

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**"RESPOSTA IMUNE-HUMORAL DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)
INFECTADOS NATURALMENTE POR *Babesia bovis*, *B. bigemina* e
Anaplasma marginale"**

RICARDO ALEXANDRE GOMES

Médico Veterinário

Jaboticabal – São Paulo - Brasil

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**"RESPOSTA IMUNE-HUMORAL DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)
INFECTADOS NATURALMENTE POR *Babesia bovis*, *B. bigemina* e
Anaplasma marginale"**

RICARDO ALEXANDRE GOMES

**Orientadora: Profa. Dra. WILMA APARECIDA STARKE
BUZETTI**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal – Unesp, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

Jaboticabal – SP

Agosto - 2007

G633r Gomes, Ricardo Alexandre
Resposta Imune-humoral de búfalos (*Bubalus bubalis*) infectados naturalmente por *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*/ Ricardo Alexandre Gomes. – – Jaboticabal, 2007
X, 72 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientadora: Wilma Aparecida Starke Buzetti

Banca examinadora: Gilson Pereira de Oliveira, Maria Conceição Zocoller-Seno, Rosângela Zacarias Machado, Solange Maria Gennari
Bibliografia

1. Babesia. 2. Anaplasma. 3. *Bubalus bubalis*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.993:636.292

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

cosmogomes@hotmail.com

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RICARDO ALEXANDRE GOMES – filho de José Roberto Gomes e Floripes Fernandes Gomes, nasceu em 01 de setembro de 1975, na cidade de São Paulo/SP, graduou-se em medicina veterinária em 1999 pela Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO) campus VII Fernandópolis/SP, onde em 1996 realizou tirocínio nos estudos Parasitológico, tanto em estágios e desenvolvimento de pesquisas, bem como viagens-técnicas científicas para outras instituições e ao Pantanal matogrossense. No ano de 2003, foi admitido pela Prefeitura Municipal de Cosmorama no cargo de Chefe de Inspeção e Vigilância Animal, adquiriu o título de Mestre em Medicina Veterinária, na área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e o aperfeiçoamento na área de Produtos de Origem Animal pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do campus de Jaboticabal da UNESP e também, no mesmo ano e mesma Instituição, ingressou-se no Doutorado. Em 2005, a partir de Concurso Público, foi admitido pela Secretária de Produção Animal (SEPROR) do Estado do Amazonas, como Fiscal Estadual Agropecuário na Comissão Executiva de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (CODESAV) e lecionou nas disciplinas de Parasitologia Veterinária e Doenças Parasitárias no curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário (UniniltonLins) Manaus/AM. Já no corrente ano, foi selecionado pelo SEBRAE para trabalhar como Agente de Desenvolvimento de Projetos no Sistema de Agroindústria Integrado (SAI) e ultimamente, aguarda ser convocado e nomeado para o cargo de Assistente Agropecuário na Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) da Secretária de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA), após aprovação no concurso público.

**"Prefiro os que me criticam porque me corrigem
aos que me adulam porque me corrompem."**

O Ex-Governador do Estado de São Paulo Geraldo Alckmim, ao citar Santo Agostinho e os ensinamentos do seu Pai, que era Médico Veterinário.

DEDICO:

A todas as comunidades científicas, mormente aos membros do COLÉGIO BRASILEIRO DE PARASITLOGIA VETERINÁRIA (CBPV).

A todos os presentes em todas as fases do processo da minha formação técnica e científica, amigos, colegas e simpatizantes pelo magnífico mundo da Parasitologia, aqui em destaque a resposta imune-humoral dos agentes da TPB em búfalos.

Sem duvida, vocês, Pesquisadores, contribuíram com cada momento para a ciência e o conforto animal e auxiliaram os amigos Médicos Veterinários com todas as informações e, em cascata, ajudaram os produtores rurais a diminuir os seus custos, melhorar a sua qualidade de vida e nessa educação continuada, poderão surgir os reflexos nas gerações futuras.

AGRADEÇO

A Deus, por mais um degrau conquistado.

À CAPES, pela bolsa de estudo.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), campus de Jaboticabal - UNESP, em nome do seu novo, nobre amigo e irmão o **Diretor Prof. Dr. Raul José Silva Girio**, possuidor de todas as qualidades que um ser humano possa ter.

Aos funcionários e colaboradores da Fazenda de Ensino e Pesquisa (FEP) e a Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) – UNESP, funcionários e colaboradores, e aos os Médicos Veterinários Fernando Paes, Fabiano, Eronides Marques de Souza, em nome da minha orientadora **Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti** pela força, persistência e estímulo a essa pesquisa, pela oportunidade de ser seu orientado e confiança recíproca.

A todos do Departamento de Patologia Veterinária, o Laboratório de Imunodiagnóstico, às amigas colaboradoras Gisele Andrade e Maria Antonieta Bonesso, em nome da GRANDIOSA MULHER, **Protozoologista, Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado**, sem dúvida, essa pesquisa seria impossível sem a sua colaboração e ensinamentos.

A todos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, em nome do **Prof. Dr. Adjair Antonio do Nascimento**, grande mestre **Helmintologista**, pela oportunidade dada em realizar o mestrado e seguir o caminho da pesquisa.

Aos Amigos e Professores da Unicastelo Fernandópolis, em nome dos **Profs. Drs. Marcos Roberto Bonuti e Oelinton Ferreira Barbosa**, pelo Tirocínio a Parasitologia Veterinária e pelos caminhos mostrados.

Ao CPPAR e seus Pesquisadores, em nome dos **Profs. Drs. Alvimar José da Costa** (Grande Pai) e **Uriel Franco Rocha** (In memória), pelas oportunidades dadas em conhecer os vários ramos da Parasitologia, pelos conselhos, amizade e confiança depositada todos esses anos. Ainda agradeço, a colaboração na minha formação, ao **Entomologista Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira**, mais que um pesquisador, um exemplo de amigo.

Às **Profas. Dras. Conceição Zocoller Seno** (FEIS/UNESP) e **Solange Maria Gennari** (USP) por todo esforço em participar no dia da defesa, as sugestões pós -banca e argumentações.

Aos **Funcionários da FCAV**: Hermes Ascaris, João da égua, Edgar Homem, Téo, José Tebaldi, Valéria, Karina, Patrícia, Cristina, Marisa, Moema, Fabio, Stela, Izabel, Marculino, Alexandre Fortunato, Amistá, Bertanha, Carlão, Milton, Vadéco, Andréia, Chica.

Aos Amigos de **Pós-graduação**: Percílio Brasil, Gabriel Amoriu, Ricardo Lemos, Fabiana Lima, Diogo, Márcia Elisa, Maria de Jesus, Claudia Zetterman, Elaine Mapeli. Estevão, Roberto.

Aos meus **Pais**, José Roberto Gomes e Floripes Fernandes Gomes, pelos incentivos moral e financeiro nos meus estudos.

Ao meu amigo e cunhado Frank Lissoni, Saulo; Seu Natal e minha ex-companheira na época Regia Maria Lissoni Figueiredo, meus **filhos** Ricardo e Ruan pelo incentivo, apoio e compreensão nos momentos difíceis da vida.

Aos meus **irmãos** Beto, Eudes, Vilma e Vanderlei (in memória) sobrinhos, ou seja, a todos da minha **família**.

Ao Prof.Dr. Sergio Albuquerque da USP, também pela Oportunidade concedida

Ao amigos do IDAM e CODESAV (SEPROR); ESBAM e UNINILTONLINS do Amazonas, CATI/SAA, SAI/SEBRAE do Estado de São Paulo e a Prefeitura de Cosmorama.

A todos que de alguma forma contribuíram pra este trabalho, desde já, minhas **sinceras desculpas** por não citá-los nestes agradecimentos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
3. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICO.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Local, animais e manejo geral da fazenda.....	16
4.2. Soroteca (Banco de Soro).....	17
4.3. Ensaio imuno enzimático - ELISA indireto.....	18
4.3.1. Modelo de análise dos dados.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1. Resposta imune humoral contra <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i> dos animais analisados em grupo.....	21
5.1.1. Detecção de anticorpos séricos das búfalas adultas.....	21
5.1.2. Detecção de anticorpos séricos do colostro/leite das búfalas adultas.....	26
5.1.3. Detecção de anticorpos séricos dos bezerros búfalos.....	30
5.2. Análise da resposta imune humoral individual.....	35
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS	57

LISTA DE TABELAS

TABELAS

PÁGINAS

Tabela 1: Resultados de detecção dos anticorpos anti- <i>Babesia bovis</i> pelo ELISA-teste realizado em soros de búfalas adultas (n = 4 a 12) antes do parto (dias -1 e -14) e após o parto (1 a 335 dias). Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.....	22
Tabela 2: Resultados de detecção dos anticorpos anti- <i>Babesia bigemina</i> pelo ELISA-teste realizado em soros de búfalas adultas (n = 4 a 12) antes do parto (dias -1 e -14) e após o parto (1 a 335 dias). Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.....	23
Tabela 3: Resultados de detecção dos anticorpos anti- <i>Anaplasma marginale</i> pelo ELISA-teste realizado em soros de búfalas adultas (n = 4 a 12) antes do parto (dias -1 e -14) e após o parto (1 a 335 dias). Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.....	24
Tabela 4: Resultados de detecção dos anticorpos anti- <i>Babesia bovis</i> pelo ELISA-teste realizado em colostros/leite de búfalas adultas (n = 10) após parto (1 a 60 dias). Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.....	27
Tabela 5: Resultados de detecção dos anticorpos anti- <i>Babesia bigemina</i> pelo ELISA-teste realizado em colostros/leite de búfalas adultas (n = 10) após parto (1 a 60 dias). Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.....	27
Tabela 6: Resultados de detecção dos anticorpos anti- <i>Anaplasma marginale</i> pelo ELISA-teste realizado em colostros/leite de búfalas adultas (n = 10) após parto (1 a 60 dias). Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.....	28
Tabela 7: Resultados de detecção dos anticorpos anti- <i>Babesia bovis</i> pelo ELISA-teste realizado em soros de bezerros búfalos (n = 7 a 10) do nascimento até 365 dias. Dados apresentados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.....	31
Tabela 8: Resultados de detecção dos anticorpos anti- <i>Babesia bigemina</i> pelo ELISA-teste realizado em soros de bezerros búfalos (n = 7 a 10) do nascimento até 365 dias. Dados apresentados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.....	32

- Tabela 9:** Resultados de detecção dos anticorpos anti-*Anaplasma marginale* pelo ELISA-teste realizado em soros de bezerros búfalos (n = 7 a 10) do nascimento até 365 dias. Dados apresentados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.....**33**
- Tabela 10:** Resultados da detecção de anticorpos anti-*Babesia bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* pelo ELISA - teste em amostras de soros do bezerro búfalo 365, colhidas desde o nascimento até 161 dias de idade. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 2005.....**36**
- Tabela 11:** Resultados da detecção de anticorpos anti- *Babesia bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* pelo ELISA - teste em amostras de soros da búfala 130, mãe do bezerro 365 colhidas antes e após o parto até 161 dias. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 2005.....**37**
- Tabela 12:** Resultados da detecção de anticorpos anti-*Babesia bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* pelo ELISA - teste em amostras de colostro/leite da búfala n. 130 no parto até 63 dias pós-parto. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 2005.**37**
- Tabela 13:** Resultados da detecção de anticorpos anti-*Babesia bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* pelo ELISA - teste em amostras de soros do bezerro búfalo n. 366, colhidas desde o nascimento até 119 dias de idade. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 2005.**42**
- Tabela 14:** Resultados da detecção de anticorpos anti-*Babesia bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* pelo ELISA - teste em amostras de soros da búfala 134, mãe do bezerro 366, colhidas antes e após o parto até 119 dias. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS,2005.....**43**
- Tabela 15:** Resultados da detecção de anticorpos colostrais anti-*Babesia bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*Anaplasma marginale* pelo ELISA-teste realizado em colostros/leite da búfala adulta 134, mãe do bezerro 366 colhidas no dia do parto e até aos 42 dias pós-parto. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 2005.**44**

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINAS
Figura 1: Resultados da detecção de anticorpos anti- <i>B. bovis</i> , anti- <i>B. bigemina</i> e anti- <i>A. marginale</i> detectados nos soros das búfalas adultas (n = 4 a 12) pelo teste ELISA indireto realizado em amostras colhidas sequencialmente com intervalos semanais, quinzenais e/ou mensais durante o período de 335 dias após o parto. * = Dias antes do parto. Selvíria, MS, 1999/2000.....	25
Figura 2: Níveis ELISA anti- <i>B. bovis</i> , anti- <i>B. bigemina</i> e anti- <i>A. marginale</i> detectados nos soros das búfalas adultas (n = 4 a 12) pelo teste ELISA indireto realizado em amostras colhidas sequencialmente com intervalos semanais, quinzenais e/ou mensais durante o período de 335 dias após o parto. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE= 3. * = Dias antes do parto. Selvíria, MS, 1999/2000.....	25
Figura 3: Resultados da detecção de anticorpos anti- <i>B. bovis</i> , anti- <i>B. bigemina</i> e anti- <i>A. marginale</i> detectados nos colostros/leite de 10 búfalas pelo teste ELISA indireto, realizado em amostras colhidas do parto aos 60 dias pós-parto. Selvíria, MS, 1999/2000.....	29
Figura 4: Níveis ELISA de anticorpos anti- <i>B. bovis</i> , anti- <i>B. bigemina</i> e anti- <i>A. marginale</i> detectados nos colostros/leite de 10 búfalas pelo teste ELISA indireto, realizado em amostras colhidas do parto aos 60 dias pós-parto. Linha contínua significa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3. Selvíria, MS, 1999/2000.....	29
Figura 5: Resultados da detecção de anticorpos anti- <i>B. bovis</i> , anti- <i>B. bigemina</i> e anti- <i>A. marginale</i> detectados nos soros de bezerros búfalos (n = 7 a 10) pelo teste ELISA indireto, realizado com amostras colhidas sequencialmente com intervalos semanais, quinzenais e/ou mensais por um ano após o nascimento. * = Dia do nascimento, sem mamar o colostro.	34
Figura 6 : Níveis ELISA de anticorpos anti- <i>B. bovis</i> , anti- <i>B. bigemina</i> e anti- <i>A. marginale</i> detectados nos soros de bezerros búfalos (n = 7 a 10) pelo teste ELISA indireto, realizado com amostras colhidas sequencialmente com intervalos semanais, quinzenais e/ou mensais por um ano pós	

nascimento. * = Dia do nascimento, sem mamar o colostro. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE= 3.....34

