

TESTE CRÍTICO DE VACINAS ATENUADAS DE *BABESIA BOVIS*, *B. BIGEMINA* E *ANAPLASMA MARGINALE* EM NOVILHAS DA RAÇA HOLANDESA.

R. H. KESSLER¹, A. M. S. SACCO², C. R. MADRUGA¹, M. MÜLLER³ & M. MIGUITA¹.

(1) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), BR 262, km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970, Campo Grande, MS. E-mail: kessler@cnpge.embrapa.br; (2) EMBRAPA, Centro de Pesquisa Pecuária dos Campos Sul Brasileiros (CPPSUL); (3) Médico Veterinário, SEPACO, Campo Grande, MS

SUMÁRIO: As cepas atenuadas de *Babesia bovis* e *B. bigemina*, desenvolvidas no Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), e a cepa atenuada de *Anaplasma marginale*, desenvolvida na Universidade de Illinois, EUA, foram testadas em 291 novilhas da raça Holandesa, divididas em cinco grupos de seis novilhas e um grupo de 261 novilhas. O grupo 1 foi vacinado com *B. bovis*, o grupo 2, com *B. bigemina*, o grupo 3, com *B. bovis* e *B. bigemina*, o grupo 4, com *A. marginale* e os grupos 5 e 6 foram vacinados com os três organismos. O inóculo vacinal foi de 10^7 eritrócitos parasitados (EP). Os grupos 1 a 4 foram desafiados com 5×10^7 EP dos respectivos isolados virulentos, e os grupos 5 e 6 foram desafiados através do carrapato, no campo. As cepas foram inócuas para esta categoria animal e promoveram taxas de proteção de 100%, para as três espécies, no desafio por agulha, e 97,0, 98,9 e 100% para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, respectivamente, no desafio pelo carrapato.

PALAVRAS - CHAVE: bovino, babesiose, anaplasmosse, vacinas.

INTRODUÇÃO

A babesiose e a anaplasmosse permanecem, através dos anos, entre os principais problemas sanitários dos rebanhos bovinos de carne e leite, nos países de clima tropical e subtropical. Sendo doenças transmitidas pelos carrapatos (CONNEL & HALL, 1972; CONNELL, 1974; MAHONEY, 1977; SUTHERST *et alii*, 1979; MASON & NORVAL, 1981), paradoxalmente, os avanços no controle dos vetores, sem lograr a erradicação, têm intensificado este problema, na medida que ampliam as áreas de instabilidade endêmica.

Os maiores avanços na profilaxia destas doenças têm sido alcançados pelos pesquisadores australianos, utilizando vacinas atenuadas na prevenção de surtos em áreas de instabilidade endêmica (CALLOW & MELLORS, 1966; CALLOW, 1977; DALGLIESH *et alii*, 1981). Esta tecnologia tem se expandido para outros continentes e tem sido utilizada em Israel (PIPANO *et alii*, 1986), no Paraguai (PAYNE *et alii*,

1990), na Argentina (GUGLIELMONI *et alii*, 1988; MANGOLD *et alii*, 1990), no Uruguai (NARI *et alii*, 1979) e no Brasil (ARTECHE, 1992). Mais recentemente, a pesquisa tem se dirigido para a obtenção de antígenos definidos com o objetivo de, através de tecnologia de ADN recombinante, desenvolver vacinas livres de organismos vivos e contaminantes celulares do hospedeiro, de fácil produção industrial e que promovam uma imunidade estéril e de longa duração (MORRISON, 1989). Entretanto, esta tecnologia depende de pesados investimentos, a médio e longo prazos, em recursos humanos e equipamentos. Como os prejuízos econômicos causados pela babesiose e anaplasmosse são cada vez maiores e a situação, na maior parte do território latino-americano, é endêmica para o carrapato *Boophilus microplus*, cuja erradicação é, praticamente, inviável, justifica-se o uso de cepas atenuadas como solução eficiente e econômica para o controle de surtos e perdas, por morbidade e mortalidade, em áreas de instabilidade endêmica em nossos países, ou na prevenção da doença em animais importados de áreas livres.

