

## Detecção de anticorpos IgG anti-*Anaplasma marginale* em bezerros recém-nascidos na Baixada Fluminense, RJ\*

Fábio Jorge Moreira da Silva<sup>1+</sup>, Jenevaldo Barbosa da Silva<sup>2</sup>, Daniel da Silva Guedes Júnior<sup>3</sup>, Charles Passos Rangel<sup>4</sup>, Rafaella Câmara Teixeira<sup>5</sup>, Adivaldo Henrique da Fonseca<sup>6</sup> e João Luiz Horácio Faccini<sup>7</sup>

**ABSTRACT.** Silva F.J.M., Silva J.B., Guedes Júnior D.S., Rangel C.P., Teixeira R.C., Fonseca A.H. & Faccini J.L.H. [Detection of IgG antibodies to *Anaplasma marginale* in newborn calves in Baixada Fluminense region, RJ.] Detecção de anticorpos IgG anti-*Anaplasma marginale* em bezerros recém-nascidos na Baixada Fluminense, RJ. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(2):133-137, 2015. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: fabiojms@icb.ufrj.br

The objectives were to evaluate the prevalence and the seroepidemiological evolution to *Anaplasma marginale* in 41 calves since birth to first 180 days of life, in a enzootic region in the state of Rio de Janeiro. The analyzed animals belonged to Centro Estadual de Pesquisa em Agricultura Orgânica - Pesagro-Rio, Seropédica-RJ. The study was conducted during the rainy and dry seasons, between 2009 and 2010. A total of 1607 serum samples was collected initially every three days and processed using indirect ELISA test to detect IgG anti-*A. marginale* antibodies. Percent values for *A. marginale* seroprevalence as function of age were tested using the  $\chi^2$  test at 5% significance level. The prevalence of IgG anti-*A. marginale* antibodies were 39.8% in calves younger than 30 days, 23.3% between 30 and 60 days, 27.3% for 60 and 120 days and 38.2% to 120 and 180 days. Calves with age between 30 and 60, 60 and 120 and 120 and 180 days were respectively 1.90, 1.75 and 1.55 more risk to be seronegative for *A. marginale* than newborn ones. The results show that calves had low levels of IgG antibodies anti-*A. marginale* in all study, this condition induces them to development of clinical anaplasmosis. Moreover, the property was considered unstable epidemiologically to *A. marginale*, although located in a endemic stability area.

KEY WORDS. Anaplasmosis, bovines, immunodiagnosis, enzootic.

**RESUMO.** Os objetivos do trabalho foram avaliar a prevalência e a evolução soropidemiológica para *Anaplasma marginale* em 41 bezerras (*Bos indicus* x *Bos taurus*) do nascimento aos primeiros 180 dias de vida, numa região enzoótica do estado do Rio de Janeiro. Os animais analisados pertenciam ao

\* Recebido em 25 de fevereiro de 2013.

Aceito para publicação em 28 de março de 2014.

<sup>1</sup> Médico-veterinário, DSc. Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública (DESP), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. \*Autor para correspondência, E-mail: fabiojms@icb.ufrj.br

<sup>2</sup> Médico-veterinário, DSc. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp-Jaboticabal, Rod. Carlos Tonanni, Km 5, Jaboticabal, SP 14870-000, Brasil. E-mail: jenevaldo@hotmail.com

<sup>3</sup> Médico-veterinário, DSc. Tecnologista em Saúde Pública, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, RJ 21040-900, Brasil. E-mail: daniel.guedes@bio.fiocruz.br

<sup>4</sup> Médico-veterinário, DSc. Instituto Mineiro de Agropecuária, Av. Santa Mônica, 815, Saudade, Janaúba, MG 39440-000, Brasil. E-mail: charlesufrj@bol.com.br

<sup>5</sup> Médica-veterinária, DSc. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: rafaella.medvet@hotmail.com

<sup>6</sup> Médico-veterinário, DSc., LD. DESP, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: adivaldo@ufrj.br - bolsista CNPq.

<sup>7</sup> Médico-veterinário, PhD, LD. Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: faccini@ufrj.br - bolsista CNPq.