Figura 7: Resultados da detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros do bezerro búfalo 365. * Primeiro dia pós-nascimento antes de mamar o colostro. Selvíria,MS, 2005.....38

Figura 8: Níveis ELISA de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros do bezerro búfalo 365. * Primeiro dia pós-nascimento antes de mamar o colostro. Ilha Solteira, 2007. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3. Selvíria, MS, 2005.....38

Figura 9: Resultados de detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros da búfala nº 130. Selvíria, MS, 2007.....39

Figura 10: Níveis ELISA dos anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros da búfala nº 130. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3. Selvíria, MS, 2005.....39

Figura 11: Resultados de detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* no colostro da búfala nº 130. Ilha Solteira, 2005.....40

Figura 12: Níveis ELISA de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* no colostro da búfala nº 130. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3. Selvíria, MS, 2005.....40

Figura 13: Resultados de detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros do bezerro nº 366. * Dia do nascimento antes de mamar o colostro. Selvíria, MS, 2005.....45

Figura 14: Níveis ELISA de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros do bezerro nº 366. * Dia do nascimento antes de mamar o colostro. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3, Selvíria, MS, 2005.....45

Figura 15: Resultado de detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros da búfala nº 134. Selvíria, MS, 2005.....46

Figura 16: Níveis ELISA de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros da búfala nº 134. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3. Selvíria, MS, 2005.....46

Figura 17: Resultados de detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* no colostro da búfala nº 134. Selvíria, MS, 2005.....47

Figura 18: Níveis ELISA de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* no colostro da búfala nº 134. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3. Selvíria, MS, 2005.....**47**

**RESPOSTA IMUNE-HUMORAL DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)
INFECTADOS NATURALMENTE POR *Babesia bovis*, *B. bigemina* e
Anaplasma marginale.**

RESUMO: O objetivo do presente estudo foi analisar a resposta imune humoral, pelo monitoramento dos anticorpos anti-*Babesia bovis*, anti-*Babesia bigemina* e anti-*Anaplasma marginale*, em búfalos (*Bubalus bubalis*) naturalmente infectados. Para esta pesquisa, utilizaram-se amostras de soro e de colostro/leite de búfalas adultas do periparto aos 11 meses após, e de soros dos seus bezerros, durante o primeiro ano de vida nos anos de 1999/2000 e 2005. Para determinar o perfil da resposta imune humoral destes animais, utilizou-se o método ELISA indireto e os dados foram apresentados e analisados como a média de um grupo de animais, em diferentes faixas etárias e, individualmente. Após a leitura e interpretação dos dados, os resultados dos animais analisados em grupos apresentaram baixa concentração de anticorpos, ou seja, abaixo do ponto de corte (D.O. = 0,265 e NE=3) de anticorpos anti-*A. marginale* nos soros, durante os primeiros 90 e 105 dias após o parto e nascimento, respectivamente, para búfalas e seus bezerros. Em seguida, a concentração de anticorpos anti-*A. marginale* no soro dos bezerros búfalos aumentou ligeiramente acima do ponto de corte e manteve-se assim até atingirem aproximadamente um ano de idade, indicando uma imunidade adquirida, após o contato com a bactéria. Nas búfalas ocorreu soroconversão (NE acima de 3) para *Babesia* de ambas as espécies, por quase todo o período analisado, com uma elevação acentuada (NE=4 a NE=6) entre os dias 91 e 335 dias após o parto, fato não verificado para os bezerros, no mesmo período. No colostro/leite, os anticorpos anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* foram detectados nos primeiros sete dias pós-parto, mas não foram observados no teste anti-*A. marginale*. Quando os animais foram analisados individualmente (duas búfalas e seus bezerros), observou-se em um dos bezerros, uma forte imunidade humoral passiva contra *B. bovis*, mas não contra *B. bigemina* e *A. marginale*. Embora havendo uma variabilidade individual na resposta imune humoral, esta obedeceu ao mesmo padrão, ou seja, foi mais forte contra *B. bovis* e mais fraca contra *A. marginale*, mas com *B. bigemina* em uma categoria intermediária nos dois bezerros e nas duas búfalas. Pelos dados dos animais analisados ou em grupo ou individualmente, conclui-se que: A) as búfalas e os seus bezerros apresentaram resposta imune humoral contra *Babesia* e contra *Anaplasma*, havendo

transferência passiva de anticorpos colostrais, embora fraca, aos bezerros; B) estes últimos, apresentaram também imunidade ativa a partir de 105 dias de idade contra *A. marginale*; C) a imunidade contra *Babesia*, particularmente *B. bovis*, foi mais evidente nas búfalas adultas e, D) os búfalos, na região estudada foram considerados portadores resistentes dos agentes da babesiose e anaplasiose.

PALAVRAS CHAVE: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale*, *Bubalus bubalis*, anticorpos, búfalos, resposta imune-humoral.

**IMMUNE-HUMORAL RESPONSE OF WATER BUFFALOES
(*Bubalus bubalis*) NATURALLY INFECTED BY *Babesia bovis*,
B. bigemina e *Anaplasma marginale*.**

ABSTRACT: The aim of the present study was to analyze the humoral-immune response of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) naturally infected with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. For this work, colostrums/milk and blood samples were weekly, fortnightly and monthly harvested prior and after partum (buffalo cows) and from birth to 365 days after birth (buffalo calves). The antibodies in the colostrums/milk and serum samples from these animals were determined using an ELISA indirect method and the data were analyzed as a mean of a group of animals with matched ages during the period of 1999/2000 or individually during the year of 2005. The data from animals analyzed in group showed that the antibodies against *A. marginale* were in low concentration (below the cut off point, D.O. = 0.265 and ELISA levels, EL = 3), in the sera of buffalo, during the first 90 and 105 days, respectively for cows and calves. Then, the concentration of anti-*A. marginale* in the serum samples of buffalo calves, slightly raised to above the cut off point and kept in higher levels up to approximately 365 days after birth, indicating acquired immunity. Serum conversion for *Babesia* occurred in high levels and above the cut off point only for buffalo cows for all period of experimentation. The antibody levels against *Babesia* for both species and *Anaplasma* increased in the sera of buffalo cows between the days 91 and 335 after partum. In the colostrums, anti-*B. bovis* and anti-*B. bigemina* antibodies were detected in high levels during the first seven days after partum, but then abruptly declined to zero. Anti-*A. marginale*, on the other hand were not detected in the colostrums of these animals. When four animals (two buffalo cows and their calves) were individually analyzed it was observed an individual variation in the immune response: in one buffalo calf there was a strong passive acquired immunity only against *B. bovis*, but not against *B. bigemina* and neither *A. marginale*; however, the other calf showed

passive immunity against all three organisms. Although there was this individual variation, the immune response was stronger against *B. bovis* and weaker against *A. marginale* in buffalo cows and calves. Anti-*B. bigemina* antibodies were always detected in an intermediate level when the animals were analyzed in group or individually. By conclusions: A) buffalo cows and calves showed an humoral-immune response against *Babesia* and *Anaplasma* and there was a passive transference of antibodies from the colostrums to the calves; B) the calves acquired active immunity against *A. marginale* after 105 days of age; C) immunity against *Babesia*, particularly *B. bovis* was stronger in buffalo cows than in calves, and D) the buffaloes were considered resistant reservoir of babesiosis and anaplasmosis in this region of study.

KEY WORDS: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale*, antibody, *Bubalus bubalis*, immune-humoral response, water buffalo.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Bubalus bubalis*, conhecida como búfalo d'água, é originária da Ásia, da qual derivam pelo menos 12 raças indianas, sendo, no Brasil, as mais comuns: Murrah, Jaffarabadi, Mediterrâneo e Carabao. Os búfalos são considerados animais rústicos e bem adaptados ao nosso meio, possuem grande potencial zootécnico para os seus produtos, como carne e leite, tendo ainda grande valor agregado em seu subproduto, o couro (FRANZOLIN-NETO, 1993; OLIVEIRA, 1993; BERNARDES & BERNARDES, 1993) e ainda servem como animais de trabalho.

O regime predominante de criação de búfalos, muitas vezes, é extensivo, os animais alimentam-se de pastagens nativas, pois possuem boa capacidade de aceitação de forragem grosseira, mas preferem lugares alagadiços e sofrem em lugares de pouco sombra. O maior rebanho de búfalos do mundo pertence à Índia e o segundo à China, enquanto o rebanho brasileiro está estimado em 1.085.754 cabeças (ANUALPEC, 2004).

Os búfalos apresentam características específicas e algumas são únicas, como a rusticidade, a precocidade e a resistência a algumas doenças. Entretanto, pelo hábito de búfalos permanecerem aglomerados por longos períodos, em locais úmidos e alagadiços, as infecções parasitárias se sobressaem. Estes ambientes são extremamente favoráveis ao ciclo de vida de diferentes parasitos, além da manutenção e proliferação de vetores transmissores de doenças (COCKRILL, 1981).

Os búfalos albergam endoparasitos, como nematódeos, cestódeos e trematódeos; ectoparasitos como carrapatos (*Rhipicephalus* spp, *Anocenter nitens* e *Amblyomma* spp), sarnas, piolhos (*Haematopinus tuberculatus*) e dípteros (*Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans*, culicídeos e tabanídeos). Alguns ectoparasitos, além de espoliar o hospedeiro, transmitem enfermidades infecciosas

e parasitárias, dentre essas, os hemoparasitos protozoários das espécies *Babesia bovis*, *B. bigemina* e a bactéria *Anaplasma marginale* (MOHAN, 1968).

Os hemoparasitos intra-eritrocitários *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* são de grande importância econômica na bovinocultura do Brasil, causando o que é denominado popularmente, de Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (FARIAS & LEMOS, 2002).

Os búfalos, por serem animais considerados resistentes às enfermidades de maneira geral, muitas vezes, encontram-se infectados, mas sem manifestarem sinais clínicos evidentes. Dessa forma, eles podem ser considerados reservatórios das enfermidades e potencialmente uma fonte de infecção para rebanhos susceptíveis. No entanto, informações sobre as infecções de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, ao longo da vida útil dos búfalos, são pouco conhecidas, principalmente sobre a manifestação clínica da TPB e a resposta imune humoral aos agentes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A tristeza parasitária bovina (TPB) tem como agentes parasitários os protozoários do gênero *Babesia* e a bactéria *Anaplasma* que são responsáveis por grandes prejuízos econômicos no Brasil quando acometem bovinos, seus principais hospedeiros (OLIVEIRA, 1983; GRISI et al., 2002). No entanto, espécies dentro desses gêneros podem infectar diferentes hospedeiros, como ruminantes selvagens, canídeos, felídeos, roedores, inclusive o búfalo d' água e o búfalo africano, por meio de vetores biológicos (carrapatos) e mecânicos (insetos hematófagos) (PUMELL, 1981; KUTTLER, 1984; DUMLER et al., 2001; FARIAS & LEMOS, 2002; DE LA FUENTE et al., 2005).

Babesia (Starcovisi, 1893) é um protozoário Piroplasmida, intra-eritrocitário da família Babesiidae (Poche, 1913), que se multiplica em hospedeiros vertebrados e invertebrados (carrapatos). O primeiro relato de transmissão de babesiose a bovinos, por meio de carrapatos *Boophilus annulatus* oriundos de ovos de teleóginas que haviam se alimentado em bovinos infectados, foi realizado por SMITH & KILBOURNE (1893), nos Estados Unidos, sugerindo um ciclo transovariano nos carrapatos.

Em seguida, a descrição de um provável estágio de reprodução sexuada de *Babesia* em carrapatos foi realizada em 1906, concomitantemente, por Koch e por Klein para *B. bigemina* e *B. canis*, respectivamente (MELHORN & SCHEIN, 1984). Via hemolinfa, os esporocinetos de *Babesia*, se dispersam para diversos órgãos da teleógina e realizam vários ciclos de esporogonia nos hemócitos, células musculares, células peritraqueais, tubos de Malpighi, epiderme e células ovarianas. Estes ciclos de esporogonia continuam até a morte da teleógina após a postura (HODGSON, 1992). Comprovada a ocorrência de reprodução sexuada nos parasitas do gênero *Babesia* constata-se que o ciclo evolutivo desses protozoários segue o padrão típico de desenvolvimento dos esporozoários (MELHORN & SCHEIN, 1984). Para *B. bovis*, os esporozoítas podem ser encontrados nas

glândulas salivares das larvas a partir do segundo dia da alimentação, enquanto para *B. bigemina*, apenas após o oitavo dia de fixação quando os carrapatos se encontram na fase de ninfa (DALGLESH & STEWART, 1983).

Os protozoários penetram no organismo do hospedeiro pela saliva dos carrapatos infectados, após o repasto sanguíneo. Nos vertebrados, os parasitos desse gênero multiplicam-se assexuadamente por divisão binária simples no interior dos eritrócitos, rompendo-os e penetrando em novas células, dando seqüência ao ciclo evolutivo (KUTTLER, 1998; FARIAS & LEMOS, 2002; QUINTÃO & RIBEIRO, 2003).

O carrapato monoxênico, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, é o ectoparasita hematófago com maior distribuição pela América Central e do Sul, África, Oceania e Ásia, sendo ele o único vetor biológico descrito para a transmissão e a multiplicação de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*. Este vetor, originalmente infestava antílopes, cervos, bovinos e búfalos selvagens no Sudeste Asiático. Posteriormente, sua dispersão ocorreu para as diferentes regiões do globo terrestre localizadas geograficamente entre os paralelos 32º Norte e 35º Sul, seguindo a migração do gado zebu (NUÑEZ et al., 1985). Em revisão bibliográfica, GONZALES (2002) relatou que o carrapato do boi, presumivelmente, antes de infestar os bovinos na América do Norte e no México, foi parasita de cervídeos.