Em trabalho anterior foram apresentados resultados de vacinação e desafio por agulha, em novilhos da raça Hereford em regime de campo (KESSLER *et alii*, 1987b). O objetivo do presente trabalho foi observar as reações às cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* e a taxa de proteção frente ao desafio por agulha e pelo carrapato, no campo, de novilhas da raça Holandesa criadas em região livre destes hemoparasitos.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das cepas: Para a imunização contra a babesiose foram utilizadas as cepas GC 4974-83, lote 7295, correspondente à 18ª passagem rápida de *B. bovis*, em bezerros esplenectomizados, e GC 5118-83, lote 7257, correspondente à 6ª passagem lenta de *B. bigemina*, em bezerros intactos. Estas cepas foram isoladas, atenuadas e preservadas conforme descrito anteriormente (KESSLER *et alii*, 1987a, 1987b). Para a imunização contra a anaplasmose foi utilizada a cepa atenuada de *A. marginale*, lote 933, desenvolvida por RISTIC *et alii* (1968).

Animais experimentais: Foram utilizadas 291 novilhas da raça Holandesa, puras de origem, com 11 a 22 meses de idade, sendo cinco com 4 a 5 meses de gestação, importadas dos EUA.

Local de execução: O experimento foi realizado em uma fazenda do município de Terenos, MS, instalada para a produção de leite tipo A. A região é endêmica para o carrapato *B. microplus*, ocorrendo três a quatro gerações por ano (HONER & GOMES, 1990).

Delineamento experimental: Trinta novilhas foram distribuídas, ao acaso, em cinco grupos de seis novilhas cada. O grupo 1 foi inoculado com *B. bovis*; o grupo 2, com *B. bigemina*; o grupo 3, com *B. bovis* e *B. bigemina*, simultaneamente; o grupo 4, com *A. marginale* e o grupo 5, com *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, simultaneamente. Os grupos 1, 2 e 3 foram desafiados por injeção subcutânea (por agulha), 30 dias após a vacinação, com os respectivos isolados virulentos. O grupo 4 foi desafiado, também, por agulha, 60 dias após a vacinação, com um isolado local de *A. marginale*. O grupo 5 foi exposto ao desafio pelo carrapato, no campo, 102 dias após a vacinação. As restantes 261 novilhas, constituindo o grupo 6, foram vacinadas do mesmo modo que o grupo 5 e desafiadas, 60 dias após a vacinação, pelo carrapato, no campo. O inóculo vacinal foi de 10^7 eritrócitos parasitados (EP) para as babesias, por via subcutânea, e de 1 ml para o *A. marginale*, de acordo com a recomendação do laboratório de origem, também, por via subcutânea. O inóculo de desafio por agulha foi de 5×10^7 EP para todas as espécies.

As ampolas contendo as cepas atenuadas e os isolados virulentos foram descongeladas em banho de gelo, imediatamente antes da aplicação. Os animais dos grupos 1 a 5 foram examinados, clínica e laboratorialmente, três vezes por semana, por um período de 129 dias, sendo 60 dias na fase de reação vacinal e 69 dias na fase de reação ao desafio. Foram anotadas: temperatura retal, hematócrito e porcentagem de parasitemia. Uma vez por semana foi colhido soro para acompanhamento da resposta imunológica através do teste de imunofluorescência indireta (IFI) (MADRUGA *et alii*, 1986). As restantes 261 novilhas do grupo 6 foram mantidas sob observação visual, sendo examinados somente os animais que apresentaram sinais clínicos. Os animais dos grupos 1 a 4 foram vacinados, posteriormente à fase de desafio por agulha, com as demais cepas atenuadas e, após o período de reação vacinal, expostos ao carrapato. Todos os animais permaneceram no estábulo durante as fases de reação vacinal e de desafio por agulha, sendo soltos no campo, posteriormente, para sofrerem o desafio através do carrapato. Para a análise dos resultados utilizou-se o teste de Duncan.