Centro Estadual de Pesquisa em Agricultura Orgânica – Pesagro-Rio, Seropédica-RJ. O estudo foi conduzido nas estações chuvosa e seca, entre 2009 e 2010. Foi obtido um total de 1607 amostras de soro, com intervalo inicial de três dias e processados utilizando o teste ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG anti-*Anaplasma marginale*. Os valores percentuais de soroprevalência para *A. marginale* em função da idade foram submetidos ao teste  $\chi^2$  a 5% de significância. A prevalência de anticorpos IgG anti-*A. marginale*, em bezerros, em função da idade, foi de 39,8% nos animais com idade inferior a 30 dias, 23,3% entre 30 e 60 dias, 27,3% entre 60 e 120 dias e 38,2% entre 120 e 180 dias. Bezerros com idade 30 - 60, 60 - 120 e 120 - 180 dias apresentaram respectivamente 1,90, 1,75 e 1,55 mais risco de serem soronegativos para *A. marginale* do que os animais recém-nascidos. Os resultados demonstram que durante todo o estudo os animais apresentaram baixos títulos de anticorpos IgG anti-*A. marginale*, estando mais susceptíveis a apresentarem anaplasiose clínica. Além disto, a propriedade foi considerada epidemiologicamente instável para *A. marginale*, embora localizada em uma área de estabilidade endêmica.

**PALAVRAS-CHAVE.** Anaplasiose, bovinos, imunodiagnóstico, enzootia.

## INTRODUÇÃO

*Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae, Theiler 1910) é o mais importante patógeno de bovinos transmitido por carrapatos em todo o mundo, ocorrendo em seis continentes e sendo responsável por grave morbidade e mortalidade em regiões temperadas, subtropicais e tropicais (Kocan et al. 2000, De La Fuente et al. 2005). A doença é endêmica na América Latina, onde o principal vetor é o carrapato *Rhipicephalus microplus* (Vidotto et al. 2001).

Para implementação de um programa de controle da anaplasiose, faz-se necessário o conhecimento epidemiológico desta enfermidade na região de interesse, incluindo também seus potenciais vetores (Kessler 2001, Souza et al. 2001). A situação epidemiológica de uma área pode ser determinada a partir do uso de algumas técnicas de diagnósticos, tanto para identificar a presença do agente, quanto a resposta imune do hospedeiro infectado. Entre os diversos métodos, temos como um dos mais eficazes o Ensaio de Imunoadsorção Enzimático indireto (iELISA), que de acordo com Araújo et al. (1998) possui melhor desempenho quando comparado a outros testes sorológicos. Em relação aos níveis de

resposta imunológica dos animais, as áreas pesquisadas podem ser caracterizadas de três formas: áreas de estabilidade enzoótica, instabilidade e situação de área marginal para anaplasiose (Madruga et al. 1985).

Embora *A. marginale* apresente ampla distribuição em muitas regiões do Brasil, não há conhecimento pleno da condição epidemiológica e da situação desta enfermidade no estado do Rio de Janeiro (Souza et al. 2001). Assim, o estudo teve como objetivos avaliar a prevalência de anticorpos IgG anti-*A. marginale* e a condição soroprevalência desta riquetsia em bezerros nativos em uma propriedade da Baixada Fluminense, região enzoótica do estado do Rio de Janeiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

As coletas a campo foram realizadas entre outubro de 2009 e setembro de 2010, na fazenda de bovinocultura de leite da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro-Rio), Centro Estadual de Pesquisa em Agricultura Orgânica (Seropédica-RJ), localizada na microrregião metropolitana da cidade do Rio de Janeiro (latitude sul 22°48', longitude oeste 43°41', altitude de 33m), com clima de duas estações predominantes, uma marcada pelas chuvas e outra pela seca.

Foram utilizadas 41 bezerras (*Bos taurus* x *Bos indicus*) com idade entre 01 e 180 dias, as quais 21 nasceram no período chuvoso (outubro - março, Grupo A) e 20 no período seco (abril - setembro, Grupo B). O cronograma das coletas de sangue foi estabelecido de acordo com a idade dos animais. Inicialmente, até completarem 90 dias de vida, os indivíduos foram acompanhados a cada três dias, em média. Entre 90 e 150 dias de vida, as coletas se deram a cada 7 dias e, por fim, com intervalos de 15 dias até que os animais atingissem os 180 dias de nascidos.