No Brasil, há poucos relatos sobre a prevalência de carrapatos em búfalos d'água. ROCHA et al. (1969), em Sertãozinho/SP, verificaram a presença da infestação natural por *R.(B.) microplus* e *Anocenter nitens* em nove bubalinos, distribuídos mormente nas regiões de pele fina e de pêlos mais curtos. STARKE et al. (1985), em Selvíria/MS, realizaram colheitas semanais dos estádios parasitários de *R. (B.) microplus* em búfalos durante um ano. Observaram que 74,7% do total de carrapatos apresentavam-se na fase de larva, 21,3% de ninfa, 1,8% de macho e 2,2% de fêmea. Neste trabalho, ficou claro que as larvas estabeleciam-se, principalmente, nos bezerros ao redor dos primeiros meses de vida, provocavam uma intensa reação inflamatória na pele e somente poucas larvas conseguiam atingir o estágio adulto. Distribuíam-se preferencialmente na região entre pernas, períneo, barbelas, cabeça e pavilhão auricular. Em outro trabalho realizado por

STARKE et al. (1994), na mesma região do trabalho anterior, foi comparado o grau de infestação natural por *R.(B.) microplus* em bovinos zebuínos (raça Guzerá) e em búfalos (mestiços: Mediterrâneo x Murrah) da mesma faixa etária, mantidos juntos por um ano no mesmo piquete. Estes autores verificaram que, apesar desses animais permanecerem sob as mesmas condições climáticas, de manejo e alimentação, os bovinos apresentaram-se com seis vezes mais carrapatos adultos do que os búfalos, demonstrando maior adaptabilidade destes ixodídeos aos bovinos. Em relação às condições climáticas, o período seco do ano (abril a outubro) mostrou maior prevalência destes ectoparasitas (STARKE et al., 1994), tanto em bovinos como em búfalos. No geral, raramente os búfalos adultos encontram-se infestados por carrapatos, mesmo coabitando as mesmas pastagens dos bovinos (STARKE-BUZETTI em comunicação pessoal).

O Brasil é um país continental, com biomas diversificados e, por ser muito difícil a erradicação do carrapato em regiões de clima tropical, a manutenção da imunidade contra os agentes da Tristeza Parasitária Bovina é de suma importância para amenizar ao máximo as perdas econômicas (FURLONG, 1993). De acordo com FURLONG & EVANS (1991), no Brasil *R.(B.) microplus* encontra condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento, do extremo Sul em direção ao Norte, possibilitando-lhe completar de 2,5 a 4, com potencial de até 5 gerações/ano, em locais com temperatura média anual acima de 17°C. Estações secas severas podem limitar a sobrevivência do carrapato, paralisando a incubação, postura, e até mesmo o fracasso do estádio. Quando à infestação do hospedeiro, depende da larva dormente no inverno, o tipo de pastagem como *Brachiaria decumbens*, e o tempo de pastoreio, podem influenciar a dinâmica da população de carrapatos nos animais (GAUSS & FURLONG, 2002). Nos bovinos, a manifestação clínica da tristeza parasitária, causada por *Babesia* e *Anaplasma*, está na dependência da presença do vetor, caracterizando a região para condições de instabilidade e/ou estabilidade enzoótica, do clima, do manejo dos animais, das condições fisiológicas do hospedeiro, da raça e de outros fatores (ARTECHE, 1992; FONSECA et al., 2000; SOUZA et al., 2000ab).

No Brasil, os primeiros casos clínicos fatais de babesiose bovina em bezerros e bovinos adultos recém importados foram observados no Estado do Rio de Janeiro (FAJARDO, 1901). Nos bovinos, a babesiose progride de forma aguda a crônica, dependendo do curso da infecção. Mais precisamente, quando ocorre a lise dos eritrócitos parasitados, subseqüentemente os sinais clínicos aparecem, como anemia, icterícia, hemoglobinúria, incoordenação motora e sintomas de hipertermia, dispnéia e taquicardia. A evolução da doença está intimamente ligada com a idade do hospedeiro, imunidade humoral pelos anticorpos colostrais, quantidade do inócuo, virulência da amostra e do estado nutricional do animal (KUTTLER, 1998).

Nos bovinos, a prevalência da babesiose é diferente quando se analisa o fator idade dos hospedeiros, sendo mais comum nos animais mais jovens. MADRUGA et al. (1984), no Mato Grosso do Sul, observaram que a maior freqüência de babesiose ocorria na faixa etária de 30 a 120 dias, e que 100% dos animais estavam positivos para *B. bovis* aos 87 dias. Estudos nas regiões da Zona da Mata mineira, com bovinos de dois anos de idade, revelaram uma prevalência de 61,7% a 97,2% para *B. bovis* e de 59,5% a 88,9% para *B. bigemina* (PATARROYO et al., 1987). Em Santana do Livramento/RS, MARTINS et al. (1994) constataram que a prevalência de anticorpos anti-*B. bovis* em bovinos com aproximadamente 11 meses de idade, variava de 15% a 80%. Na região de Londrina/PR, bezerros com idades entre 13 a 60 dias, eram mais susceptíveis aos agentes da tristeza parasitária do que quando mais velhos (VIDOTTO et al., 1999).

Na babesiose, existe um período considerado de risco aos bovinos. Este período foi observado no rebanho leiteiro de Minas Gerais quando os títulos de anticorpos sorológicos estavam mais baixos e englobavam animais entre 35 a 105 dias de idade (MONTEIRO et al., 1997), ou de dois a quatro meses em áreas enzoóticas do Estado de Mato Grosso do Sul (MADRUGA et al., 1997).

Das 71 espécies do gênero *Babesia* listadas por LEVINE (1971), 18 causam doenças em mamíferos domésticos, mas somente quatro espécies (*B. bigemina*, *B. bovis*, *B. major* e *B. divergens*) foram relacionadas aos bovinos (BROCKLESBY, 1976) e três espécies aos búfalos (*B. bovis*, *B. bigemina* e *B.*

orientalis). No entanto, a *B. orientalis*, tendo como vetor biológico o carrapato *Rhiphicephalus haemaphysaloides haemaphysaloides*, foi considerada patogênica somente para os búfalos e não para os bovinos (LIU et al., 1997).

Na província de Hubei, da China, a infecção natural de búfalos por *B. orientalis*, quando examinados por meio de provas imunológicas, apresentou a prevalência de 74,7% (YAO et al., 2002). Este país, por possuir o segundo maior rebanho bubalino do mundo e em franca expansão, a babesiose nas criações industriais é bastante preocupante e, dessa forma, várias medidas de controle profilático são tomadas incluindo a utilização de vacinas (LIU et al., 1984; ZHAO et al., 2002). No entanto, segundo BANERJEE et al. (1988), os búfalos quando parasitados não sofrem tão severamente, mas podem ser reservatórios em potencial de *B. bigemina* para os bovinos, quando estes coabitam as mesmas pastagens, transmitindo-a aos últimos, por meio dos carrapatos.

Na Índia, os búfalos, em condições naturais, são raramente acometidos pela forma clínica da babesiose e acredita-se que sejam refratários a essa infecção por causa da resistência imunológica natural (ROYCHOUDHURY & GAUTAM, 1979). Porém, trabalhos mais recentes relatam a babesiose como preocupante no rebanho bubalino da Índia. Assim, MURALEEDHARAN et al. (1984) mencionaram que *B. bigemina* era comum tanto em búfalos como em bovinos. As suas manifestações clínicas nos búfalos ocorriam entre duas a três semanas após a infestação pelo vetor, e apresentavam como principal característica a anemia e a hipertermia, que podiam evoluir para hemoglobinúria, devido à destruição intravascular dos eritrócitos. Já a babesiose por *B. bovis* em búfalos não era tão freqüentemente diagnosticada (MURALEEDHARAN et al., 1984). MIRANPURI et al. (1988) detectaram a presença de *B. bigemina* no sangue de 194 búfalos, quando o ixodídeo *R. (B.) microplus* destacava-se em número e em prevalência nestes hospedeiros. Ainda nesse país, outro trabalho relatando a importância de *B. bigemina* para búfalos foram realizadas por MISHRA et al. (1998), os quais verificaram a prevalência de 7,4% em bezerros, em várias regiões, consideradas enzooticamente estáveis para carrapatos.

No Brasil, há poucos relatos sobre babesiose em búfalos. No entanto, FRANZOLIN NETO et al. (1989) comentaram que, em nosso meio, não é incomum o encontro de animais com sinais clínicos da babesiose, principalmente em bezerros de três a seis meses de idade. No primeiro relato de um caso clínico de anaplasmosose e babesiose em búfalos no Estado de São Paulo, os autores acima constataram diferentes partes do corpo dos búfalos infestados por carrapatos e a ocorrência dos agentes intra-eritrocitários em esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa. Posteriormente, GUIDO et al. (1994), também em São Paulo, examinando um rebanho bubalino com 500 cabeças, detectaram anticorpos anti- *Babesia* sp em 49,4% dos animais pelo teste de imunofluorescência indireta. Contudo, quando COSTA et al. (1997) examinaram um grupo de 20 bezerros búfalos do nascimento até um ano de idade, no Estado de São Paulo, verificaram que apenas três destes animais foram sororeagentes para *Babesia* sp; dois bezerros estavam positivos para *B. bovis* e um para *B. bigemina*. Os búfalos com babesiose, no Estado do Pará, segundo LÁU (1999), podem apresentar sinais clínicos como prostração, anorexia, emagrecimento, taquicardia e taquipnéia. Além disso, as fêmeas prenhes tendem a abortar, e os animais parasitados procuram se afastar do rebanho. À necropsia, a vesícula biliar encontrava-se distendida, com bile verde escura e espessa, o baço friável e sensivelmente hipertrofiado, com o sangue fino e aquoso (LÁU, 1999).

Anaplasma marginale (Theiler, 1910) é um outro agente intra-eritrocitário, também responsável pela tristeza parasitária bovina (TPB). É uma bactéria pertencente à Família Anaplasmataceae, da Ordem Rickettsiales, classificada como genotipo Ehrlichial II (DUMLER et al., 2001). Esse agente apresenta-se como corpúsculos intra-eritrocitários, que se localizam periféricamente na superfície dos eritrócitos, e multiplicam-se por divisão binária simples ou múltipla. São visualizados em microscopia óptica como pequenos pontos escuros, de localização periférica, variando entre 0,1 a 0,8 μm (VIDOTTO & MARANA, 2001).

Os carrapatos transmitem biologicamente *A. marginale* após multiplicações dentro de vários tecidos do ixodídeo. A transmissão do parasita no vetor biológico ocorre de estágio para estágio, transestadialmente ou dentro do mesmo estágio

intra-estadialmente. Os machos ixodídeos desenvolvem infecções generalizadas persistentes nas quais muitos tipos de células se tornam infectadas com *A. marginale* (KOCAN et al., 1992; GE et al., 1996). A transmissão intraestadial por ixodídeos machos é vista como um importante mecanismo de transmissão, porque os carrapatos machos podem se infectar após um curto período de alimentação em bovinos infectados e, então, transmitir a infecção durante as alimentações sucessivas em muitos bovinos. Os carrapatos machos, portanto, servem de reservatórios da infecção (ERICKS et al., 1983).

Além disso, a presença de DNA de *A. marginale* em larvas originárias de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* sugere uma transmissão transovariana (SHIMADA et al., 2004), aumentando em muito o risco da manutenção da infecção entre os animais, principalmente através das larvas.

A transmissão mecânica de *A. marginale* entre os bovídeos também pode ocorrer e pode dar-se por insetos picadores e fômites (agulhas e material cirúrgico) (LA FUENTE et al., 2005). Os dípteros hematófagos como a *Haematobia irritans exigua* (ALLINGHAM et al., 1994), *Stomoxys calcitrans* (POTGIETER et al., 1981), culicídeos e tabanídeos são incriminados na transmissão mecânica da rickettsia *A. marginale*. Mais recentemente, LA FUENTE et al. (2005) detectaram DNA de *A. marginale* na probóscide de tabanídeo, sugerindo que estas moscas podem atuar como importantes vetores mecânicos.

A anaplasmose é considerada uma das hemoparasitoses mais prevalentes nos bovinos (BARBET et al., 1987; PALMER, 1989). GUGLIELMONE (1995) avalia que, nos Estados Unidos e nos países da América Central e do Sul, excetuando-se a Argentina e o Uruguai, a anaplasmose é um problema mais sério do que a babesiose.

Alguns levantamentos epidemiológicos têm mostrado uma relação direta da anaplasmose em búfalos com a infestação de carrapatos. Dessa forma, MIRANPURI (1988) relatou 6,2% e 14,9% de búfalos infectados com *A. marginale* em duas localidades da Índia e, na primeira localidade, o carrapato *R. (B.) microplus* representava 75,3% da população de ixodídeos identificados nestes animais. Contudo, estudos realizados com 250 búfalos no Paquistão por RAJPUT

et al. (2005) evidenciaram que 30% deles estavam infectados com *Anaplasma* sp, mesmo encontrando-se pouco infestados com carrapatos. Em áreas endêmicas para o carrapato *R. (B.) microplus*, como na Austrália, *A. marginale* e *B. bigemina* foram imunodiagnosticados em 7,5% das amostras de soros de 121 búfalos (CALLOW et al., 1976).

Embora a anaplasmoze clínica não seja muito freqüente em búfalos, Srivastava & Ahluwalia (1974), citado por LAU (1999), descreveram um caso clínico: o búfalo apresentava anemia hemolítica primária que se acentuava conforme aumentava a proporção de eritrócitos infectados. No entanto, na maioria das vezes, ocorria baixa parasitemia com a doença evoluindo para inapetência, depressão, parada da ruminação, emagrecimento, fezes escuras, taquicardia, taquipnéia, constipação intestinal e mucosas ictéricas e pálidas. Como não há destruição dos glóbulos vermelhos na anaplasmoze, os eritrócitos infectados são posteriormente, fagocitados por macrófagos, especialmente no baço, resultando em um quadro de intensa anemia, mas sem ocorrer hemoglobinúria e hemoglobinemia. À necropsia, observam-se esplenomegalia, hepatomegalia, rins congestos e o sangue mostrando-se aquoso (SRIVASTAVA & AHLUWALIA, 1974). Em ensaios experimentais com bezerros búfalos, SHARMA (1987) detectou anticorpos anti-*A. marginale*, entre 27 a 32 dias após a infecção, e observou que o parasito não era tão agressivo ao hospedeiro, mas o búfalo podia ser um reservatório da infecção.

