

Condição imunológica de bovinos das raças Holandesa e Nelore frente a *Babesia bovis* e *B. bigemina* em duas regiões do Estado de São Paulo¹

Lourdes A.Z. D'Andrea^{2*}, Izidoro F. Sartor³, Cláudio R. Madruga⁴, Selma B.Z. Freitas⁵, Lúcio B. Kroll⁶ e Sérgio N. Kronka⁷

ABSTRACT. D'Andrea L.A.Z., Sartor I.F., Madruga C.R., Freitas S.B.Z., Kroll L.B. & Kronka S.N. 2005. [Immunological condition of cattle in Holstein and Nelore breed in regard to *Babesia bovis* and *B. bigemina* in two regions of the State of São Paulo.] Condição imunológica de bovinos das raças Holandesa e Nelore frente a *Babesia bovis* e *B. bigemina* em duas regiões do Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 26(2):74-78.. Seção de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Presidente Prudente, Av. Cel José Soares Marcondes 2357, Presidente Prudente, SP 19013-050, Brazil. E-mail: zampieri@ial.sp.gov.br

The immunological reply of a population to an infectious agent can vary between races and handling of this population. Regional research becomes important, in order to know the interrelation between the agent and its host. In this way, the occurrence of immunoglobulins of class G, anti-*Babesia bovis* and anti-*Babesia bigemina* in the Nelore (*Bos indicus*) and Hostein breed (*Bos taurus*), was investigated in two regions of the State of São Paulo, 300 km distant from each other. For the indirect method of ELISA, 1,161 bovine serum samples were tested. The medium frequencies of antibodies showed that in the two regions exists an enzootic stability for *B. bovis* in both breeds studied; even so there was a tendency of marginal area for the Nelore breed in one of the regions. Regarding *B. bigemina*, in both regions exists enzootic stability for the Hostein and enzootic instability for the Nelore breed. Therefore, acute cases of the disease or specific outbreaks by *B. bigemina* infection in the Nelore breed may occur in these regions.

INDEX TERMS: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, ELISA, cattle, immunological condition.

RESUMO. A resposta imunológica de uma população frente a um agente infeccioso pode variar entre as raças e o manejo dessa população. Dessa maneira, torna-se relevante a pesquisa regional, visando o conhecimento da inter-relação do agente com seu hospedeiro. Partindo desses pressupostos, investigouse a ocorrência de imunoglobulinas da classe IgG, anti-*Babesia*

bovis e anti-*B. bigemina* nas raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*), em duas regiões do Estado de São Paulo, distantes a 300 km. Pelo método de ELISA indireto, foram testadas 1.161 amostras de soro de bovinos. As frequências médias de anticorpos mostraram que ambas as regiões se encontram em situação de estabilidade enzoótica para *B. bovis* para ambas as raças estudadas, embora haja tendência para área marginal na região de Presidente Prudente para raça Nelore. No referente a *B. bigemina* ambas as regiões são de estabilidade enzoótica para a raça Holandesa e de instabilidade enzoótica para a raça Nelore. Essa constatação é um alerta sanitário, pois casos agudos da doença ou surtos específicos de *B. bigemina* na raça Nelore podem ocorrer nessas regiões.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, ELISA, bovino, condição imunológica, Brasil.

INTRODUÇÃO

As babesioses, cujos agentes etiológicos são *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, são patógenos transmitidos, principalmente, pelas for-

¹ Recebido em 20 de fevereiro de 2005.

Aceito para publicação em 17 de outubro de 2005.

² Seção de Biologia Médica, Laboratório Regional de Presidente Prudente, Instituto Adolfo Lutz, Av. Cel José Soares Marcondes 2357, Presidente Prudente, SP 19013-050, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: zampieri@ial.sp.gov.br

³ Curso de Pós-Graduação, Unoeste/Unesp, Rodovia Raposo Tavares Km 572, Presidente Prudente, SP 19067-175.

⁴ Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, Embrapa, Caixa Postal 154, Campo Grande, MS 79002-970.

⁵ Pós-Graduanda, Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Av. José Bongiovani 700, Presidente Prudente, 19050-900 SP.

⁶ Docente Pós-Graduação, Unoeste, São Paulo, SP.