RESULTADOS

Durante o período de reação vacinal houve um aumento de temperatura retal significativo ($p < 0,05$), nos grupos 1 (vacinado com *B. bovis*), 3 (vacinado com *B. bovis* e *B. bigemina*) e 4 (vacinado com *A. marginale*), com relação a temperatura inicial (Tabelas 1 e 2). Nos demais grupos a variação

Tabela 1- Médias das variações de temperatura (T) e hematócrito (Ht), percentagem de parasitemia (PP) e soroconversão (IFI) dos grupos 1, 2, 3 e 5, vacinados somente com *Babesia bovis*, somente com *B. bigemina*, com *B. bovis* e *B. bigemina*, e com *B. bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*, respectivamente. Os grupos 1, 2 e 3 foram desafiados por agulha com os respectivos isolados virulentos e o grupo 5, foi desafiado pelo carrapato, no campo (fase de reação às babesias).

Parâmetros	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 5
T RV	0,6 ^b	0,6 ^a	0,7 ^b	0,3 ^a
T RD	0,5 ^b	0,6 ^a	0,4 ^{ab}	0,3 ^a
Ht RV	-7,1 ^a	-7,2 ^a	-17,2 ^b	-15,6 ^b
Ht RD	-1,8 ^a	-10,7 ^a	2,5 ^a	-4,0 ^{ab}
PP RV B. bo	0,00	-	<0,01	<0,01
PP RD B. bo	0,00	-	0,00	0,00
PP RV B. bi	-	0,03	0,20	0,04
PP RD B. bi	-	0,02	0,00	0,00
IFI RV B. bo	5/5	-	6/6	4/6
IFI RD B. bo	5/5	-	6/6	4/6
IFI RV B. bi	-	4/6	6/6	5/6
IFI RD B. bi	-	5/6	6/6	5/6

Valores com letras diferentes, em sobrescrito, são estatisticamente diferentes. RV = reação vacinal; RD = reação ao desafio; IFI = teste de imunofluorescência indireta B. bo = *B. bovis*; B. bi = *B. bigemina*

Tabela 2 - Médias das variações de temperatura (T) e hematócrito (Ht), percentagem de parasitemia (PP) e soroconversão (IFI) dos grupos 4 e 5 vacinados somente com *Anaplasma marginale* e com *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, respectivamente, e desafiados pelo carrapato, no campo (fase de reação ao *A. marginale*).

Parâmetros	Grupo 4	Grupo 5
T RV	0,9 ^b	0,1 ^a
T RD	0,3 ^{ab}	-0,2 ^a
Ht RV	-29,9 ^b	-29,2 ^b
Ht RD	3,4 ^a	2,3 ^a
PP RV	2,88	2,3
PP RD	<0,01	0,0
IFI RV	6/6	6/6
IFI RD	6/6	6/6

Valores com letras diferentes, em sobrescrito, estatisticamente, diferentes. RV = reação vacinal; RD = reação ao desafio; IFI = teste de imunofluorescência indireta.

Tabela 3 - Variações de temperatura (T), hematócrito (Ht) e porcentagem de parasitemia (PP) de 11 novilhas do grupo 6 que apresentaram sintomas clínicos na fase de reação ao desafio pelo carrapato. Dados colhidos no dia da medicação.