Mundialmente, são apresentadas inúmeras técnicas e suas respectivas padronizações para diagnosticar babesiose e anaplasmoze e, destas, as mais utilizadas são a reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimáticas (ELISA-teste) por serem menos onerosas, quando comparadas com as moleculares, e por apresentarem maior sensibilidade, quando comparadas ao exame parasitológico direto em lâminas sob microscopia óptica (MACHADO et al., 1997; KESSLER et al., 2001; VIDOTTO & MARANA, 2001; ARAÚJO et al., 2003). Essas técnicas são mais seguras, eficazes e valiosas para os estudos epidemiológicos e são mais apropriadas para se trabalhar com grandes amostragens (VIDOTTO et al., 1997b; ARAÚJO et al., 1998, SOUZA et al., 2000b;

MADRUGA et al., 2001). No Brasil, a padronização do ELISA-teste indireto para detecção de anticorpos anti-*B. bovis* em soro bovinos oriundos de áreas endêmicas para *R. (B.) microplus*, foi iniciada no Estado de São Paulo por MACHADO et al. (1997), demonstrando a eficácia do ensaio no diagnóstico de babesiose em bovinos, em que as novilhas foram mais soropositivas do que os bezerros.

Com relação aos búfalos, há poucos relatos na literatura, abordando a idade do hospedeiro como fator de risco para tristeza parasitária. Apenas o de COSTA et al. (1997), que determinaram os níveis de anticorpos anti-*Babesia* sp em bezerros búfalos desde o nascimento até um ano de idade, provenientes do município de Sarapuú, SP, totalizando 267 amostras. Neste estudo, os autores verificaram que apenas três (1,1%) animais apresentaram sorologia positiva para *Babesia* sp. Quando analisados individualmente, uma fêmea e um macho foram imunoreagentes à *B. bovis*, do nascimento aos 15 e 30 dias de idade, respectivamente; duas fêmeas soropositivaram aos 2 e 15 dias, mas para *B. bigemina*. A partir dessas idades, houve queda dos títulos de anticorpos colostrais, mas uma destas fêmeas voltou a apresentar anticorpos contra a infecção por *B. bigemina* somente aos 12 meses de idade. (COSTA et al., 1997). Os autores atribuíram ao grande número de animais não imunoreagentes, provavelmente à maior resistência dos bubalinos aos carrapatos na região estudada.

Ainda, GOMES et al. (2006), em Selvíria/MS, verificaram que tanto as búfalas adultas como os seus bezerros analisados do parto/nascimento aos três meses subseqüentes, apresentavam títulos de anticorpos anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* pelo ELISA indireto, demonstrando o desenvolvimento de uma resposta imune humoral nestes animais.

O sistema imune do bovúdo recém-nascido é funcionalmente imaturo. Assim, a ingestão de colostro após o nascimento é muito importante. Os bezerros, ao nascerem, podem apresentar imunidade passiva desde que anticorpos maternos presentes no colostro sejam absorvidos por eles. A placenta dos ruminantes é do tipo sindesmocorial, ou seja, o epitélio coriônico fica em contato direto com os tecidos uterinos. Assim, esse tipo de placenta não permite a

passagem de imunoglobulinas ao feto e o recém-nascido fica totalmente dependente dos anticorpos recebidos do colostro. A IgG é a imunoglobulina predominante no colostro destes animais, correspondendo de 65% a 90% das imunoglobulinas colostrais. Essa imunidade é gradualmente substituída pela imunidade ativa através da infecção natural (TIZARD, 2002). Nas búfalas, 80% das proteínas do colostro são representadas pelas imunoglobulinas, o que revela sua importância durante as semanas iniciais de vida do bezerro (SILVA et al., 1993). Porém, para a absorção ser máxima, a primeira mamada deve ocorrer no máximo até as primeiras seis horas de vida, porque com o passar do tempo, a absorção das imunoglobulinas pelas vilosidades intestinais diminui gradualmente. Após 24 horas de vida, o intestino não absorve mais as imunoglobulinas devido à diminuição da permeabilidade das células epiteliais intestinais. Em geral, a permeabilidade é mais alta imediatamente após o nascimento e declina após seis horas, caindo para níveis de absorção relativamente baixos após 24 horas (SILVA et al., 1993; TIZARD, 2002; ESCRIVÃO et al., 2005). Segundo GHIONNA et al. (1987), as concentrações de IgG colostrais da mãe bubalina sofrem significativo decréscimo entre 4 e 60 horas pós-nascimento.

Em bovinos, a formação do colostro acontece principalmente durante as quatro últimas semanas que antecedem o parto, período no qual ocorre a migração das imunoglobulinas presentes na corrente sanguínea da mãe para a glândula mamária. O processo de transporte é seletivo, predominando a transferência de IgG e, mais especificamente, IgG1. A passagem ocorre através das células alveolares e, aparentemente, está envolvida com a presença de receptores na membrana das mesmas (MACHADO NETO et al., 1995). Nos bovinos de leite, provavelmente em razão da especialização, já foi demonstrado que a migração de imunoglobulinas séricas para a glândula mamária, durante a formação do colostro, determina como consequência uma queda de concentração desta proteína na corrente sanguínea, nas últimas semanas pré-parto (MACHADO NETO et al., 1995).

Ainda em bovinos, nas regiões onde o carrapato é endêmico, os animais jovens estão protegidos da infecção de *Babesia* sp por meio da imunidade

colostral. A manutenção da taxa de inoculação mínima de 0,005 de *B. bovis* e *B. bigemina* é indicativo de que pelo menos 85% do rebanho, tenham-se infectado antes dos nove meses de idade, pelos diversos vetores, sendo importante em áreas de estabilidade enzoótica. Tal condição propicia o desenvolvimento de imunidade ativa que irá protegê-los de novos desafios na fase adulta (GUGLIELMONE, 1995; LABRUNA & MACHADO, 2006). Assim, a imunidade passiva recebida via colostro é de extrema importância para proteção dos bezerros contra tristeza parasitária (KROLOW et al., 2002 ab). SILVA et al. (2003) verificaram que as matrizes bovinas eram soropositivas para *A. marginale*, assim como 100% dos bezerros analisados aos cinco dias de idade. Este trabalho foi conduzido durante a primavera no Rio Grande do Sul, em uma área marginal para *R.(B.) microplus* e sugere uma proteção dos bezerros por via passiva colostrálica.

Também, ANDRADE et al. (2001), estudando a dinâmica da infecção natural de *A. marginale* em bezerros holandeses, em Londrina/PR, verificaram que dos 10 bezerros investigados após o nascimento, nove apresentaram-se positivos com anticorpos colostrálicos detectados até o terceiro mês de idade, que declinaram a seguir e voltaram a ascender nos meses seguintes, após os animais se infestarem com *R.(B.) microplus*. E em outras amostras de soro, também oriundos de animais de Londrina/PR, verificou-se que a infecção dos bezerros por *A. marginale* dependia do nível de anticorpos ingeridos no colostro e o grau de infestação pelo carrapato *R.(B.) microplus* (PACHECO et al., 2004).

Em bovinos da raça Nelore, na região de Umuarama, PR, OSAKI et al. (2002) e YOSHIHARA et al. (2003), acompanhando soros de 14 bezerros desde o nascimento até os seis meses de idade, verificaram que 13 (92,9%) e 12 (85,7%) deles eram soropositivos, respectivamente para *B. bovis* e *A. marginale* ao nascimento, constatando a transferência de anticorpos colostrálicos. Posteriormente, utilizando a técnica nPCR, ANDRADE et al. (2004) detectaram a presença de DNA de *A. marginale* em 50% das mães e 30% dos bezerros no dia do parto, antes da ingestão de colostro e 10 dias após, comprovando a transmissão transplacentária do agente. Além disso, detectaram também, a presença de anticorpos anti-*A. marginale* pelo técnica de ELISA indireto, em 60% das mães e em 40% dos

bezerros no dia do parto e após a ingestão do colostro, respectivamente, comprovando, assim, a aquisição da imunidade adquirida pelo colostro contra *A. marginale*. Bovinos que se recuperam da anaplasmose aguda podem permanecer persistentemente infectados (portadores) e servem como reservatórios para transmissão a bovinos não infectados, porém alguns portadores podem se curar espontaneamente da infecção (MAAS et al., 1986).

Segundo COCKRILL (1981), os búfalos são considerados resistentes a diversas doenças, mas quando submetidos a manejos nutricionais precários e confinados em regimes intensivos com alta taxa de lotação, podem apresentar sinais clínicos de inúmeras doenças. Dessa forma, embora os búfalos sejam considerados mais refratários aos agentes da tristeza parasitária, Mottelib (1987), citado por COSTA et al. (1997), verificou que os bezerros bubalinos com baixa resistência orgânica, quando infectados experimentalmente por *B. bigemina*, podiam desenvolver a doença de uma forma bastante severa. Entretanto, alguns autores relatam o aspecto incomum dos búfalos apresentarem sinais clínicos evidentes de tristeza parasitária, principalmente em bezerros de três a seis meses de idade (MURALEEDHARAN et al., 1984; FRANZOLIN NETO et al., 1989; LÁU, 1999).

Tendo em vista que, a tristeza parasitária bovina no Brasil, que é a causa de grandes perdas econômicas, e devido a existência de carências de informações nesta área, mormente em bubalinos, atualmente em grande expansão nas regiões como Sudeste e Sul, é que motivaram o presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o perfil da resposta imune-humoral através da detecção de anticorpos IgG anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* pelo ELISA-teste indireto em búfalos (*Bubalus bubalis*), criados em condições naturais, no município de Selvíria, Mato Grosso do Sul.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Analisar a resposta imune-humoral de um grupo de búfalos, em diferentes faixas etárias, através do:

- Monitoramento dos anticorpos séricos de búfalas, antes e após o parto, e de seus respectivos bezerros após o nascimento, durante um período de um ano.

- Monitoramento dos anticorpos colostrais das búfalas desde o parto até dois meses após.

3.2.2 Analisar a resposta imune-humoral individual de duas búfalas, antes e após o parto, e de seus respectivos bezerros após o nascimento, durante um período de cinco meses.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local, clima, animais e manejo geral da fazenda.

O experimento a campo foi executado na Fazenda Experimental de Ensino e Pesquisa da UNESP, campus de Ilha Solteira, situada às margens do Rio Paraná, no município de Selvíria, no Estado de Mato Grosso do Sul.

O clima da região é tropical, característico do Cerrado, com temperatura mensal variando de 17 a 32°C, média anual em torno de 24°C e precipitação pluvial anual de 1.300 mm. Os dados climáticos dos anos de 1999/2000 e 2005 indicaram duas estações bem definidas; um período seco (maio a setembro) e um o outro chuvoso (outubro a abril). Nos períodos secos, a precipitação pluvial mensal foi inferior a 50 mm, na maioria dos meses, e a temperatura mensal foi em torno de 20°C. O período chuvoso apresentou temperaturas médias mais altas, superiores a 26°C e com precipitação mensal sempre acima de 100 mm (anexos 7 e 8).

O rebanho bubalino foi constituído por búfalos d'água (*Bubalus bubalis*) mestiços (Murrah x Mediterrâneo), com fêmeas em idade média de 10 anos e seus respectivos bezerros, machos e fêmeos em diferentes idades e, um touro da raça Murrah. No período de execução do experimento, as búfalas e seus respectivos bezerros foram assistidos antes e após o parto.

O regime de criação destes animais foi extensivo com os bezerros búfalos permanecendo junto com as mães até o desmame, pois as búfalas não eram ordenhadas. O rebanho foi mantido em um piquete de 12 ha com pastagem formada por capim braquiária (*Brachiaria decumbens*) e mantinha contato esporádico com o rebanho bovino da Fazenda Experimental, animais da raça Guzerá. A reprodução dos animais deste rebanho era feita através de monta natural, com nascimentos concentrados entre janeiro a abril de cada ano.

Como o material utilizado para a presente pesquisa foram os soros, tanto sanguíneos quanto colostrais, provenientes de uma soroteca, não se realizou durante o período da obtenção destes soros, as contagens de ectoparasitas,

incluindo os ixodídeos e os muscídeos, visto a não inclusão desta pesquisa no delineamento experimental.

4.2 Soroteca (Banco de Soro).

O material da presente pesquisa constituiu-se pelas amostras sorológicas provenientes de uma Soroteca armazenada em freezer a -70°C do Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Biologia e Zootecnia da UNESP, Campus de Ilha Solteira.

As amostras provenientes de soro sanguíneo e colostrado de búfalas adultas e do soro sanguíneo de seus respectivos bezerros foram colhidas entre os meses de fevereiro de 1999 a março de 2000, como descrito a seguir:

- As amostras de sangue para a obtenção do soro foram colhidas das búfalas ($n = 4$ a 12) 14 dias antes, no dia do parto e até 11 meses após o parto. Seguiu-se então, colhendo as amostras semanalmente nos primeiros dois meses, quinzenalmente até seis meses e mensalmente até aproximadamente 11 meses pós-parto.

- As amostras de colostro/leite das búfalas ($n = 10$) foram colhidas, através de ordenha manual no dia do parto e semanalmente por um período de dois meses.

- As amostras de sangue dos bezerros ($n = 7$ a 10) foram colhidas no dia do nascimento, antes de receber o colostro e no decorrer das primeiras 24 horas de amamentação. As colheitas foram realizadas simultaneamente com suas mães, conforme descrito acima, por um período de um ano. No dia do parto, os bezerros recém nascidos eram retirados de suas mães para a colheita das amostras de sangue antes de mamarem o colostro.

Para análise dos dados os animais foram agrupados dentro de faixas etárias similares, e o resultado foi expresso como média do grupo dentro do intervalo de tempo estudado. O número de animais em cada grupo variou de 4 a 12 búfalas (média de 9,4) e de 7 a 10 bezerros (média de 9,3). Este número de animais

dentro de cada faixa etária foi variável devido à dificuldade de colheita de sangue de alguns deles.