⁷ Docente Pós-Graduação, Unoeste, São Paulo, SP.

mas jovens do carrapato *Boophilus microplus*, constituindo-se entre os principais problemas sanitários dos rebanhos bovinos de corte e de leite (Wright & Goodger 1988). Essas enfermidades provocam grandes prejuízos à criação bovina não apenas pela mortalidade que causam, mas também pela redução na produção de carne e leite, além de custos indiretos com medidas preventivas e tratamento dos animais (Araújo et al. 1998). Além da importância destacada na pecuária, essas enfermidades constituem-se também em zoonoses (Suarez et al. 1997, Kurt & Girginkardesler 2001).

Nas áreas de estabilidade enzoótica os efeitos dessas doenças são minimizados em decorrência da exposição precoce e gradativa dos animais aos agentes, logo após o nascimento, possibilitando o desenvolvimento de imunidade (Corrier et al. 1978). Entretanto, quando animais provenientes de áreas de instabilidade enzoótica são alocados em outras, consideradas de estabilidade enzoótica, essas enfermidades se manifestam de forma aguda, podendo levar o animal à morte ou a transtornos graves, como o abortamento.

Segundo Madruga et al. (2000), os estudos de prevalência desses hemoparasitas são importantes para o conhecimento da condição epidemiológica de uma região, indicando sua situação se há instabilidade ou estabilidade enzoótica e, conseqüentemente, se há ou não necessidade de adoção de medidas sanitárias, quando se depara com indivíduos enfermos ou em surtos da doença.

Também uma área de estabilidade pode se tornar instável por certos procedimentos do manejo como, por exemplo, excesso de combate ao *B. microplus* ou mesmo quando sua população é naturalmente escassa, provocando com isso um baixo inóculo ao agente e conseqüentemente baixa imunidade.

Por ser um método prático, sensível e específico, a imunoadsorção enzimática (ELISA) é o que confere melhores resultados para o levantamento da situação epidemiológica (Araújo et al. 1998). Tendo em vista a importância das babesioses nas regiões tropicais e, pela escassez de pesquisas de prevalência desses hemoparasitas no Estado de São Paulo, este trabalho teve por objetivo estudar a situação imunológica de *B. bovis* e *B. bigemina* em bovinos das espécies *B. taurus* e *B. indicus*, nas regiões de Presidente Prudente e Avaré, São Paulo, utilizando-se o método de ELISA indireto.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

O levantamento foi realizado com amostras de soros de bovinos adultos de dezoito propriedades da região de Avaré, localizada a sudoeste do Estado de São Paulo, na longitude 48°55' e latitude 23°06'. Essa região compreende uma área de 1.219,6 km² e possui uma população estimada de 373.958 bovinos. O clima é quente, com temperaturas médias de 18°C.

Também foram utilizados animais de 15 propriedades da região de Presidente Prudente. A região é localizada no extremo oeste do Estado de São Paulo, na longitude 22°07' e latitude 51°22', compreendendo uma área de 9.556,56 km². Essa região possui uma população estimada de 2.400.000 bovinos. O clima é tropical seco e úmido, com temperaturas médias de 28°C. A distância compreendida entre as duas áreas estudadas é de aproximadamente 300 km.

Animais e coleta de material

No Quadro 1 estão contidos os números de propriedades e de repetições.

Quadro 1. Número de propriedades e de bovinos da raça Holandesa e Nelore, nas regiões de Avaré e Presidente Prudente, São Paulo

Municípios	Nº de propriedades		Nº de bovinos analisados	
	Raças		Raças	
	Holandesa	Nelore	Holandesa	Nelore
Avaré	11	7	245	245
Presidente Prudente	10	5	317	354
Total	21	12	562	599

Antígeno

Os lisados de *Babesia bovis* e *B. bigemina* foram obtidos de bezerras criados no Mato Grosso do Sul em áreas de isolamento, segundo Kessler & Schenk (1998) e, cedidos pelo Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte em Campo Grande, MS.

Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireta

O ensaio foi desenvolvido a partir da solubilização de antígenos de merozoítos semipurificados, por centrifugação diferencial a partir de hemácias parasitadas, obtidas segundo técnica descrita por Madruga et al. (1997) para *B. bigemina* e por Madruga et al. (2000) para *B. bovis*. Realizou-se o ensaio de ELISA indireto, para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina*, utilizando-se microplacas 96 orifícios (Costar 3590) para titulação. As microplacas foram sensibilizadas com extrato total diluído a 1:2.000 para *B. bovis* e a 1:4.000 para *B. bigemina* em tampão carbonato/bicarbonato (Na₂CO₃ 200mM, NaHCO₃ 199mM) pH 9,2 (100µl /poço), que foram incubadas durante 4 horas a 4°C. Quando não utilizadas de imediato, as placas foram armazenadas a temperaturas de -70°C até o momento de sua utilização. Em seguida, submetidas a cinco lavagens com PBS "tween" 20 a 0,1% (PBST) (Na₂HPO₄·2H₂O 10mM, NaHPO₄·2H₂O 6,4mM, NaCl 99mM) pH 7,2. Foram distribuídos os soros controle positivo alto, negativo e testes, diluídos a 1:1.000 em PBST, e controle positivo fraco diluído a 1:3.000 em PBST (100µl /poço). As microplacas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 45 minutos, sendo efetuadas cinco lavagens, conforme descrito anteriormente. Em seguida, adicionados 50µl/poço de imunoglobulina de coelho anti-IgG bovina, conjugada com fosfatase alcalina (Sigma A - 0705), diluída a 1:12.000 em PBST para *B. bovis* e 1:15.000 em PBST para *B. bigemina*. As placas novamente incubadas em câmara úmida, a 37°C por 30 minutos e depois lavadas 10 vezes com PBST. O substrato p-nitrofenil fosfato "fast" (Sigma N - 2770) foi diluído em 5mL de tampão (5mL de H₂O deionizada dissolvido com uma pastilha de tampão "fast") foi adicionado em volume de 50 µl/poço. A reação foi bloqueada após 30 minutos com NaCl 0,2 M (100 µl/poço). A leitura dos resultados foi realizada em espectrofotômetro multicanal para microplacas de 96 orifícios, com filtro de 405nm, em absorbância e os valores da densidade óptica (D.O.) corrigidos com a aplicação da seguinte fórmula para o fator de ajuste (F):

$$F = \frac{PO - NO}{Pt - Nt}$$

Onde: F = Fator de ajuste da DO, PO = Média das DOs de soros controle positivo do teste de referência padrão, NO = Média das DOs de soros controle negativo do teste de referência padrão, Pt = Média das DOs de soros controle positivo da placa teste, Nt = Média das DOs de soros controle negativo da placa teste.

Para o ELISA a linha de corte ("cut-off") foi estabelecida usando a média das DOs de 20 soros de animais livres de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* realizados em duplicatas, utilizando-se a mesma metodologia empregada para análise das amostras, somada a três desvios padrões. O "cut-off" padrão para *B. bovis* foi de 0,096 e para *B. bigemina* foi de 0,114

O "cut-off" de cada placa foi estabelecido da mesma forma que o "cut-off" padrão, utilizando-se cinco soros de animais livres de infecção por *Babesia* spp, em duplicatas, cujas médias das DOs foram corrigidas pela fórmula de ajuste somada a três desvios padrões. Para maior confiança da análise dos resultados, calculou-se a média entre "cut-off" da placa e o "cut-off" padrão, sendo este valor utilizado para interpretar os valores após o ajuste. Foi considerada amostra positiva quando o valor em DO foi maior ou igual à média do valor do "cut-off".

Análise estatística

Utilizou-se a metodologia de análise descritiva dos dados por região, por raça e por propriedades, considerando-se os dois agentes, *B. bovis* e *B. bigemina*. Foi calculada a porcentagem média dos soros reagentes e não reagentes para as respectivas babesias, de acordo com as categorias acima descritas, uma vez que as comparações foram feitas com os limites críticos de 0,75 a fim de verificar se a região é de estabilidade enzoótica ou não. A análise estatística foi feita baseada no teste "t de Student", a 5% de probabilidade para comparação de diferenças entre duas médias.

RESULTADOS

A análise soro-epidemiológica das 1.161 amostras de soro encontra-se nos Quadros 2 e 3.

O Quadro 2 mostra que a raça Nelore se apresenta instável para a *B. bigemina*.

O Quadro 3 mostra que embora haja estabilidade enzoótica para um mesmo parasita nas diferentes regiões, pode haver diferenças significativas na ocorrência de anticorpos entre elas.