Animal nº	T (°C)	Ht (%)	PP <i>B.bovis</i>	PP <i>B.bigemina</i>
353	2,4	46,4	0,03	-
655	2,5	28,6	<0,01	-
575	1,5	64,3	0,2	-
517	2,9	ND	<0,01	-
534	3,2	ND	<0,01	-
410	ND	14,6	<0,01	-
344	ND	46,4	<0,01	-
465	ND	35,7	<0,01	-
427	-0,3	53,6	-	1,3
715	ND	46,4	-	0,6
217*	-1,6	60,7	-	<0,06

* = animal morreu apesar de medicado

ND = não determinado

da temperatura não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). O decréscimo de hematócrito foi significativo ($p<0,05$) somente nos grupos 3, 4 e 5 (tanto na reação às babesias quanto ao *A. marginale*). Comparando-se os grupos entre si, na fase de reação vacinal, o decréscimo do hematócrito foi significativamente maior ($p<0,05$) no grupo 4 (Tabela 2), seguido, pela ordem, pelo grupo 5 (na fase de reação ao *A. marginale*) (Tabela 2), grupos 3 e 5 (na fase de reação às babesias) (Tabela 1) e grupos 1 e 2 (Tabela 1). Durante o período de desafio, as variações de temperatura e hematócrito não foram significativas ($p>0,05$) em nenhum dos tratamentos (Tabelas 1 e 2). Quanto à parasitemia, no grupo 1 não foi detectada parasitemia em lâminas delgadas de sangue periférico, coradas com May-Grünwald-Giemsa, tanto na fase de reação vacinal quanto na de desafio. Entretanto, houve soroconversão em todos os animais, já na fase de reação vacinal. No grupo 2, dois animais apresentaram parasitemias <0,01 e 0,2%, respectivamente, na fase vacinal, e três apresentaram parasitemias <0,01, 0,1 e <0,01%, respectivamente, na fase de desafio. Duas novilhas deste grupo foram negativas no teste de IFI na fase vacinal, sendo que uma delas permaneceu negativa após a fase de desafio. No grupo 3, três novilhas apresentaram parasitemia <0,01% por *B. bovis* e todas apresentaram parasitemia por *B. bigemina* que variou de <0,01 a 1,0%, na fase de reação vacinal. Na fase de desafio não foi detectada parasitemia em lâminas de sangue periférico de nenhum dos animais deste grupo. Todas apresentaram soroconversão, para as duas espécies, na fase de reação vacinal e permaneceram positivas após o desafio. No grupo 4, todas as novilhas apresentaram parasitemia na fase de reação vacinal a qual variou de 0,5 a 5,5%. Na fase de desafio, somente uma apresentou parasitemia <0,01%. Todas apresentaram soroconversão na fase de reação vacinal, permanecendo positivas na fase de desafio. Na fase de reação vacinal, no grupo 5, uma novilha apresentou parasitemia

<0,01% por *B. bovis*, três por *B. bigemina* (<0,01, 0,03 e 0,20%) e todas por *A. marginale* que variou de 0,4 a 5,3%. Nenhum destes animais apresentou parasitemia detectável em lâminas delgadas de sangue periférico, na fase de desafio. Dois animais foram negativos no teste de IFI durante a fase de reação vacinal, tanto para *B. bovis* como para *B. bigemina*, sendo que um deles permaneceu negativo para *B. bigemina* na fase de reação ao desafio. Todas as novilhas foram positivas, no teste de IFI, para *A. marginale* na fase de reação vacinal, permanecendo positivas na fase de desafio. No grupo 6, das 261 novilhas vacinadas com as três espécies, 11 apresentaram sintomas clínicos durante o período de reação ao desafio. Em oito foi detectada parasitemia por *B. bovis* que variou de <0,01 a 0,03%, concorrente com elevação de temperatura de até 3,2 °C e redução de hematócrito de até 64,3%. Três apresentaram parasitemia por *B. bigemina* <0,01, 0,6 e 1,3%, respectivamente, e decréscimo de hematócrito de 60,7, 46,4 e 53,6%, respectivamente. Os dados correspondem à data do exame e da medicação específica (Tabela 3). Nenhuma apresentou *A. marginale* nas lâminas de sangue periférico. Nenhuma destas novilhas havia apresentado sinais clínicos de babesiose ou anaplasmoses durante a fase de reação vacinal.