Com intuito de enriquecer as investigações decidiu-se, no ano de 2005, colher amostras de colostro/leite e de sangue de duas búfalas e de seus respectivos bezerros em intervalos variando de 7 a 29 dias, antes e a partir do parto e/ou do nascimento, por um período de aproximadamente cinco meses. Os dados destes animais foram analisados individualmente.

Para melhor compreensão e interpretação, os resultados foram analisados e citados no texto como dados obtidos do grupo (dados médios) e/ou individuais (4 animais analisados individualmente).

4.3 Ensaio imuno enzimático - ELISA indireto

Os testes ELISA indireto foram realizados no Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (FCAV/UNESP).

Para detecção da resposta imune humoral dos animais naturalmente infectados por *A. marginale*, *B. Bovis* e *B. bigemina* e do grupo controle (não infectado). As amostras de soros sanguíneos e de colostro/leite foram submetidas ao teste ELISA indireto, segundo a técnica de MACHADO et al. (1997) modificada para *B. bovis*, e conforme descrição de BALDANI et al. (2004). A concentração do antígeno de *B. bovis* e *B. bigemina* foi de 5 µg/ml e de *A. marginale* 10 µg/mL. Resumidamente, o teste ELISA foi realizado da seguinte forma: 100 µl da solução antigênica diluída em tampão carbonato/bicarbonato (0,05M, pH 9,6) adicionada em cada orifício da microplaca de ELISA de 96 orifícios, (Nunclon™ Surface; Nunc, Denmark). A cada intervalo das reações, a microplaca foi lavada 3 vezes em uma solução de PBS-Tween 20 (0,05% Tween-20: Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate, Sigma® P-7949), pH 7,4). Após incubação por 12 horas a 4°C, adicionou-se a solução de bloqueio, constituída de 5% de leite em pó desnatado (Molico®), diluído em solução de tampão carbonato/bicarbonato de sódio. Após as

lavagens apropriadas em PBS-Tween, 100µl dos soros a serem testados, foram adicionados. Os soros controles de referências positivas e negativas e os soros testes foram diluídos a 1:400, e o colostro/leite na diluição de 1:100, em PBS – Tween de pH 7,4 com 0,05% de soro normal de coelho. Os soros foram incubados em câmara úmida, em estufa, a 37°C por 60 minutos. Em seguida, 100µl do conjugado (anti-IgG de bovino produzido em coelho conjugada à fosfatase alcalina, Sigma A-7914) a 1:30.000 em PBS-Tween e leite em pó desnatado a 5% foi adicionado em cada orifício da placa e incubado por 60 minutos a 37°C. O substrato utilizado na reação (BCIP/NBT, Sigma- N-9339) foi diluído a 1 mg/ml em tampão dietanolamina pH 9,8 - 5mg/tablete. A proporção utilizada foi de 1 tablete de 5 mg de substrato para 5 ml de tampão. A leitura foi realizada logo após a incubação à temperatura ambiente, dentro do limite máximo de 40 minutos.

A leitura da reação (densidade óptica) foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRXTC Plus, Dynex Technology) a comprimento de onda de 405 nm.

Adotou-se como branco da reação, a depressão da microplaca que continha todos os elementos da reação à exceção dos antígenos e soros dos bubalinos.

Como controles positivos, foram utilizados soros e colostros de bovinos e búfalos a campo (anexos 2 e 5), com alto título de anticorpos anti-*A. marginale*, anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* e como controles negativos (anexos 1 e 4), amostras de soros de bezerros búfalos sorologicamente negativos em jejum colostrado.

O ponto de corte do teste foi determinado usando a média das densidades ópticas (DOs) de soros e colostros/leite de animais negativos para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, multiplicado por 2,5. Animais com DOs dos soros acima de 0,316; 0,450 e 0,265 foram considerados positivos para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, respectivamente (anexo 3). Para os colostros os valores das DOs foram de 0,596 para *B. bovis*; 0,505 para *B. bigemina* e 0,435 para *A. marginale* (anexo 6).

4.3.1 Modelo de análise dos dados

A atividade enzimática de cada amostra de soro/colostró no teste ELISA indireto foi calculado mediante determinação de seu valor A/P. Para tanto foi utilizado o valor referencial positivo de cada amostra para cálculo, levando-se em consideração os soros de referência positiva e negativa de acordo com a seguinte fórmula:

$$A/P = \frac{\text{Absorbância média da amostra} - \text{Absorbância média do soro de referência negativo}}{\text{Absorbância média do soro de referência positivo} - \text{Absorbância média do soro de referência negativo}}$$

Os valores A/P foram agrupados em níveis ELISA (NE), os quais podem variar de zero até nove (0 - 9). A amplitude máxima dos NE zero foi determinada pela média dos valores em absorbância de soro de animais não imunes contra *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* (soro de referência negativa), acrescido de dois desvios padrões das médias correspondentes. A partir deste limite, os intervalos entre os outros níveis ELISA foram acrescidos de 35% cada; conforme preconizado por MACHADO et al. (1997), para o sistema *Babesia* spp.

5 RESULTADOS

5.1 Resposta imune humoral contra *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* dos animais analisados em grupo.

5.1.1 Detecção de anticorpos séricos das búfalas adultas.

Os dados médios dos níveis de anticorpos obtidos pelo ELISA indireto nos soros das búfalas do rebanho estão apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, respectivamente. Nestas tabelas, constam os dias das colheitas das amostras durante o período que antecedeu o parto (dias -14 a -1) e após o parto; o número de animais agrupados em determinado período; a média dos valores (M) da concentração de anticorpos obtidos pela absorbância ou densidade óptica (DO) e o valor da amostra em relação ao referencial positivo (A/P), com seus respectivos desvio padrões das médias (DP) e Níveis Elisa (NE). O ponto de corte ficou estabelecido como NE = 3 (Anexo 5).

Na Figura 1, pode-se verificar o perfil dos níveis médios de anticorpos sorológicos das búfalas contra os três agentes pesquisados, por todo o período analisado (no periparto e por até 335 dias pós parto). Verifica-se que o padrão da resposta imune humoral destas búfalas foi semelhante para os três agentes; ou seja: os anticorpos sorológicos estiveram em uma concentração baixa antes do parto, mas, acima do ponto de corte para *B. bovis* e *A. marginale*, abaixando levemente nos primeiros sete dias pós-parto e mantendo-se assim por até 90 dias. Dos 91 aos 335 dias pós-parto houve uma elevação na concentração dos anticorpos para Níveis ELISA, variando de 5 a 6 pra *B. bovis* e *B. bigemina* e de 3 a 5 para *A. marginale* (Figura 2). Ressalta-se que as búfalas apresentaram uma resposta imunológica baixa ou nula para *A. marginale*, durante os primeiros 90 dias pós-parto, que embora acima do ponto de corte após esta data, a resposta foi sempre inferior àquela contra *B. bovis* e *B. bigemina* (Tabelas 1, 2 e 3 e Figuras 1 e 2).

Tabela 1: Resultados de detecção dos anticorpos anti-*Babesia bovis* pelo ELISA-teste realizado em soros de búfalas adultas (n = 4 a 12) antes do parto (dias -1 e -14) e após o parto (1 a 335 dias) para detecção dos anticorpos anti-*Babesia bovis*. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.

Dias pós-parto	Número de Animais	Anticorpos anti- <i>Babesia bovis</i>		NE
		D.O.	A/P	
		Média ± DP	Média ± DP	
1-14*	7	0,523 ± 0,232	0,345 ± 0,210	N4
1	10	0,475 ± 0,218	0,313 ± 0,197	N3
1 – 7	12	0,426 ± 0,147	0,207 ± 0,270	N2
8 – 15	10	0,543 ± 0,186	0,375 ± 0,168	N4
16 – 30	10	0,527 ± 0,288	0,361 ± 0,261	N4
31 – 45	11	0,503 ± 0,157	0,339 ± 0,142	N4
46 – 60	10	0,496 ± 0,211	0,333 ± 0,191	N3
61 – 75	10	0,479 ± 0,173	0,317 ± 0,156	N3
75 – 90	8	0,541 ± 0,218	0,373 ± 0,198	N4
91 – 105	10	0,900 ± 0,560	0,690 ± 0,500	N6
106 – 120	7	0,993 ± 0,266	0,783 ± 0,208	N6
121 – 135	9	0,852 ± 0,387	0,656 ± 0,349	N6
136 – 150	4	0,715 ± 0,226	0,532 ± 0,204	N5
151 – 165	10	0,766 ± 0,283	0,578 ± 0,256	N5
166 – 180	6	0,729 ± 0,198	0,544 ± 0,279	N5
181 – 210	11	0,672 ± 0,248	0,493 ± 0,224	N5
211 – 241	11	0,929 ± 0,453	0,726 ± 0,410	N6
242 – 272	10	0,826 ± 0,238	0,632 ± 0,215	N6
273 – 303	10	0,752 ± 0,208	0,565 ± 0,188	N5
304 - 335	11	0,712 ± 0,411	0,529 ± 0,372	N5

* = Dias antes do parto. Ponto de Corte: *B. bovis* = 0,316 e NE = 3.

DO = Densidade Ótica; A/P = Amostra/Positivo; NE = Níveis ELISA; DP = Desvio Padrão.

Tabela 2: Resultados de detecção dos anticorpos anti-*Babesia bigemina* pelo ELISA-teste realizado em soros de búfalas adultas (n = 4 a 12) antes do parto (dias -1 e -14) e após o parto (1 a 335 dias) para detecção dos anticorpos anti-*Babesia bovis*. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.

Dias pós-parto	Número de Animais	Anticorpos anti- <i>Babesia bigemina</i>		NE
		D.O.		
		Média ± DP	Média ± DP	
1-14*	7	0,438 ± 0,039	0,291 ± 0,044	N2
1	10	0,395 ± 0,060	0,243 ± 0,074	N1
1 – 7	12	0,377 ± 0,069	0,252 ± 0,222	N3
8 – 15	10	0,391 ± 0,056	0,238 ± 0,063	N2
16 – 30	10	0,412 ± 0,107	0,261 ± 0,121	N3
31 – 45	11	0,431 ± 0,081	0,283 ± 0,091	N3
46 – 60	10	0,389 ± 0,049	0,236 ± 0,055	N2
61 – 75	10	0,408 ± 0,055	0,257 ± 0,062	N3
75 – 90	8	0,526 ± 0,118	0,390 ± 0,133	N4
91 – 105	10	0,830 ± 0,250	0,730 ± 0,290	N6
106 – 120	7	0,835 ± 0,193	0,738 ± 0,218	N6
121 – 135	9	0,716 ± 0,232	0,604 ± 0,262	N5
136 – 150	4	0,724 ± 0,152	0,613 ± 0,172	N5
151 – 165	10	0,787 ± 0,209	0,684 ± 0,236	N6
166 – 180	6	0,704 ± 0,207	0,590 ± 0,233	N5
181 – 210	11	0,630 ± 0,120	0,507 ± 0,730	N5
211 – 241	11	0,713 ± 0,168	0,601 ± 0,187	N5
242 – 272	10	0,777 ± 0,171	0,673 ± 0,193	N6
273 – 303	10	0,695 ± 0,163	0,581 ± 0,184	N5
304 - 335	11	0,535 ± 0,254	0,400 ± 0,286	N4

* = Dias antes do parto. Ponto de Corte: *B. bigemina* = 0,450 e NE = 3.

DO = Densidade Ótica; A/P = Amostra/Positivo; NE = Níveis ELISA; DP = Desvio Padrão.

Tabela 3: Resultados de detecção dos anticorpos anti-*Anaplasma marginale* *Babesia bovis* pelo ELISA-teste realizado em soros de búfalas adultas (n = 4 a 12) antes do parto (dias -1 e -14) e após o parto (1 a 335 dias) para detecção dos anticorpos anti-*Babesia bovis*. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.

Dias pós-parto	Número de Animais	Anticorpos anti- <i>Anaplasma marginale</i>		NE
		D.O.		
		Média ± DP	A/P Média ± DP	
1-14*	7	0,316 ± 0,049	0,279 ± 0,065	N3
1	10	0,239 ± 0,049	0,177 ± 0,066	N1
1 – 7	12	0,242 ± 0,042	0,182 ± 0,055	N1
8 – 15	10	0,224 ± 0,025	0,158 ± 0,033	N0
16 – 30	10	0,242 ± 0,047	0,182 ± 0,063	N1
31 – 45	11	0,231 ± 0,040	0,167 ± 0,053	N0
46 – 60	10	0,208 ± 0,025	0,136 ± 0,033	N0
61 – 75	10	0,205 ± 0,042	0,133 ± 0,058	N0
75 – 90	8	0,227 ± 0,027	0,162 ± 0,036	N1
91 – 105	10	0,520 ± 0,200	0,550 ± 0,260	N5
106 – 120	7	0,494 ± 0,136	0,516 ± 0,180	N5
121 – 135	9	0,464 ± 0,112	0,475 ± 0,148	N2
136 – 150	4	0,362 ± 0,054	0,340 ± 0,072	N4
151 – 165	10	0,424 ± 0,148	0,423 ± 0,195	N4
166 – 180	6	0,352 ± 0,083	0,327 ± 0,110	N3
181 – 210	11	0,419 ± 0,134	0,416 ± 0,177	N4
211 – 241	11	0,483 ± 0,163	0,501 ± 0,216	N5
242 – 272	10	0,465 ± 0,111	0,476 ± 0,147	N5
273 – 303	10	0,408 ± 0,138	0,402 ± 0,183	N4
304 - 335	11	0,332 ± 0,131	0,300 ± 0,174	N3

* = Dias antes do parto. Ponto de Corte: *A. marginale* = 0,265 e NE = 3.

DO = Densidade Ótica; A/P = Amostra/Positivo; NE = Níveis ELISA; DP = Desvio Padrão.