Quadro 2. Distribuição da soroprevalência de cada região segundo agente espécie, raça, números de bovinos e condição imunológica, considerando-se como estabilidade enzoótica áreas com frequência de anticorpos $\geq 75\%$

Agente	Raça	Nº de bovinos	Município	Soroprevalência (%)
<i>Babesia bovis</i>	Holandesa	245	Avaré	90,12
		317	Pres. Prudente	96,50
	Nelore	245	Avaré	92,98
354		Pres. Prudente	78,08	
<i>Babesia bigemina</i>	Holandesa	245	Avaré	81,80
		317	Pres. Prudente	92,55
	Nelore	245	Avaré	67,45
354		Pres. Prudente	65,77	

Quadro 3. Diferenças nas taxas de anticorpos anti *Babesia bovis* e *B. bigemina* (ELISA) nos rebanhos Holandês e Nelore

Comparações				\hat{m}_1 (%)	\hat{m}_2 (%)	Teste t
<i>Babesia bovis</i>	1 - Avaré Holandês	vs	2 - Avaré Nelore	90,12	92,98	- 0,45 ^{NS}
	1 - Avaré Holandês	vs	2 - P. Pte Holandês	90,12	96,50	- 1,21 ^{NS}
	1 - P. Pte Holandês	vs	2 - P. Pte Nelore	96,50	78,08	3,28 *
	1 - Avaré Nelore	vs	2 - P. Pte Nelore	92,98	78,08	2,22 *
<i>Babesia bigemina</i>	1 - Avaré Holandês	vs	2 - Avaré Nelore	81,80	67,45	1,13 ^{NS}
	1 - Avaré Holandês	vs	2 - P. Pte Holandês	81,80	92,55	- 1,23 ^{NS}
	1 - P. Pte Holandês	vs	2 - P. Pte Nelore	92,55	65,77	7,72 *
	1 - Avaré Nelore	vs	2 - P. Pte Nelore	67,45	65,77	0,17 ^{NS}
1 - <i>B. bovis</i> vs 2 - <i>B. bigemina</i>			Avaré Holandês	90,12	81,80	0,97 ^{NS}
			Avaré Nelore	92,98	67,45	2,43 *
			P. Pte Holandês	96,50	92,55	1,22 ^{NS}
			P. Pte Nelore	78,08	65,77	2,14 ^{NS}

^{NS} Não significativo a 5% de probabilidade.

* Significativo a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Soroprevalência entre *Babesia bovis* e *B. bigemina*

Para efeito de classificação das áreas utilizou-se os critérios de Mahoney & Rosse (1972), Mahoney (1975), Smith (1980) e Leite et al. (1989) os quais caracterizam como estabilidade enzoótica as áreas cujos rebanhos possuem frequência de anticorpos acima de 75%, áreas de instabilidade enzoótica, aquelas cujos rebanhos apresentam frequência de anticorpos inferiores a 75%; e, áreas marginais aquelas cujas frequências de anticorpos estão muito próximas do limite. Como o experimento demonstrou haver diferença significativa entre raças de *B. taurus* e *B. indicus*, levou-se esse fator em consideração na ordem de discussão.

Quando comparadas ambas as espécies, *Babesia bovis* e *B. bigemina* (Quadros 2 e 3) constata-se um maior número de animais com anticorpos anti-*B. bovis* em ambas as regiões que se enquadram totalmente como áreas de estabilidade enzoótica. A mesma situação não ocorreu para *B. bigemina*, onde áreas de instabilidade enzoótica foram constatadas em ambos os municípios para a raça Nelore. Também nesses quadros fica evidenciado que os rebanhos Nelores possuem menor frequência de anticorpos que os rebanhos Holandeses. Esse fato poderia ser justificado no desenvolvimento da relação entre transmissão do parasito e o hospedeiro. Sabe-se que *B. bovis* é transmitida pelo estágio larval de *B. microplus* e que *B. bigemina* é transmitida pelos estágios de ninfa a adulto (Kessler & Schenk 1998). A rejeição maior do hospedeiro frente a *B. microplus* está compreendida nas 24 primeiras horas após a infestação constituindo-se assim este período, em uma fase crítica para a sobrevivência de *B. microplus* (Bennett 1974). Nesse período, pode ocorrer rejeição de 30% a 80% (Wagland 1979), com algumas raças resistentes rejeitando acima de 90% de larvas (Roberts 1968). Kemp et al. (1976) constataram que também mais tempo é gasto pelas larvas para a fixação em animais de alta resistência prejudicando a instalação da babesia. As raças inclusas na espécie de *B. indicus* são citadas como sendo as de maior resistência a *B. microplus* (Willadsen 1986, Sartor et al. 1992) devido a eficiência de sua auto-limpeza, eliminando a maioria das larvas, diminuindo dessa maneira, a continuidade de seu ciclo e com isso, a possibilidade de transmissão de *B. bigemina*. Provavelmente, seria um dos

mecanismos pelo qual, nos rebanhos da raça Nelore, a ocorrência de anticorpos anti-*B. bigemina* seja menor.