A detecção de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale* nas amostras de soro sanguíneo foi obtida a partir do teste iELISA proposto por Machado et al. (1997) e adaptado para *A. marginale*. Como controles positivos foram utilizados soros de 12 bovinos com alto título de anticorpos anti-*A. marginale* (1:3200 na Reação de Imunofluorescência Indireta [RIFI]) e para controles negativos foram utilizados soros de 12 bovinos comprovadamente negativos na RIFI. Na reação do iELISA foi utilizado antígeno bruto de *A. marginale*, com concentração proteica de 12µg/mL. A leitura do ensaio foi realizada por espectrofotometria e obtida com auxílio de um leitor de microplacas, baseada em um comprimento de onda de 405nm.

A atividade enzimática de cada soro no iELISA foi calculada mediante determinação do valor da amostra em relação à média do referencial positivo (A/P). Os valores A/P foram agrupados em níveis ELISA (NE), que variaram de zero a nove (NE 0 - NE 9). A amplitude máxima do NE zero foi determinada pela média dos

valores da absorvância de soros de animais não imunes contra *A. marginale* (referência negativa), acrescida de dois desvios padrão da média, conforme estabelecido por Machado et al. (1997). A partir deste limite, os intervalos entre os outros níveis no ELISA foram acrescidos em 35% cada. O ponto de corte do teste foi determinado multiplicando-se por 2,5 a média da densidade óptica (DO) dos soros dos animais negativos para *A. marginale*.

Para efeito de classificação da área estudada, foram utilizadas adaptações dos critérios propostos por Mahoney & Ross (1972), que utilizaram para caracterizar como estabilidade enzoótica áreas cuja frequência de agentes etiológicos atingiu valores acima de 75%; áreas de instabilidade enzoótica, aquelas com frequências inferiores a 75%; e áreas marginais aquelas cujas frequências estão muito próximas do limite. Para o presente estudo, o critério de avaliação da região foi a resposta sorológica dos bezerros para anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale*, conforme proposto por Madruga et al. (1985).

Para efeitos de análise estatística e correlação das respostas, os animais dos grupos A e B foram estratificados em quatro grupos de acordo com a idade. O primeiro com idade até 30 dias, o segundo entre 30 e 60, o terceiro entre 60 e 120 e o quarto entre 120 e 180 dias. Os resultados da associação entre a variável frequência de animais soropositivos para *A. marginale* com o fator idade foram submetidos ao teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Na avaliação do risco de ocorrência de anaplasmosse, foi calculada a razão de prevalência (RP). Para auxiliar a análise dos resultados, foi utilizado o software estatístico Rstudio (Foundation for Statistical Computing), versão 2.12.2 (2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Densidade Óptica (DO) média dos soros controles negativo (n=18) foi de 0,117±0,004 e a absorvância média verificada para os soros controles positivo (n=18) foi de 1,006±0,251. Assim, baseado na média da absorvância dos soros controles negativo, foi estabelecido o primeiro nível de iELISA (NE), sendo os demais níveis determinados pelo acréscimo de 35% sobre o nível anterior (Tabela 1). As amostras foram agrupadas em NE, que variaram de 0 (nível mais baixo) a 9 (nível mais alto) e amostras com DO acima de 0,257 (NE ≥ 3) foram consideradas positivas.

A distribuição dos soros em Níveis de ELISA (NE) não apresentou diferença significativa (p>0,05) em função da estação do ano (Tabela 1). Estes dados corroboram os resultados de Silva (2008), que não observou influência desta variável nos títulos de anticorpos IgG anti-*A. marginale* em bezerros. Tal estudo indica não haver diferença estatística significativa (p>0,05) entre as respostas sorológicas para animais da mesma idade, nascidos em diferentes épocas do ano na mesma região

endêmica para *A. marginale*. Baseado nestas informações, os soros testados no presente estudo foram avaliados apenas em relação à faixa etária.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, 1,0% (16/1607) apresentou DO alta (NE = 7, 8 e 9) e 23,2% (373/1607) corresponderam ao NE mais baixo (NE = 0). Quando estratificados por faixas etárias, 50,9% dos soros de animais até 30 dias, 69,2% entre 30-60 dias, 67,6% daqueles entre 60-120 dias e 58% dos acima de 120 dias apresentaram NE negativo (0-2). Do total de amostras de soro dos animais avaliados do nascimento aos 180 dias de vida, 62,3% apresentaram NE negativo, o que pode indicar uma baixa taxa de resposta sorológica anti-*A. marginale* no rebanho, conforme descrito por Pacheco et al. (2004), ou mesmo a possibilidade de uma cepa pouco virulenta com baixo estímulo imunológico, observado por Kano et al. (2002), o que pode indicar risco de anaplasmosse clínica na propriedade.