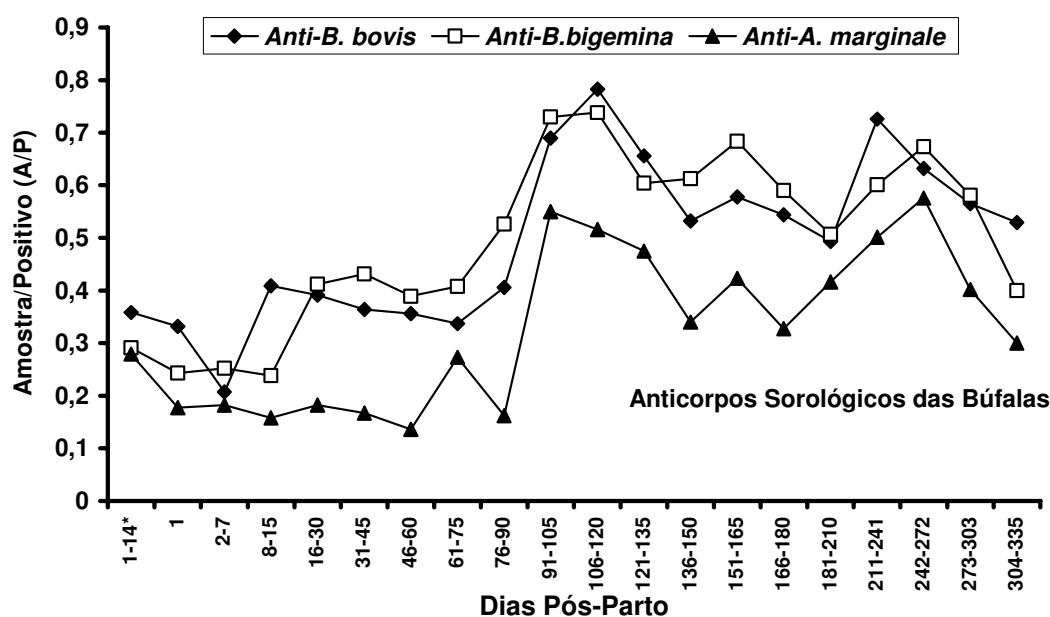


Figura 1: Resultados da detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* detectados nos soros das búfalas adultas (n = 4 a 12) pelo teste ELISA indireto realizado em amostras colhidas sequencialmente com intervalos semanais, quinzenais e/ou mensais durante o período de 335 dias após o parto. * = Dias antes do parto. Selvíria, MS, 1999/2000.

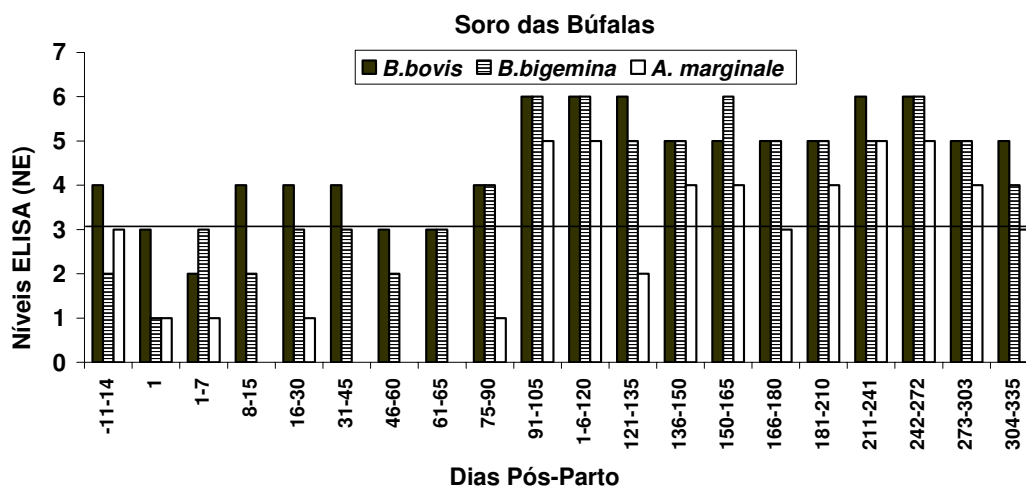


Figura 2: Níveis ELISA anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* detectados nos soros das búfalas adultas (n = 4 a 12) pelo teste ELISA indireto realizado em amostras colhidas sequencialmente com intervalos semanais, quinzenais e/ou mensais durante o período de 335 dias após o parto. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE= 3. * = Dias antes do parto. Selvíria, MS, 1999/2000.

5.1.2 Detecção de anticorpos séricos do colostro/leite das búfalas adultas

Os dados sobre os resultados dos exames sorológicos pelo ELISA indireto na detecção dos anticorpos do colostro/leite das búfalas também foram agrupados e estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente, para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*. A análise comparativa dos perfis dos níveis médios dos anticorpos contra estes três agentes, do parto aos 60 dias posteriores, está representada nas Figuras 3 e 4, mostrando resultados similares para *B. bovis* e *B. bigemina*. Os valores de A/P para os anticorpos detectados foram mais expressivos e com níveis ELISA de 4 e 5, respectivamente para *B. bovis* e *B. bigemina*, somente no dia do parto. A seguir, durante os primeiros 15 dias, estes anticorpos caíram para níveis abaixo do ponto de corte e continuaram assim até o final do período analisado, ou seja, até 60 dias pós-parto (Figura 4). Neste período, principalmente nos primeiros sete dias, houve uma coincidência com a queda de anticorpos séricos destas búfalas (Figura 1), indicando a transferência dos mesmos para o colostro. Já os anticorpos anti-*A. marginale* não foram detectados no colostro destes animais, e da mesma forma verificou-se ausência destes no soro das búfalas, durante os primeiros 90 dias pós-parto.

Tabela 4: Resultados de detecção dos anticorpos anti-*Babesia bovis* pelo ELISA-teste realizado em colostros/leite de búfalas adultas (n = 10) após parto (1 a 60 dias). Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.

Dias Pós-Parto	Número de Animais	Anticorpos anti- <i>Babesia bovis</i>		
		D.O. Média ± DP	A/P Média ± DP	NE
1	10	1,025 ± 0,390	0,805 ± 0,399	N4
2-7	10	0,545 ± 0,350	0,314 ± 0,359	N1
8-15	10	0,312 ± 0,114	0,075 ± 0,117	N0
16-23	10	0,242 ± 0,021	0,003 ± 0,022	N0
24-30	10	0,236 ± 0,017	0,000 ± 0,000	N0
31-38	10	0,243 ± 0,021	0,004 ± 0,000	N0
39-45	10	0,239 ± 0,019	0,000 ± 0,000	N0
46-60	10	0,239 ± 0,014	0,000 ± 0,000	N0

Ponto de Corte: *B. bovis* = 0,596 e NE = 3. DO = Densidade Ótica; A/P = Amostra/Positivo; NE = Níveis ELISA; DP = Desvio Padrão.

Tabela 5: Resultados de detecção dos anticorpos anti-*Babesia bigemina* pelo ELISA-teste realizado em colostros/leite de búfalas adultas (n = 10) após parto (1 a 60 dias). Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.

Dias Pós-Parto	Número de Animais	Anticorpos anti- <i>Babesia bigemina</i>		
		D.O. Média ± DP	A/P Média ± DP	NE
1	10	0,634 ± 0,145	0,803 ± 0,270	N5
2-7	10	0,335 ± 0,089	0,248 ± 0,165	N0
8-15	10	0,232 ± 0,022	0,058 ± 0,040	N0
16-23	10	0,212 ± 0,008	0,018 ± 0,015	N0
24-30	10	0,210 ± 0,009	0,016 ± 0,017	N0
31-38	10	0,210 ± 0,09	0,015 ± 0,018	N0
39-45	10	0,210 ± 0,017	0,014 ± 0,031	N0
46-60	10	0,209 ± 0,006	0,013 ± 0,011	N0

Ponto de Corte: *B. bigemina* = 0,505 e NE = 3. DO = Densidade Ótica; A/P = Amostra/Positivo; NE = Níveis ELISA; DP = Desvio Padrão.

Tabela 6: Resultados de detecção dos anticorpos anti-*Anaplasma marginale* pelo ELISA-teste realizado em colostros/leite de búfalas adultas (n = 10) após parto (1 a 60 dias). Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.

Dias Pós-Parto	Número de Animais	Anticorpos anti- <i>Anaplasma marginale</i>		
		D.O.	A/P	NE
		Média ± DP	Média ± DP	
1	10	0,244 ± 0,111	0,107 ± 0,170	NO
2-7	10	0,212 ± 0,053	0,058 ± 0,082	NO
8-15	10	0,217 ± 0,114	0,066 ± 0,175	NO
16-23	10	0,193 ± 0,030	0,028 ± 0,046	NO
24-30	10	0,220 ± 0,073	0,071 ± 0,111	NO
31-38	10	0,211 ± 0,053	0,056 ± 0,810	NO
39-45	10	0,174 ± 0,028	0,001 ± 0,043	NO
46-60	10	0,294 ± 0,178	0,184 ± 0,273	NO

Ponto de Corte: *A. marginale* = 0,435 e NE = 3; DO = Densidade Ótica; A/P = Amostra/Positivo; NE = Níveis ELISA; DP = Desvio Padrão.

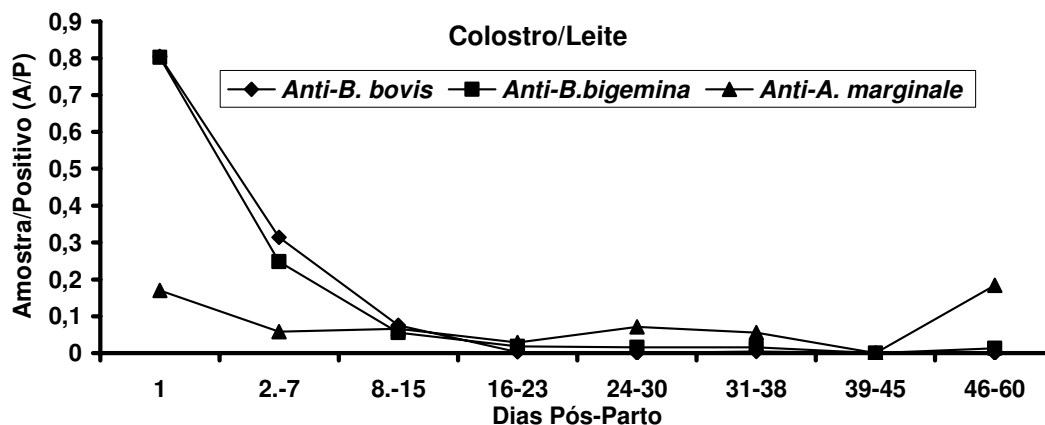


Figura 3: Resultados da detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* detectados nos colostros/leite de 10 búfalas pelo teste ELISA indireto, realizado em amostras colhidas do parto aos 60 dias pós-parto. Selvíria, MS, 1999/2000.

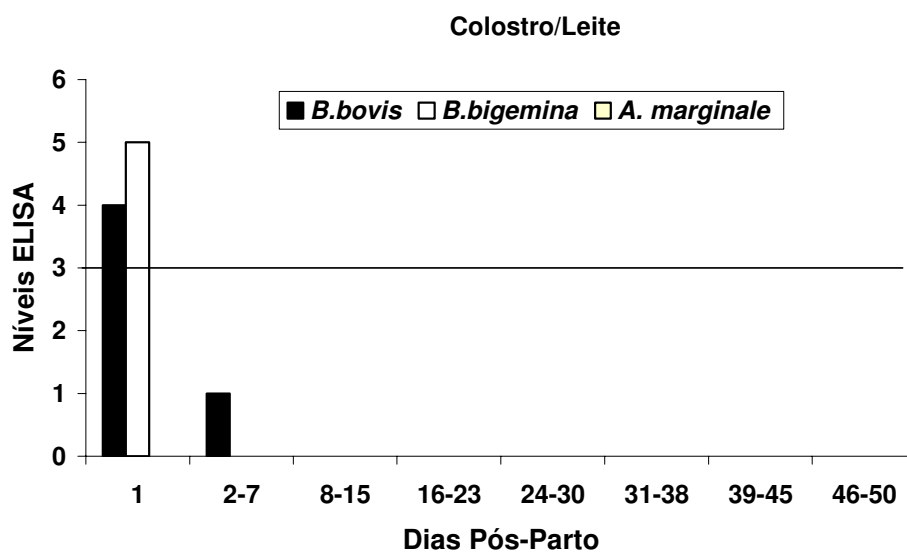


Figura 4: Níveis ELISA de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* detectados nos colostros/leite de 10 búfalas pelo teste ELISA indireto, realizado em amostras colhidas do parto aos 60 dias pós-parto. Linha contínua significa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3. Selvíria, MS, 1999/2000.

5.1.3 Detecção de anticorpos séricos dos bezerros búfalos

Os resultados dos exames sorológicos realizados pelo ELISA indireto de amostras colhidas dos bezerros, estão demonstrados nas Tabelas 7, 8, 9 para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, respectivamente. Nestas Tabelas constam os dias de colheita das amostras antes e depois dos animais mamarem o colostro; os números de animais examinados e agrupados em determinado período, as médias (M) em densidade óptica (DO) em amostra/positivo (A/P); os respectivos desvios padrões (DP) e os níveis ELISA (NE).

Nas Figuras 5 e 6 é possível visualizar os perfis dos níveis médios de anticorpos sorológicos comparativos para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, desde o nascimento e até os animais atingirem 365 dias de idade. Observou-se ausência de anticorpos nos soros destes bezerros colhidos antes de mamar o colostro. Mas quando o exame foi realizado dentro de 24 horas, após mamarem o colostro, detectou-se a presença dos anticorpos anti-*Babesia* em concentração superior aos anticorpos anti-*A. marginale*. Este aumento, após os animais mamarem o colostro não foi alto, pois a concentração dos mesmos passou de Níveis ELISA zero para NE = 2 e mantiveram neste nível por um período de 105 dias após o nascimento. Embora, leve esta ascensão significou uma passagem dos anticorpos colostrais maternos para o sangue dos bezerros.

O perfil da resposta imune humoral contra *A. marginale* (Tabela 9 e Figura 5) foi semelhante à observada para *Babesia* até aos 105 dias de idade, ou seja, resposta insignificante e abaixo do ponto de corte. No entanto, a partir desta idade, os animais começaram a apresentar anticorpos anti-*A. marginale* com níveis ELISA variando de 3 a 4, que assim se mantiveram até aos 12 meses de idade (Figura 6). Este aumento dos anticorpos séricos contra *A. marginale* nos bezerros pode significar a aquisição de uma imunidade ativa.