Ainda, analisando-se o Quadro 3, constata-se uma diferença significativa para *B. bovis* entre as regiões estudadas, onde os animais da raça Nelore, pertencentes ao Município de Avaré apresentaram maior soroprevalência que os de Presidente Prudente. Avaré, ao contrário de Presidente Prudente, é caracterizada como uma região de predominância de pecuária leiteira e de cruzamento industrial, com a utilização de bovinos de raças *B. taurus* e seus mestiços, caracterizados como raças pouco resistentes a *B. microplus*. Há, portanto, maior contaminação das pastagens e com isso uma maior chance de inóculo do agente.

Situação imunológica para bovinos Holandes

A situação imunológica do rebanho Holandês, nos dois municípios, tanto para *B. bovis*, quanto para *B. bigemina*, não é preocupante, existindo pouca probabilidade de existência de surtos pois, nesses municípios, os rebanhos possuíam frequência de anticorpos acima de 75% (Quadro 2). Essas regiões, portanto, são caracterizadas como áreas de estabilidade enzoótica, para ambas as espécies para essa raça.

O estudo evidenciou também haver diferença na ocorrência de anticorpos entre a raça Nelore e a raça Holandesa, para ambas as babesias. Logo, a comparação com outras pesquisas torna-se mais fiel à medida que as espécies de *B. indicus* e *B. taurus* forem levadas em consideração na discussão.

Baseando-se nessas considerações, constatou-se que tanto para *B. bovis* quanto para *B. bigemina*, os resultados da pesquisa flutuaram em comparação aos encontrados por outros pesquisadores, em outras regiões e estados: Rio de Janeiro (Madruga et al. 1992), Paraíba (Madruga et al. 1993), Bahia (Araújo 1995), São Paulo (Barci et al. 1995a), Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Bahia, Mato Grosso do Sul, Roraima (Madruga et al. 1995), Paraná (Vidotto et al. 1997), Rio de Janeiro (Cunha et al. 1999) e Santa Catarina (Souza et al. 2002), ora sendo similares, inferiores ou superiores.

Situação imunológica para bovinos Nelore

Ao contrário da raça Holandesa, a condição imunológica para a raça Nelore é preocupante para a *B. bigemina* nos municípios de Avaré e de Presidente Prudente onde foram verificadas áreas de instabilidade enzoótica (Quadro 2). Também inspira cuidados, a situação epidemiológica de *B. bovis* em Presidente Prudente a qual se encontra na área marginal, com uma ocorrência de 78,08% de anticorpos anti-*B. bovis*. Madruga et al. (2000) descreve em Mato Grosso do Sul frequência de indivíduos sororeagentes de 72,5%, situação muito parecida com a de Presidente Prudente para *B. bovis*, embora esteja localizada numa área de estabilidade enzoótica a frequência de anticorpos é baixa, estando os bovinos mais suscetíveis à ocorrência aguda da doença.

À semelhança do ocorrido com bovinos da raça Holandesa, a percentagem de animais possuidores de anticorpos, para ambas babesias, na raça Nelore também flutuou quando comparada às encontradas por outros autores: em Mato Grosso Sul (Madruga et al. 1983, 2001), São Paulo (Barci et al. (1995b), Santa Catarina (Dalagnol et al. 1999) e Rio de Janeiro (Madureira et al.

1999, Scofield et al. 1999, Soares et al. 2000), havendo situações de igualdade, superioridade e outras de inferioridade.

A variação da condição imunológica para as *Babesias* spp no Brasil, mostra a importância do conhecimento da soroprevalência regional que inclusive, poderá se alterar em conformidade à introdução, cada vez maior, de animais de raças *B. taurus* e também por manejos que possam propiciar uma maior difusão da doença, como o controle massivo do transmissor ou por meio de medicamentos como os reguladores de crescimento aliados a utilização de vacinas contra *B. microplus*.