Mais de 30% das amostras de soro de bezerros com idade até 30 dias e os de 30 a 60 dias apresentaram resposta entre NE 3-6, ou seja, entre o nascimento e os primeiros 60 dias de vida há evidências de um contato das bezerras com *A. marginale*. Este percentual pode ser justificado pelas imunoglobulinas colostrais de ruminantes que apresentam níveis elevados após 24 horas do parto e possuem meia-vida entre 11,5 e 16 dias (Barrington & Parish 2001), indicando uma transferência passiva de IgG na sequência ao nascimento, através da amamentação. Após este período há uma resposta do próprio animal à infecção pelo agente.

Para melhor auxílio ao sistema imune em formação, a assistência imunológica materna através do colostro é essencial (Palmer & McGuire 1984). Segundo Barrington & Parish (2001), o colostro fornecido aos bezerros possui uma quantidade de

Tabela 1. Classificação dos soros testes de bezerros em níveis de ELISA (NE) anti-*Anaplasma marginale*, Pesagro-Rio, 2009-2010.

NE	S/P	Grupo A (n=822)*	Grupo B (n=785)*
0	0.0- 0.140	183	190
1	0.141- 0.189	150	159
2	0.190- 0.256	160	160
3	0.257- 0.346	139	111
4	0.347- 0.468	86	80
5	0.469- 0.633	60	54
6	0.634- 0.855	33	26
7	0.856- 1.155	10	4
8	1.156- 1.560	1	1
9	> 1.560	0	0

S/P = Absorvância das amostras e dos soros de referência positiva; n=número de soros testados; grupo A = estação chuvosa; grupo B = estação seca \*não houve diferença estatística significativa (p>0,05).

anticorpos IgG suficiente para uma primeira ação imune. No presente estudo foi evidenciado o fornecimento de colostro para todos os animais ao nascer e durante aproximadamente os primeiros cinco dias de vida.

Pacheco et al. (2004) diagnosticaram níveis de imunoglobulinas no soro de vacas, próximo ao período do parto, e nos respectivos bezerros, que foram mantidos em sistema de manejo semelhante ao do presente estudo. Estes autores observaram nos filhotes a diminuição gradativa a partir do primeiro dia de vida até 45 dias, o que corrobora os resultados sorológicos negativos dos animais desta faixa etária (Tabela 2).

No estudo a soroprevalência de IgG anti-*A. marginale* foi de 39,8% nos bezerros da faixa etária até 30 dias, apresentando uma queda para 23,3% e voltando a aumentar com a idade dos animais, atingindo prevalência de 38,2% na faixa etária entre 120 e 180 dias (Tabela 3), corroborando relatos anteriores realizados no Brasil e na Costa Rica (Pérez et al. 1980). Segundo Melo et al. (2001), mais de 90% dos bezerros apresentaram anticorpos IgG anti-*A. marginale* antes dos 30 dias de idade, sendo que, entre 90 e 150 dias, estes valores caíram até atingirem um mínimo de 13,6%. E, a partir dos 180 dias de idade, por conta da infecção natural, mais de 96% tornam-se positivos novamente, fato que corrobora os resultados descritos na Tabela 3, porém com valores menos elevados.

Durante os primeiros 180 dias de vida a frequência de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale* foi baixa (37,7%), caracterizando toda esta fase como de risco potencial para a ocorrência de anaplasmoze clínica (Tabela 2). A idade dos animais ainda é considerada um fator determinante para a imunidade contra *A. marginale*, uma vez que os animais jovens são mais resistentes à infecção primária. Observando isto, se pelo menos 75% dos bezerros fossem expostos à infecção entre 6 a 9 meses, a incidência da doença seria muito baixa e um estado de estabilidade endêmica natural poderia existir, corroborando Smith et al. (1989).

Analisando a Tabela 3, os soros de animais entre 30 e 60 dias de idade apresentaram maior risco para anaplasmoze (RP=1,9). Posteriormente, as amostras de animais com idade entre 60 - 120 e 120 - 180 dias indicaram, respectivamente, 76% e 55% mais risco de serem soronegativos para *A. marginale* do que aqueles animais recém-nascidos, o que corrobora Pacheco et al. (2004) e também Barrington & Parish (2001), este último somente em relação à qualidade do colostro.