Os níveis de anticorpos sorológicos revelaram que as duas espécies de *Babesia* sp sobressaíram-se em relação à espécie de *A. marginale*, nos soros e nos colostros das búfalas (Figuras 1 e 3), ao contrário do que aconteceu nos

bezerros, os anticorpos anti-*A. marginale* estiveram presentes em maior concentração do que os anticorpos anti-*Babesia* spp (Figuras 5 e 6).

Tabela 7: Resultados de detecção dos anticorpos anti-*Babesia bovis* pelo ELISA-teste realizado em soros de bezerros búfalos (n = 7 a 10) do nascimento até 365 dias. Dados apresentados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.

Dias de idade	Número de Animais	Anticorpos anti- <i>Babesia bovis</i>		NE
		D.O.	A/P	
		Média ± DP	Média ± DP	
1*	10	0,208 ± 0,008	0,000 ± 0,000	N0
1	9	0,347 ± 0,102	0,198 ± 0,059	N2
1 – 7	9	0,373 ± 0,074	0,221 ± 0,067	N2
8 – 15	9	0,359 ± 0,099	0,207 ± 0,089	N2
16 – 30	9	0,292 ± 0,042	0,147 ± 0,038	N1
31 – 45	10	0,306 ± 0,076	0,160 ± 0,069	N1
46 – 60	10	0,246 ± 0,014	0,106 ± 0,039	N0
61 – 75	10	0,262 ± 0,121	0,121 ± 0,195	N0
75 – 90	10	0,257 ± 0,010	0,093 ± 0,067	N0
91 – 105	10	0,207 ± 0,042	0,071 ± 0,044	N0
106 – 120	10	0,195 ± 0,041	0,062 ± 0,037	N0
121 – 135	10	0,195 ± 0,037	0,062 ± 0,033	N0
136 – 150	10	0,202 ± 0,025	0,068 ± 0,023	N0
151 – 165	8	0,212 ± 0,043	0,077 ± 0,039	N0
166 – 180	8	0,184 ± 0,020	0,052 ± 0,018	N0
181 – 210	10	0,186 ± 0,037	0,054 ± 0,033	N0
211 – 241	10	0,240 ± 0,093	0,103 ± 0,084	N0
242 – 272	10	0,203 ± 0,041	0,069 ± 0,037	N0
273 – 303	8	0,250 ± 0,038	0,111 ± 0,034	N0
304 - 335	7	0,309 ± 0,070	0,165 ± 0,063	N1
336 - 365	8	0,427 ± 0,132	0,271 ± 0,119	N3

* = Dia do nascimento, antes de mamar o colostro. Ponto de Corte: *B. bovis* = 0,316 e NE = 3. DO = Densidade Ótica; A/P = Amostra/Positivo; NE= Níveis ELISA; DP= Desvio Padrão.

Tabela 8: Resultados de detecção dos anticorpos anti-*Babesia bigemina* pelo ELISA-teste realizado em soros de bezerros búfalos (n = 7 a 10) do nascimento até 365 dias. Dados apresentados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.

Dias de idade	Número de Animais	Anticorpos anti- <i>Babesia bigemina</i>		NE
		D.O.	A/P	
		Média ± DP	Média ± DP	
1*	10	0,228 ± 0,015	0,000 ± 0,000	N0
1	9	0,462 ± 0,123	0,318 ± 0,139	N2
1 – 7	9	0,481 ± 0,083	0,339 ± 0,094	N2
8 – 15	9	0,433 ± 0,077	0,285 ± 0,086	N2
16 – 30	9	0,372 ± 0,071	0,217 ± 0,080	N1
31 – 45	10	0,353 ± 0,086	0,194 ± 0,097	N0
46 – 60	10	0,308 ± 0,037	0,144 ± 0,041	N0
61 – 75	10	0,325 ± 0,049	0,163 ± 0,055	N0
75 – 90	10	0,300 ± 0,038	0,135 ± 0,043	N0
91 – 105	10	0,258 ± 0,019	0,088 ± 0,022	N0
106 – 120	10	0,275 ± 0,039	0,106 ± 0,044	N0
121 – 135	10	0,287 ± 0,039	0,120 ± 0,044	N0
136 – 150	10	0,281 ± 0,025	0,113 ± 0,028	N0
151 – 165	8	0,295 ± 0,050	0,129 ± 0,056	N0
166 – 180	8	0,296 ± 0,028	0,131 ± 0,032	N0
181 – 210	10	0,281 ± 0,049	0,114 ± 0,055	N0
211 – 241	10	0,335 ± 0,086	0,411 ± 0,142	N3
242 – 272	10	0,312 ± 0,067	0,148 ± 0,076	N0
273 – 303	8	0,333 ± 0,078	0,172 ± 0,088	N0
304 - 335	7	0,347 ± 0,051	0,188 ± 0,057	N0
336 - 365	8	0,459 ± 0,116	0,315 ± 0,130	N2

* = Dia do nascimento, antes de mamar o colostro. Ponto de Corte: *B. bigemina* = 0,450 e NE = 3; DO = Densidade Ótica; A/P = Amostra/Positivo; NE = Níveis ELISA; DP = Desvio Padrão.

Tabela 9: Resultados de detecção dos anticorpos anti-*Anaplasma marginale* pelo ELISA-teste realizado em soros de bezerros búfalos (n = 7 a 10) do nascimento até 365 dias. Dados apresentados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 1999/2000.

Dias de idade	Número de Animais	Anticorpos anti- <i>Anaplasma marginale</i>		NE
		D.O	A/P	
		Média ± DP	Média ± DP	
1*	10	0,200 ± 0,058	0,000 ± 0,000	N0
1	9	0,238 ± 0,059	0,177 ± 0,079	N2
1 – 7	9	0,213 ± 0,050	0,143 ± 0,067	N1
8 – 15	9	0,220 ± 0,045	0,152 ± 0,060	N2
16 – 30	9	0,192 ± 0,038	0,116 ± 0,050	N1
31 – 45	10	0,228 ± 0,064	0,163 ± 0,084	N2
46 – 60	10	0,208 ± 0,039	0,137 ± 0,052	N1
61 – 75	10	0,195 ± 0,046	0,119 ± 0,060	N1
75 – 90	10	0,241 ± 0,067	0,180 ± 0,089	N2
91 – 105	10	0,224 ± 0,044	0,157 ± 0,058	N2
106 – 120	10	0,299 ± 0,108	0,257 ± 0,143	N3
121 – 135	10	0,288 ± 0,079	0,244 ± 0,1-5	N3
136 – 150	10	0,317 ± 0,066	0,281 ± 0,088	N4
151 – 165	8	0,306 ± 0,094	0,266 ± 0,124	N3
166 – 180	8	0,344 ± 0,065	0,303 ± 0,086	N4
181 – 210	10	0,322 ± 0,104	0,287 ± 0,136	N4
211 – 241	10	0,411 ± 0,142	0,406 ± 0,188	N5
242 – 272	10	0,442 ± 0,210	0,446 ± 0,278	N5
273 – 303	8	0,437 ± 0,143	0,439 ± 0,189	N5
304 - 335	7	0,250 ± 0,026	0,193 ± 0,034	N2
336 - 365	8	0,341 ± 0,087	0,313 ± 0,115	N4

* = Dia do nascimento, antes de mamar o colostro. Ponto de Corte: *A. marginale* = 0,265 e NE = 3; DO = Densidade Ótica; A/P = Amostra/Positivo; NE = Níveis ELISA; DP = Desvio Padrão.

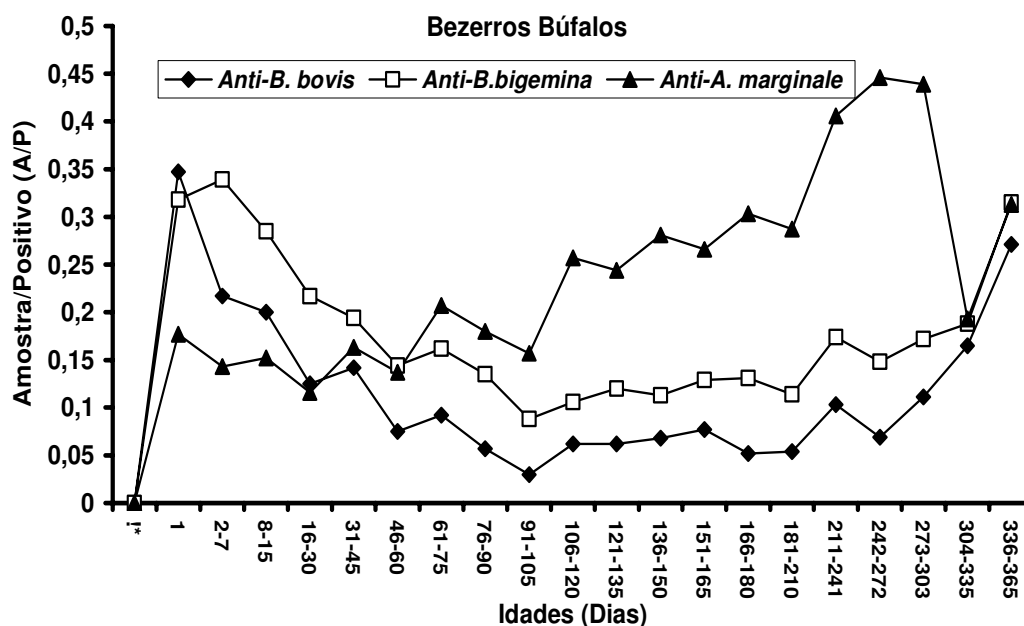


Figura 5 Resultados da detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* detectados nos soros de bezerros búfalos ($n = 7$ a 10) pelo teste ELISA indireto, realizado com amostras colhidas sequencialmente com intervalos semanais, quinzenais e/ou mensais por um ano após o nascimento. * = Dia do nascimento, sem mamar o colostro.

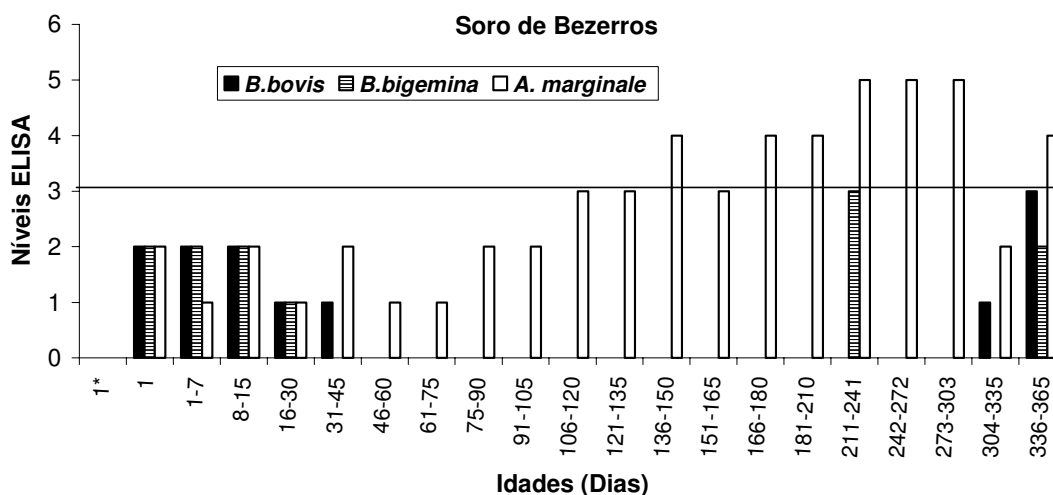


Figura 6: Níveis ELISA de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* detectados nos soros de bezerros búfalos ($n = 7$ a 10) pelo teste ELISA indireto, realizado com amostras colhidas sequencialmente com intervalos semanais, quinzenais e/ou mensais por um ano pós nascimento. * = Dia do nascimento, sem mamar o colostro. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3.

5.2 Análise da resposta imune humoral individual.

Para a análise da resposta imune humoral individual quantificou-se a concentração de anticorpos IgG, tanto no soro como no colostro de duas búfalas adultas (búfala nº 130 e 134) e de seus respectivos bezerros (bezerros nº 365 e 366), durante um período máximo de 161 dias. Estes dados estão nas Tabelas 10, 11 e 12 e nas Figuras 8 a 16. Observou-se inicialmente, o perfil de anticorpos sorológicos do bezerro nº 365 (Tabela 10 e Figura 7 e 8) notando-se que antes de mamar o colostro, o nível de anticorpos não era detectável, e após, houve uma nítida elevação destes em relação aos três agentes estudados. Embora, com algumas pequenas oscilações, estes anticorpos permaneceram ainda elevados por até aproximadamente 27 dias após o nascimento, com os níveis ELISA variando de 4 a 5, principalmente para a espécie *B. bovis*, representando o período de proteção imune passiva colostrálica. Neste período, a ascensão de anticorpos para *A. marginale* foi mais lenta, onde alcançou o nível 3 somente três semanas após o nascimento. Em seguida (a partir de 27 dias do nascimento) ocorreu queda dos níveis de anticorpos para todos os parasitas, incluindo também *A. marginale*. A diminuição destes níveis para *B. bigemina*, no entanto, foi um pouco mais abrupta e antecipada à dos outros dois agentes. Embora dois picos nos níveis de anticorpos ocorressem para *B. bovis* e um para *B. bigemina*, a resposta imune humoral foi fraca durante o restante do período examinado, ficando abaixo do ponto de corte na maioria das colheitas de soro realizadas (Figura 8).

Na Tabela 11 e Figuras 9 e 10 estão os resultados dos exames sorológicos pelo ELISA teste realizados com os soros da búfala nº 130 (mãe do bezerro 365), como seus respectivos níveis ELISA (NE) representados na Tabela 12 e nas Figuras 11 e 12, a detecção de anticorpos do colostro e do bezerro 365 e seus respectivos NE. Esta búfala, nota-se perfeitamente que 14 dias antes do parto, a concentração dos anticorpos estava alta (NE - 7 e 6, respectivamente para *B. bovis* e *A. marginale*), e sete dias após o parto estes níveis para os três agentes, diminuíram e continuaram em queda gradativa até 34 dias após (Figura 9). Este resultado foi inversamente proporcional ao que ocorreu para o bezerro 365 no

mesmo período analisado. A curva obtida para a concentração de anticorpos colostrais mostrada na Tabela 12 e na Figura 11 e 12, é possível visualizar os mais elevados níveis de anticorpos, principalmente anti-*Babesia*, nos primeiros sete dias após o parto, com níveis ELISA variando de 8 para *B. bovis* e 7 para *A. marginale* (Figura 12).