REFERÊNCIAS

- Araújo FR. 1995. Levantamento sorológico para *Babesia bovis* (Babes, 1888) e *Babesia bigemina* (Smith e Kilborne, 1893) em bovinos no estado da Bahia. Tese de Mestrado, Universidade Federal da Bahia Salvador. 78p.
- Araújo F.R., Madruga C.R., Leal C.R.B., Schenk M.A.M., Kessler R.H., Marques A.P.C. & Lemaire D.C. 1998. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.* 74:101-108.
- Barci L.A.G., Oliveira M.R., Machado R.Z., Oliveira D.A. & Araújo Filho R.S. 1995a. Epidemiologia da babesiose bovina no estado de São Paulo. I. Estudo em rebanhos produtores de leite tipo B do município de Pindamonhangaba, Vale do Paraíba. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 3(2):79-82.
- Barci A.G., Dell'Porto A., Fujii T.U. & Machado R.Z. 1995b. Epidemiologia da babesiose bovina no estado de São Paulo: estudo em rebanhos de corte da região do Vale do Ribeira. IX Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Campo Grande, MS, p.205. (Resumo)
- Bennett G.F. 1974. *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acaridae: Ixodidae) on the bovine host. I. Mortality during the developmental cycle. *Acarologia* 16:643-650.
- Corrier D.E., Gonzales E.F. & Betancourt A. 1978. Current information on the epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Colombia. In: Wilde J.K.H. (ed.) Tick-borne Diseases and their Vectors. Lewis, Tonbridge, p.114-120. (Reprint)
- Cunha N.C., Soares C.O., Souza J.C.P., Madureira R.C., Fonseca A.H., Madruga C.R. & Massard C.L. 1999b. Soroprevalência da *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) (Apicomplexa: Babesiidae) em bovinos na mesoregião do Médio Paraíba do Estado do Rio de Janeiro. XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Salvador, Bahia, p.200. (Resumo)
- Dalagnol A.A., Martins E., Madruga C.R., Gomes R., Schenk M.A.M., Kessler R.H., Gratão G., Gales M.E., Schenk J.A.P., Andreade M., Bianchini I. & Migueta M. 1999. Prevalência de agentes da tristeza parasitária bovina em bovinos de corte na região de clima cfb - SC. *Agropecuária Catarinense* 12(3):46-47.
- Kemp D.H., Koudstaal D., Roberts J.A. & Kerr J.D. 1976. *Boophilus microplus*. The effect of host resistance on larval attachments and growth. *Parasitology* 73:123-36.
- Kessler R.H. & Schenk M.A.M. 1998. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, p.157.
- Kurt O. & Girginkardesler N. 2001. Babesiosis. *Turkive Parazitoloji Dergisi* 25(1):94-98.
- Leite A.M.O., Arnoni J., Silva S.S., Farias N., Cruz H. & NishiKawa H. 1989. Serological study of bovine babesiosis in a marginal area of Brasil. *Proc. 8th National Veterinary Hemoparasite Disease Conference*, St. Louis, p.624-635.
- Madruga C.R., Aycardy E. & Putt N. 1983. Epidemiologia da Anaplasmosose e Babesiose em bovinos da região de Cerrado do Estado de Mato Grosso do Sul. I. Prevalência. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 35(5):631-640.
- Madruga C.R., Braga M.M., Lima L.A.F., Moraes J.L.C., Oliveira D.B. & Massard L.C. 1992. Prevalência de anticorpos contra *Babesia bovis* e *B.*