Tabela 2. Percentual de amostras de soro por faixas etárias testadas por iELISA anti-*Anaplasma marginale* e classificadas em níveis de ELISA (NE), Pesagro-Rio, 2009-2010.

NE	< 30 dias	30-60 dias	60-120 dias	120-180 dias	Total
0	12,9	22,7	35,3	13,3	23,2
1	14,6	25,3	17,5	20,7	19,2
2	23,4	21,2	14,8	24,0	19,9
3	23,4	13,4	10,1	19,2	15,6
4	14,9	10,5	7,5	10,4	10,3
5	7,3	4,4	8,6	7,1	7,1
6	3,5	2,3	4,1	4,4	3,7
7	0,0	0,3	1,9	0,6	0,9
8	0,0	0,0	0,2	0,3	0,1
9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 3. Avaliação da idade como fator de risco para a frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* pelo teste qui-quadrado em bezerros até 180 dias, Pesagro-Rio, 2009-2010.

Fator de risco	N	P(%)	$\chi^2$	RP	P-valor	IC95%
Idade						
(1) < 30 dias*	342	39,8 %	-	-	-	-
(2) 30 - 60 dias	344	23,3 %	16,8	1,90	0,03	[0,47 - 0,93]
(3) 60 - 120 dias	583	27,3 %	9,4	1,76	0,04	[0,74 - 0,87]
(4) 120 - 180 dias	338	38,2 %	1,7	1,55	0,06	[0,27 - 1,98]

\* Valor referência, N= número de amostras avaliadas, P(%)= prevalência de soropositivos para *Anaplasma marginale*,  $\chi^2$ = qui-quadrado, RP = razão de prevalência, IC 95% = intervalo de confiança.

Poucas áreas do Brasil, até o momento, foram caracterizadas em relação à enzootia para *A. marginale*, principalmente quanto à instabilidade enzootica. Como exemplo, temos o estado de Sergipe, para regiões climáticas do tipo árida, semi-árida, transição semi-árida e transição subúmida, onde a prevalência média foi de 16,3% (Oliveira et al. 1992); a microrregião de Bagé, estado do Rio Grande do Sul, com clima subtropical úmido; e a região nordeste do estado do Pará, clima equatorial quente e úmido, em que a prevalência observada de animais reagentes para *A. marginale* foi de 64% e menor de 70% respectivamente (Guedes Junior et al. 2008).

O percentual de amostras positivas (NE $\geq$ 3), que inclui todo grupo do estudo (1 a 180 dias), foi de 31,4% (Tabela 3). Este fato indica que, a partir deste valor, a área da propriedade foi classificada como de instabilidade enzootica, o que contrasta com a condição descrita por Souza et al. (2001), que descreveram a mesorregião Norte Fluminense como de estabilidade enzootica para anaplasmoze. Como a área do estudo está compreendida dentro desta mesorregião, trata-se de uma condição de instabilidade, ao menos para a faixa etária pesquisada (até 180 dias), dentro de uma área considerada estável.

Diversos fatores de risco, como práticas de manejo em pastagens, aspectos sanitários, manipula-

ção genética das raças, estado fisiológico das progenitoras, população de artrópodes, além da idade dos animais, podem influenciar diretamente na frequência de *A. marginale* e seu vetor no rebanho, e consequentemente na classificação enzoótica da área (Madruga et al. 1985, Kessler 2001, Silva et al. 2013).

## CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que os animais estudados apresentaram baixos títulos de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale*.

O grupo de animais mais susceptível para desenvolver anaplasmose clínica foi formado por bezerros com idade entre 30 e 60 dias.

Em estudos epidemiológicos é indicado que cada propriedade seja considerada uma “unidade epidemiológica”, com suas restrições e particularidades, pois inúmeros fatores de risco podem influenciar na frequência de *A. marginale* e do seu vetor.

**Agradecimentos.** Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro; ao Centro Estadual de Pesquisa em Agricultura Orgânica (Pesagro-Rio), pelos animais cedidos; à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosângela Zacarias Machado pela gentileza em ceder o antígeno de *Anaplasma marginale* utilizado no iELISA.