DISCUSSÃO

As cepas atenuadas de *B. bovis* (lote 7295), *B. bigemina* (lote 7257) e *A. marginale* (lote 933) foram infectivas, promovendo manifestações subclínicas, com variações discretas de temperatura e hematócrito. Esta infectividade é uma característica indispensável às vacinas atenuadas, conforme já enfatizado por CALLOW (1977) e CALLOW & DALGLIESH (1980), para estimular uma resposta imune

completa e duradoura. Os níveis de parasitemia foram baixos, principalmente, nos grupos que receberam vacinação simples por *B. bovis* ou *B. bigemina* (grupos 1 e 2). Já nos grupos vacinados com *A. marginale* os níveis de parasitemia foram mais altos, com, correspondentes, maiores decréscimos do hematócrito. Entretanto, em ambos os casos, os animais responderam subclínicamente à infecção e resistiram assintomaticamente ao desafio, tanto por agulha como através do carrapato, no campo (grupos 4 e 5). Resultados similares foram encontrados por JORGENSEN *et alii* (1989), na Austrália, com cepas atenuadas de *B. bovis* e *B. bigemina*. PAYNE *et alii* (1990), no Paraguai, com cepas atenuadas de *B. bovis* e *B. bigemina* de origem uruguaia, concluíram que as cepas promoveram alta taxa de proteção, entretanto, 16,7% (18/102) dos animais tiveram que ser medicados durante a reação vacinal e 4,9% (5/102) durante a reação de desafio. Estas reações mais intensas na fase de reação vacinal, provavelmente, foram devidas ao fato da vacina, utilizada naquele experimento, não ter sofrido o processo de congelamento o qual pode promover uma diminuição na infectividade. Entretanto, ARTECHE (1992), utilizando cepas da mesma origem, concluiu que a porcentagem de reagentes às vacinas de *Babesia* spp. foi de 0,24% (8/3.381) em bezerros mamando, 0,69% (12/1.732) em machos de sobreano e 0,30% (7/1.777) em fêmeas de sobreano. CORRIER *et alii* (1980), na Colômbia, com cepa atenuada de *A. marginale*, da mesma origem da utilizada neste trabalho, obtiveram médias de parasitemias máximas, em bezerros de 7 a 11 meses de idade, bem mais baixas (0,68% + 0,11) que as encontradas neste trabalho. Isto pode ser devido à diferença de suscetibilidade entre as diferentes categorias dos animais experimentais. EMMERSON *et alii* (1976), em testes de campo da vacina australiana de *B. argentina* (sin. *B. bovis*) com novilhas de 6 meses de idade, de rebanhos parcialmente suscetíveis, encontraram 1,2% de casos clínicos, após o desafio, entre as vacinadas, contra 17,9% entre as não vacinadas. Estes resultados, aparentemente melhores que os obtidos neste trabalho, podem ser devidos a: 1) idade dos animais (6 meses contra 11 a 22 meses); 2) suscetibilidade (rebanho parcialmente suscetível contra rebanho totalmente suscetível). Neste experimento houve uma tendência de reação mais intensa nos grupos vacinados com as duas espécies de *Babesia* em comparação com os grupos vacinados com cada uma das espécies separadamente. Estes resultados indicam que, na vacinação de categorias mais sensíveis (bovinos adultos, gestantes ou em produção) seja mais prudente vacinar contra uma das espécies de cada vez. Os 11 casos clínicos de babesiose ocorridos durante o período de desafio pelo carrapato, no campo, representam 4,1% de falha de imunização (11/267; grupos 5 e 6) o que significa 95,9% de proteção. Considerando-se cada cepa separadamente, a *B. bovis*

