadas de soro, tem sido amplamente empregada como um método confirmatório e seguro para o diagnóstico de infecções por microrganismos específicos (KUTTLER et al., 1984; SWAI et

al., 2005). Portanto, os resultados dos exames sorológicos permitiram concluir que os isolados obtidos nos bezerros nº 1 e 2 representavam amostras puras de *A. marginale*.

O bezerro nº 2, subinoculado com estabilizado criopreservado, apresentou infecção patente pura por *A. marginale* no 28º dia pós-inoculação, com parasitemia de 1,2%. Os bezerros nº 3 e nº 4, mantidos como controle, não apresentaram nenhuma manifestação clínica, nem soroconversão, confirmando a pertinência dos critérios experimentais adotados.

Os resultados alcançados neste estudo, referentes aos exames de PCR, às provas sorológicas e à subinoculação, foram reciprocamente confirmatórios para a demonstração da obtenção de isolado puro de *A. marginale*.

A obtenção de isolados puros de *A. marginale*, a partir da inoculação experimental com amostra de sangue oriunda de animal portador de infecções naturais mistas (agentes da Tristeza Parasitária Bovina), comprovou a eficácia da atividade seletiva quimioesterilizante do dipropionato de imidocarb para os microrganismos *B. bigemina* e *B. bovis*, como descrito previamente por LOSOS (1986) e IICA (1987).

Ficou aqui demonstrada a viabilidade do uso de bezerros neonatos, privados de colostro, como animais suscetíveis para a obtenção de isolados puros de hemoparasitos. Apesar da vulnerabilidade imunológica dos bezerros em virtude da privação de colostro (BESSI et al., 2002; PAULETTI et al., 2003), nenhuma ocorrência foi registrada em consequência dessa condição. As medidas sanitárias e de biossegurança adotadas durante o experimento, envolvendo os animais, o pessoal, os alimentos e o ambiente, certamente contribuíram para contornar o risco potencial.

Nas condições em que foi desenvolvido o presente trabalho, foram observadas várias vantagens do uso de bezerros neonatos como animais suscetíveis, quando comparado com outros métodos tradicionalmente aplicados por outros pesquisadores como DALGLIESH & STUART (1983), KESSLER et al. (1987), SCHENK et al. (1993), KESSLER et al. (1998), RUIZ et al. (1999) e BARREIRA et al. (2005). Entre essas vantagens, destacaram-se o baixo custo dos animais e o curto intervalo de tempo entre a preparação deles e a conclusão do experimento. Em função da idade e do pequeno porte dos animais, registraram-se baixos dispêndios com transporte, alojamento e alimentação, além de maior facilidade com o manejo diário.

Apesar dos resultados satisfatórios alcançados com esta metodologia, os autores alertam para a necessidade de estrita precaução quanto à presença de carrapatos no local de nascimento e alojamento para os bezerros suscetíveis, principalmente quando o experimento for realizado em região endêmica para tristeza parasitária bovina. Da mesma forma, falhas nos cuidados com a biossegurança e o conforto animal podem desencadear resultados indesejáveis.

## CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo pode-se concluir que a obtenção de isolados puros de *A. marginale*, a partir do sangue de bovino portador de infecções naturais mistas com os agentes da tristeza parasitária bovina, torna-se viável com o uso do dipropionato de imidocarb como uma droga babesicida esterilizante.

A utilização de bezerros neonatos, privados de colostro, como animal suscetível para obtenção de isolados puros de *A. Marginale*, é uma alternativa viável e de baixo custo, quando comparada aos métodos convencionais.

## REFERÊNCIAS

- BARBET, A.F.; ALLRED, D.R. The msp1 beta multigene family of *Anaplasma marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 3, p.971-976, 1991.
- BARREIRA, J. D.; DORIA-ROSSI, M. I.; SILVA, G. V. O.; PIRES, F. A.; MASSARD, C. L. Morfologic characterization of biological aspects of evolutive forms of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1983) (Protozoa: *Babesiidae*) in *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1987). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, n. 2, p. 75-78, 1993.
- BOSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 61-64, 1995.
- CALLOW, L.L.; HOYTE, H.M.D. Transmission experimentus using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* spp. and the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 37, p. 381-390, 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. **Veterinary Parasitology**, n.13, p. 317-323, 1983.
- DIAS FILHO, F.C.; LINHARES, G. F.C.; DUARTE, S.C.; LINHARES, D.C.L. Obtenção de isolados puros de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* a partir de larvas e ninfas de *Boophilus microplus* em bezerros neonatos privados de colostro. **Revista de Parasitologia Tropical**, v. 34, n. 3, p.197-204, 2005.

- GUGLIEMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in south and Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 109-119, 1995.
- KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.
- KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R.; JESUS, E. F.; SEMPREGOM, D. V. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, n. 7, p. 747-752, 1987.
- KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanosomose dos bovinos**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1998, 157p.
- KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; ARAUJO. Tristeza parasitária dos bovinos quando vacinar é preciso. **A Hora Veterinária**, v. 23, n. 137, p. 26-30, 2004.
- KUTTLER, K.L.; ZAUGG, J.L.; JOHSON, L.W. Serologic and clinical responses of preimmunized, vaccinated and previously infected cattle to challenge exposure by different *Anaplasma marginale* isolates. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n.11, p.2223-2226, 1984.
- LINHARES, G.F.C.; SANTANA, A.P.; LAUERMAN, H.L.; MADRUGA, C.R. Assessment of primers designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 27-32, 2002.
- LOSOS, G.J. **Infectious tropical diseases of domestic animals**. New York: Longman Scientific & Technical, 1986. 138 p.
- MADRUGA, C. R.; KESSLER, R. H.; GOMES, A.; SCHENK, M. A. M.; ANDRADE, D. F. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, p. 135-142, 1985.
- MAHONEY, D.F.; MIRRE, G.B. A note on the transmission of *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*) by the one-host tick *Boophilus microplus*. **Research in Veterinary Science**, n. 26, p. 253-254, 1979.
- MENDONÇA, C.L.; VIEIRA, D.; KOHAYAGAWA, A.; SCHENK, M.A.M.; MADRUGA, C.R.; AFONSO, J.A.B. Clinical and hematological evaluation of Nelore calves experimentally infected with isolates of *Babesia bigemina* from the southeastern, northeastern and northern regions of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 52-60, 2003.
- RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; GUIMARÃES, A.M. et al. Transmissão congênita de anaplasmoses bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 47, v. 3, p. 297-304, 1995.
- RISTIC, M. Anaplasmosis. In: RISTIC, M.; McINTYRE, L. **Diseases of cattle in the tropics: economic and zoonotic relevance**. v. 6. The Hague: Martinus Nijhoff Publishers, 1981. p. 327-344.
- RISTIC, M.; KREIER, J.P. Family Anaplasmataceae. In: BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974. p. 906-914.
- RUIZ, P.M.G.; LIMA, J.D.; PASSOS, L.M.F. Serological profile of *Babesia bovis* in animals submitted to preimmunization. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 81, n. 1, p. 45-48, 1999.
- SANTOS, H. Q.; MADRUGA, C. R.; LINHARES, G. F. C. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia, pela reação de imunofluorescência indireta e Elisa. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 8, n. 1, p. 31-34, 2001.
- SCHENK, M. A. M.; KESSLER, R. H.; MIGUITA, M.; HONER, M. R. Desenvolvimento de cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*: III. teste crítico com bovinos Bangus. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, n. 2. p. 75-78, 1993.
- SWAI, E.S.; FRENCH, NP; BEAUCHAMP, G. FITZPATRICK, J.L.; BRYANT, M.J.; KAMBARAGE, D; OGDEN, N.H. A longitudinal study of sero-conversion to tick-borne pathogens in smallholder dairy youngstock in Tanzania. **Veterinária Parasitológica**, v. 131, n.1-2, p.129-237, 2005.
- TODOROVIC, R.A.; LONG, R.F. Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia* spp. Infections in Colombia cattle. **Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 27, p.169-181, 1976.
- VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M. Diagnóstico em anaplasmoses bovina. **Ciência Animal**, Santa Maria, v. 31, n.2, p. 361-368, 2001.