## REFERÊNCIAS

Araújo F.R., Madruga C.R., Bastos P.A.S., Marques A.P.C. Frequência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 50:243-246, 1998.

Barrington G.M. & Parish S.M. Bovine neonatal immunology. *Vet. Clin. N. Am: Food Anim. Pract.*, 17:463-476, 2001.

De La Fuente J., Lew A., Lutz H., Meli M.L., Hofmann-Lehmann R., Shkap V., Molad T., Mangold A.J., Almazan C., Naranjo V., Gortalzar C., Torina A., Caracappa S., Garcia-Perez A.L., Barral M., Oporto B., Ceci L., Carelli G., Blouin E.F. & Kocan K.M. Genetic diversity of anaplasma species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Anim. Health Res. Rev.*, 6:75-89, 2005.

Guedes-Junior D.S., Araújo F.R., Silva F.J.M., Rangel C.P., Barbosa Neto J.D. & Fonseca A.H. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia*

*burgdorferi* in cattle from the Northeastern region of the State of Pará, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17:105-109, 2008.

Kano F.S., Vidotto O., Pacheco R.C. & Vidotto M.C. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. *Vet. Microbiol.*, 87:131-138, 2002.

Kessler R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras.*, 21:177-179, 2001.

Kocan K.M., Blouin E.F. & Barbet A.F. Anaplasmosis control: past, present and future. *An. New York Acad. Sci.*, 916:501-509, 2000.

Machado R.Z., Montassier H.J., Pinto A.A., Lemos E.G., Machado M.R., Valadão I.F., Barci L.G. & Malheiros E.B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Vet. Parasitol.*, 71:17-26, 1997.

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. *Pesq. Agropec. Bras.*, 20:135-142, 1985.

Mahoney D.F. & Ross D.R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Austr. Vet. J.*, 48:292-298, 1972.

Melo V.S.P., Passos L.M.F., Facury-Filho E.J., Saturnino H.M. & Ribeiro M.F. Natural infection of calves by *Anaplasma marginale* in dairy herds of the Metalúrgica Region, Minas Gerais. *Pesq. Vet. Bras.*, 21:146-150, 2001.

Oliveira A.A., Pedreira P.A.S. & Almeida M.F.R.S. Doenças de bezerros: Epidemiologia da anaplasmose no estado de Sergipe. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 44:377-386, 1992.

Pacheco R.C., Vidotto O., Tamekuni K., Igarashi M., Kawasaki P., Prudêncio L.B., Marana E.R.M. & Pereira A.L. Dinâmica da infecção natural pelo *Anaplasma marginale* em vacas e bezerros da raça Holandesa, na região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Sem.: Ciênc. Agr.*, 25:235-244, 2004.

Palmer G.H. & McGuire T.C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J. Immunol.*, 133:1010-1015, 1984.

Pérez E., Leroy E. & Carrillo J.M. Anaplasmosis y piroplasmosis: estudio epidemiológico en la estación experimental, Los Diamantes. *Ciênc. Vet.*, 2:7-20, 1980.

Silva F.J.M. Relação entre infestação natural por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) e níveis de anticorpos da classe IgG para os agentes da Tristeza Parasitária Bovina e *Borrelia* sp. em bezerros. Dissertação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008. 50p. (Disponível em: <[http://bdtd.ufrrj.br/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=669](http://bdtd.ufrrj.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=669)>).

Silva J.B., Rangel C.P., Azevedo Baêta B. & Fonseca A.H. Influence of the physiological state on infestation by *Rhipicephalus microplus* in dairy cows. *Tick Tick Born Dis.*, 4:52-56, 2013.

Smith R.D., Hungerford L.L. & Armstrong C.T. Epidemiologic investigation and control of an epizootic of anaplasmosis in cattle in winter. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195:476-480, 1989.

Souza J.C.P., Soares C.O., Massard C.L., Scofield A. & Fonseca A.H. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* na Mesorregião Norte Fluminense. *Pesq. Vet. Bras.*, 20:97-101, 2001.

Theiler A. *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.): A protozoon of cattle, a cause of the called gall-sickness. *Transm. Med. J.*, 5:110-111, 1910.

Vidotto O. & Marana E.R.M. Diagnóstico em Anaplasmose Bovina. *Ciênc. Rur.*, 31:361-368, 2001.