- bigemina* em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. 22º Congr. Bras. Med. Veterinária, Curitiba. (Resumo 285)
- Madruga C.R., Honer M.R., Andreotti R., Araújo F.R. & Santarém V. 1993. Simulação e sorologia no mapeamento da instabilidade endêmica das babesioses: um estudo nas regiões do Boqueirão e Cairiri, Estado da Paraíba. VIII Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Londrina, Paraná. (Resumo P1)
- Madruga C.R., Kessler R.H., Schenk M.A.M., Honer M.R. & Miguita M. 1995. Análise de testes de aglutinação rápida para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis* e *B. bigemina*: Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.47(5):649-657.
- Madruga C.R., Marques A.P.C., Queiroz R.A. & Vaz E.C. 1997b. Avaliação de um teste ELISA para detecção de anticorpos contra *Babesia bigemina* em bovinos de áreas de estabilidade e instabilidade enzoótica. Revta Bras. Parasitol. Vet. 6(1):302.
- Madruga C.R., Araújo F.R., Marques A.P.C., Carvalho C.M.E., Cusinato F.Q., Crocci A.J., Kessler R.H. & Miguita M. 2000. Desenvolvimento de uma prova de imunoabsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. Pesq. Vet. Bras. 20(4):167-170.
- Madruga C.R., Araújo F.R., Marques A.P.C., Carvalho C.M.E., Crocci A.J., Queiroz, R.A., Miguita M. & Umaki A.C.S. 2001. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and its application in an epidemiological survey in Brazil. Pesq. Vet. Bras. 21(2):72-76.
- Madureira R.C., Soares C.O., Manera G.B., Souza J.C.P., Madruga C.R., Fonseca A.H. & Massard C.L. 1999. Soroprevalência da *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) (Apicomplexa: Babesiidae) em bovinos na mesorregião Noroeste Fluminense. XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Salvador, Bahia, p.198. (Resumo)
- Mahoney D.F. & Ross D.R. 1972. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. Aust. Vet. J. 48:292-298.
- Mahoney D.F. 1975. The diagnosis of babesiosis in Australia, p.49-62. In: Wells E.A. (ed.) Workshop on Hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis). CIAT, Cali, Colombia.
- Roberts J.A. 1968. Resistance of cattle to tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. Stages of life cycle of the parasite against which resistance is manifest. J. Parasitol. 54:667-673.
- Sartor I.F., Faccini J.L.H., Kuchembuck M.R.G. & Curi P.R. 1992. Estudo comparativo da resistência ao carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari) em bovinos das raças Gir, Holandesa e mestiços ½ gir-holandês. Vet. Zootec. 4:25-33.
- Scofield A., Soares C.O., Souza J.C.P., Silva W.C.P., Madureira R.C., Fonseca A.H. & Madruga C.R. 1999. Soroprevalência da *Babesia bovis* (Babés,1888) (Apicomplexa: Babesiidae) em bovinos na mesorregião Noroeste Fluminense. XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Salvador, Bahia, p.199. (Resumo)
- Smith R.D. 1980. Epidemiologia de la anaplasmosis y babesiosis bovinas. In: II Reunion Interamericana de Directores de Salud Animal, San José, Costa Rica, set. 8-12.
- Soares C.O., Souza J.C.P., Madruga C.R., Madureira R.C., Massard C.L. & Fonseca A.H. 2000. Seroprevalence of *Babesia bovis* in cattle in the Norte Fluminense region. Pesq. Vet. Bras. 20:75-79.
- Souza A.P., Surkamp V., Bellato V., Sartor A.A. & Farias M.L. 2002. Prevalência de anticorpos anti-babesia em bovinos no Planalto Santa Catarina. Revta Ciênc. Agrovet. 1:21-23.
- Suarez M.H., Alonso M.C., Pelaez R.M., Sanches B.P., Bravo Jr G. & Sanchez A.S. 1997. Pesquisa de Babesia em trabalhadores Cubanos, agropecuarios y donantes en la provincia de Ciego de Avila. Revta Med. Tropical 49(2):130-135.
- Vidotto O., Andrade G.M., Amaral C.S.H., Barbosa C.S., Freire R. L., Rocha M.A. & Vidotto M.C. 1997. Frequência de anticorpos contra *Babesia bovis* e *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná. Arq. Bras. Vet. Zootec. 49:655-659.
- Wagland B.M. 1979. Host resistance to cattle tick *Boophilus microplus* in Brahman (*Bos indicus*) cattle. IV. Ages of ticks rejected. Aust. J. Agric. Res.30:211-218.
- Willadsen P. 1986. Mecanismos and genetics of host resistance to ticks. Proc. 3rd World Congr. Genetics Applied to Livestock Production, Lincoln, Nebraska, p.571-580.
- Wright I.G. & Goodger B.V. 1988. Pathogenesis of babesioses, p.100-118. In Ristic M. (ed.) Babesiosis of Domestic Animals and Man. CRC Press, Boca Raton, Flórida.