promoveu uma proteção de 97,0%, a *B. bigemina*, 98,9% e a *A. marginale*, 100,0%. Com base nos resultados do teste de IFI, durante o período de reação vacinal (4 de 29 novilhas vacinadas não apresentaram soroconversão, portanto, teoricamente poderiam ser consideradas ainda suscetíveis), era esperado um nível de proteção mais baixo (algo em torno de 86,2%) para os animais dos grupos 5 e 6, durante a fase de reação ao desafio, no campo. Considerando-se que um animal do grupo 2 e um do grupo 5 permaneceram negativos no teste de IFI para *B. bovis* e *B. bigemina*, mesmo após o desafio por agulha, no primeiro caso, e pelo carrapato, no segundo caso, podemos supor que o teste sorológico não foi sensível o suficiente para detectar baixos níveis de anticorpos, provavelmente existentes no soro destes animais ou que os animais, apesar de não responderem sorologicamente à infecção eram, naturalmente, mais resistentes a estes hemoparasitos. O diagnóstico direto, através de lâminas delgadas de sangue periférico, não é sensível o suficiente, segundo MAHONEY & SAAL (1961), para detectar parasitemia muito baixas. As alterações do hematócrito de um dos animais do grupo 5 que foi negativo no exame de lâminas de sangue e no teste de IFI, podem ter sido causadas pelos organismos inoculados, sem contudo terem sido detectados pelos métodos de diagnóstico utilizados. No presente trabalho, em virtude do alto valor zootécnico e alto custo das novilhas, não foi possível manter um grupo controle, não vacinado, o que prejudica, em parte, a análise dos resultados. Entretanto, em experimento anterior (KESSLER *et alii*, 1987b) todos os novilhos da raça Hereford, de dois anos de idade, desafiados com os mesmos isolados de *B. bovis* e *B. bigemina* sofreram doença aguda, tendo que ser medicados. A ocorrência de casos clínicos neste experimento e relatados anteriormente (KESSLER *et alii*, 1983) comprovam a alta virulência das infecções naturais por estes hemoparasitos nesta região. As conclusões foram as seguintes:

1. A infectividade das cepas, baseados na soroconversão, foi de 83,3% para *B. bigemina* (15/18 novilhas vacinadas); 88,9% para *B. bovis* (16/18 novilhas vacinadas) e 100% para *A. marginale*.
2. As taxas de inocuidade e de proteção frente ao desafio por agulha foram de 100% para as três cepas.
3. As taxas de proteção contra o desafio pelo carrapato, no campo, foram de 97,0% para *B. bovis*, 98,9% para *B. bigemina* e 100% para *A. marginale*.
4. As cepas testadas, nas condições deste experimento, foram eficientes na profilaxia da tristeza parasitária dos bovinos.

AGRADECIMENTOS

Ao empresário Francisco Antônio Maia da Cunha pela confiança e apoio, colocando seus animais, material de consumo e veículo à disposição do experimento. Ao Prof. Dr. Miodrag Ristic pelo fornecimento da vacina atenuada de *Anaplasma marginale*. Ao Dr. João Batista E. Curvo e Dr. Michael Robin Honer pela colaboração na análise dos resultados.

SUMMARY

The attenuated strains of *Babesia bovis* and *B. bigemina*, developed at EMBRAPA-CNPQC, and the attenuated strain of *Anaplasma marginale*, developed at the University of Illinois, USA, were tested in 291 Holstein heifers divided in five groups of six and one group of 261 heifers. Group 1 was vaccinated with *B. bovis*, group 2 with *B. bigemina*, group 3 with *B. bovis* and *B. bigemina*, group 4 with *A. marginale* and groups 5 e 6 with the three organisms simultaneously. The vaccine dose was 10^7 parasitized erythrocytes (PE). Groups 1 to 4 were challenged with 5×10^7 PE of the virulent isolates and groups 5 and 6 were field-challenged with the cattle tick. The vaccinal strains were innocuous for this category of animals and promoted protection rates of 100% for the three species of parasites when needle-challenged. When field-challenged by the tick, the protection rates were 97.0, 98.9 and 100% for *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale*, respectively.

KEY WORDS: bovine, babesiosis, anaplasmosis, vaccines.

REFERÊNCIAS

- ARTACHE, C.C.P. (1992). Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil. Uso das cepas atenuadas de *Babesia* spp. e de cepa heteróloga de *Anaplasma*. *A Hora Veterinária*, 66: 39-42.
- CALLOW, L.L. (1997). Vaccination against bovine babesiosis. In: MILLER, I.H.; PINO, J.A. & McKELVEY JUNIOR, J.J. *Immunity to blood parasites of animals and man*. Plenum Press, New York. p.121-149.
- CALLOW, L.L. & DALGLIESH, R.J. (1980). The development of effective, safe vaccination against babesiosis and anaplasmosis in Australia. In: JOHNSTON, L.A.Y. & COOPER, M.G. *Ticks and tick-borne diseases*. Australian Veterinary Association, Sidney. p.4-8. Proc. 56th Annu. Conf. Aust. Vet. Assoc., 1979, Townsville.
- CALLOW, L.L. & MELLORS, L.T. (1966). A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomised calves. *Australian Veterinary Journal*, 42: 464-465.
- CONNEL, M. & HALL, W.T.K. (1972). Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. *Australian Veterinary Journal*, 48: 477.
- CONNEL, M.L. (1974). Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Science*, 81: 185-193.
- CORRIER, D.E.; VIZCAINO, O.; CARSON, C.A.; RISTIC, M.; KUTTLER, K.L.; TREVINO, G.S. & LEE, A.J. (1980). Comparison of three methods of immunization against bovine anaplasmosis: An examination of postvaccinal effects. *American Journal of Veterinary Research*, 41: 1062-1065.
- DALGLIESH, R.J.; CALLOW, L.L.; MELLORS, L.T. & MCGREGOR, W. (1981). Development of a highly infective *Babesia bigemina* vaccine of reduced virulence. *Australian Veterinary Journal*, 57: 8-11.
- EMMERSON, F.R.; KNOTT, S.G. & CALLOW, L.L. (1976). Vaccination with *Babesia argentina* in 5 beef herds in south-eastern Queensland. *Australian Veterinary Journal*, 52: 451-454.
- GUGLIELMONE, A.A.; ABDALA, A.A.; PIPANO, E.; MANGOLD, A.J.; ZURBRIGGEN, M.A.; ANZIANI, O.S.; AGUIRRE, D.H.; GAIDO, A.B. & RIOS, L.G. (1988). Evaluación de la infectividad de una vacuna contra anaplasmosis bovina elaborada en base a *Anaplasma centrale* congelada en nitrógeno líquido. *Rev. Vet. Med.*, 69: 298-303.
- HONER, M.R. & GOMES, A. (1990). O manejo integrado de mosca-dos-chifres, berne e carrapato em gado de corte. EMBRAPA-CNPQC, Campo Grande. 60p. (EMBRAPA-CNPQC. Circular Técnica, 22).
- JORGENSEN, W.K.; DE VOS, A.J. & DALGLIESH, R.J. (1989). Infectivity of cryopreserved *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale* for cattle after thawing, dilution and incubation at 30°C. *Veterinary Parasitology*, 31: 243-251.
- KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R.; SCHENCK, M.A. & RIBEIRO, O.C. (1983). Babesiose cerebral por *Babesia bovis* (Babés, 1888 Starcovici 1893) em bezerros, no Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 18: 931-935.
- KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R.; JESUS, E.F. de & SEMPREGOM, D.V. (1987a). Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 22: 747-752.
- KESSLER, R.H.; SACCO, A.M.S.; JESUS, E.F. de & MADRUGA, C.R. (1987b). Desenvolvimento de cepas vivas atenuadas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*: Teste preliminar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 22: 1225-1230.

(Received 27 October 1997, Accepted 2 December 1997)