Tabela 10: Resultados da detecção de anticorpos anti- anti-*Babesia bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* pelo ELISA - teste em amostras de soros do bezerro búfalo 365, colhidas desde o nascimento até 161 dias de idade. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 2005.

Bezerro búfalo 365 IDADE Dias	Resultados da detecção de anticorpos em D.O. e A/P								
	<i>B. bovis</i>			<i>B. bigemina</i>			<i>A. marginale</i>		
	D.O.	A/P	NE	D.O.	A/P	NE	D.O.	A/P	NE
1*	0,171	0,040	N0	0,247	0,075	N0	0,157	0,069	N0
7	0,646	0,469	N5	0,544	0,410	N3	0,247	0,188	N2
21	0,547	0,380	N4	0,430	0,282	N2	0,305	0,265	N3
27	0,613	0,440	N4	0,275	0,106	N0	0,396	0,385	N5
34	0,274	0,133	N0	0,305	0,141	N0	0,285	0,238	N3
39	0,742	0,556	N5	0,426	0,277	N2	0,285	0,238	N3
49	0,245	0,107	N0	0,305	0,141	N0	0,283	0,236	N3
70	0,281	0,140	N1	0,342	0,182	N0	0,198	0,123	N1
76	0,481	0,320	N3	0,578	0,448	N3	0,355	0,331	N4
105	0,387	0,235	N2	0,501	0,362	N2	0,268	0,216	N3
112	0,330	0,184	N1	0,418	0,268	N1	0,259	0,204	N3
134	0,716	0,533	N5	0,459	0,314	N2	0,239	0,177	N2
148	0,282	0,140	N1	0,331	0,170	N0	0,219	0,151	N2
161	0,283	0,141	N1	0,353	0,195	N0	0,231	0,167	N2

* = Antes de mamar o colostro. Ponto de Corte: *B. bovis* = 0,316; *B. bigemina* = 0,450 e *A. marginale* = 0,265 e NE = 3; DO = Densidade Ótica; A/P = Amostra/Positivo; NE = Níveis ELISA; DP = Desvio Padrão

Tabela 11: Resultados da detecção de anticorpos anti- anti-*Babesia bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* pelo ELISA - teste em amostras de soros da búfala 130, mãe do bezerro 365 colhidas antes e após o parto até 161 dias. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 2005.

Búfala 130 Dias pós- parto	Resultados da detecção de anticorpos em D.O. e A/P								
	<i>B.bovis</i>			<i>B.bigemina</i>			<i>A. marginale</i>		
	D.O.	A/P	NE	D.O.	A/P	NE	D.O.	A/P	NE
14*	1,111	0,889	N7	0,569	0,438	N3	0,508	0,534	N6
7	0,779	0,589	N5	0,581	0,451	N3	0,294	0,250	N3
21	0,783	0,596	N5	0,694	0,579	N4	0,440	0,444	N5
27	0,310	0,165	N1	0,513	0,375	N3	0,430	0,430	N5
34	0,495	0,333	N3	0,350	0,191	N0	0,191	0,114	N1
42	0,370	0,219	N2	0,522	0,385	N3	0,301	0,260	N3
49	1,015	0,802	N6	0,971	0,891	N5	0,365	0,344	N4
63	1,098	0,878	N7	0,663	0,544	N4	0,366	0,346	N4
70	0,825	0,631	N6	0,657	0,537	N4	0,242	0,181	N2
76	0,540	0,374	N4	0,368	0,211	N1	0,197	0,122	N1
105	1,232	0,999	N7	0,591	0,463	N3	0,475	0,490	N6
112	0,822	0,629	N6	0,469	0,325	N2	0,310	0,272	N4
119	0,934	0,729	N6	0,529	0,393	N3	0,512	0,539	N6
148	0,967	0,759	N6	0,501	0,361	N2	0,438	0,441	N5
161	0,433	0,277	N3	0,459	0,325	N2	0,302	0,261	N3

* = Dias antes do parto. Ponto de Corte: *B. bovis* = 0,316; *B. bigemina* = 0,450 e *A. marginale* = 0,265 e NE = 3; DO = Densidade Ótica; A/P = Amostra/Positivo; NE = Níveis ELISA; DP= Desvio Padrão.

Tabela 12: Resultados da detecção de anticorpos anti- anti-*Babesia bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* pelo ELISA - teste em amostras de colostro/leite da búfala n. 130 no parto até 63 dias pós-parto. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 2005.

Búfala 130 Dias pós- parto	Resultados da detecção de anticorpos em D.O. e A/P								
	<i>B.bovis</i>			<i>B.bigemina</i>			<i>A. marginale</i>		
	D.O.	A/P	NE	D.O.	A/P	NE	D.O.	A/P	NE
1	2,472	2,287	N8	0,356	0,287	N2	1,200	1,571	N7
7	0,766	0,540	N3	0,312	0,205	N0	0,169	0,008	N0
12	0,892	0,669	N4	0,598	0,737	N5	0,389	0,329	N2
27	0,478	0,245	N0	0,309	0,199	N0	0,240	0,101	N0
34	0,440	0,206	N0	0,301	0,184	N0	0,232	0,089	N0
42	0,489	0,256	N0	0,423	0,411	N3	0,253	0,121	N0
56	0,447	0,213	N0	0,361	0,296	N2	0,196	0,034	N0
63	0,548	0,316	N1	0,358	0,290	N2	0,267	0,142	N0

Ponto de Corte: *B. bovis* = 0,596; *B. bigemina* = 0,505 e *A. marginale* = 0,435 e NE = 3. DO = Densidade Ótica; A/P = Amostra/Positivo; NE = Níveis ELISA; DP= Desvio Padrão.

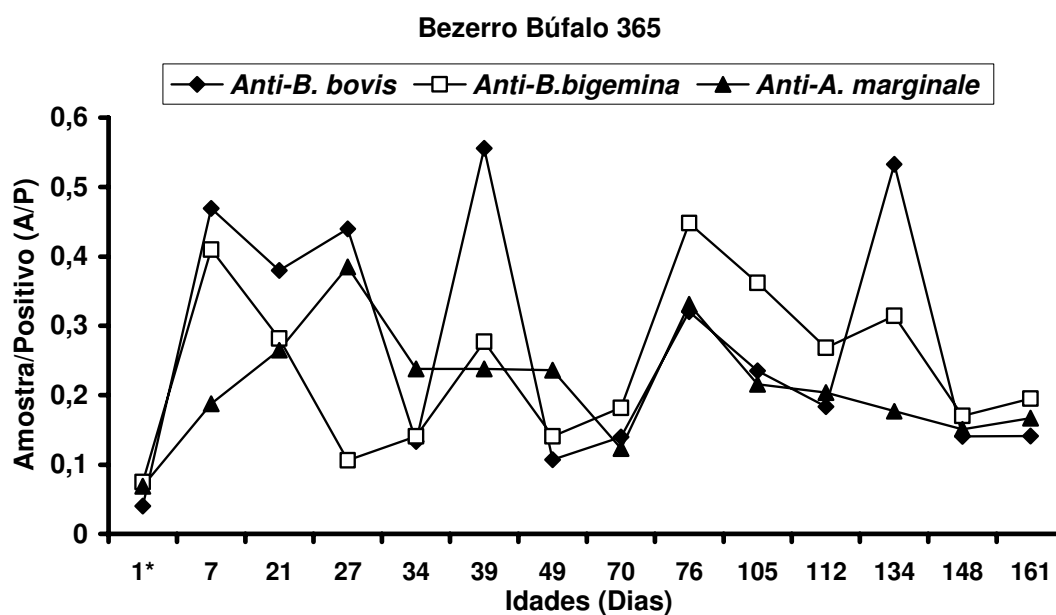


Figura 7: Resultados da detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros do bezerro búfalo 365. * Primeiro dia pós-nascimento antes de mamar o colostro. Selvíria, MS, 2005.

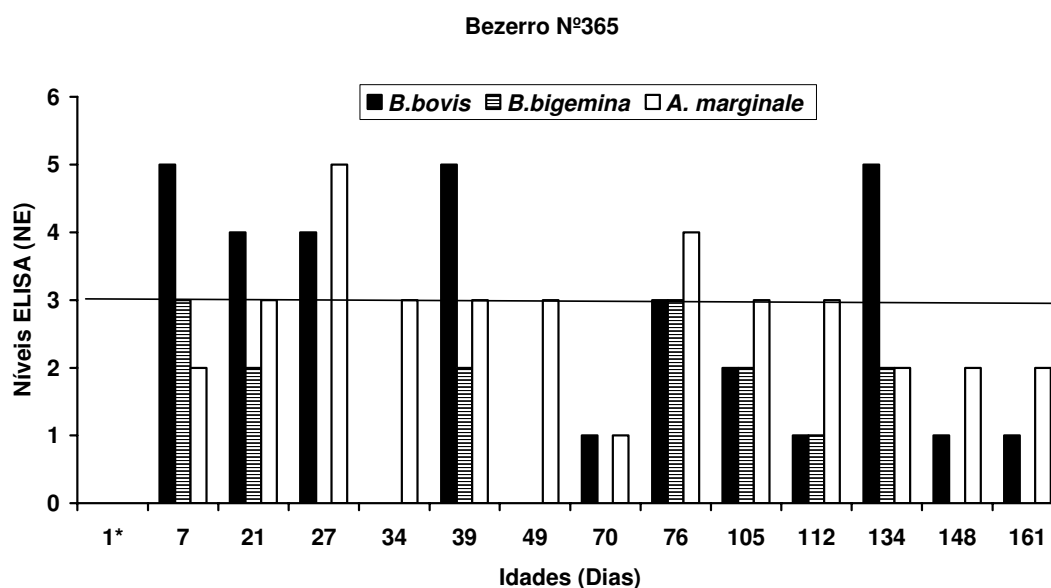


Figura 8: Níveis ELISA de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros do bezerro búfalo 365. * Primeiro dia pós-nascimento antes de mamar o colostro. Ilha Solteira, 2007. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3. Selvíria, MS, 2005.

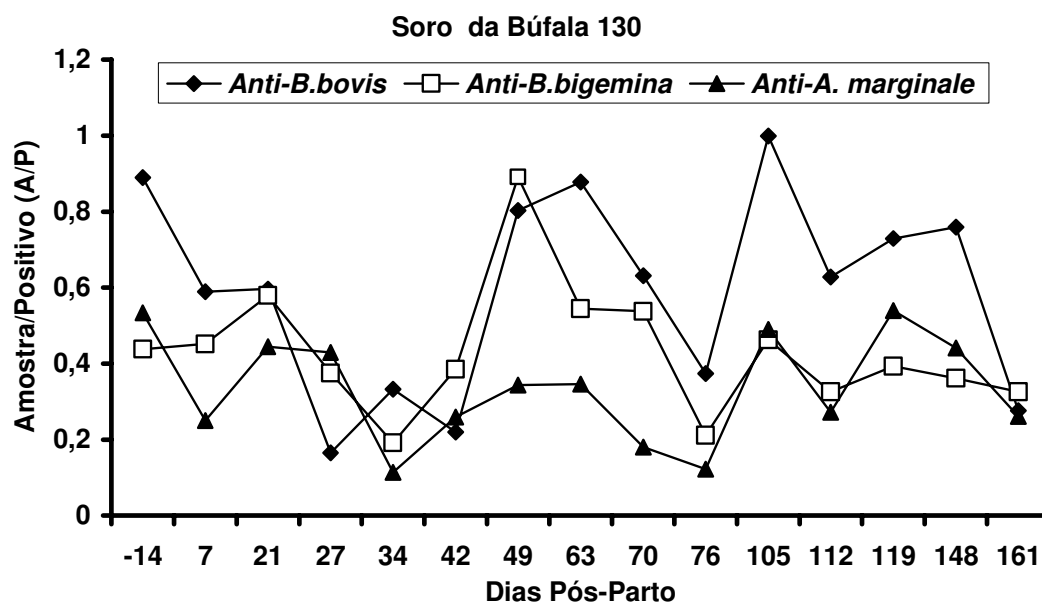


Figura 9: Resultados de detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros da búfala nº 130. Selvíria, MS, 2005.

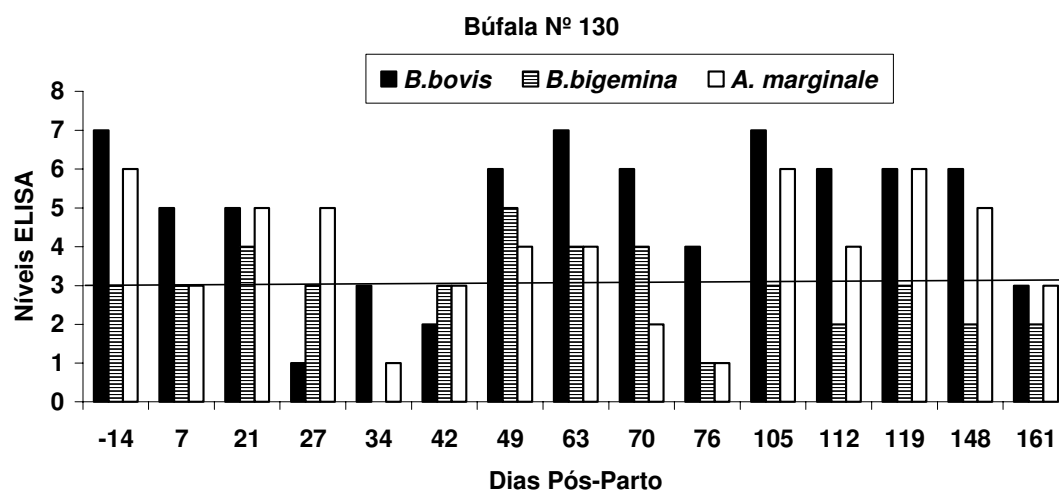


Figura 10: Níveis ELISA dos anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros da búfala nº 130. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3. Selvíria, MS, 2005.

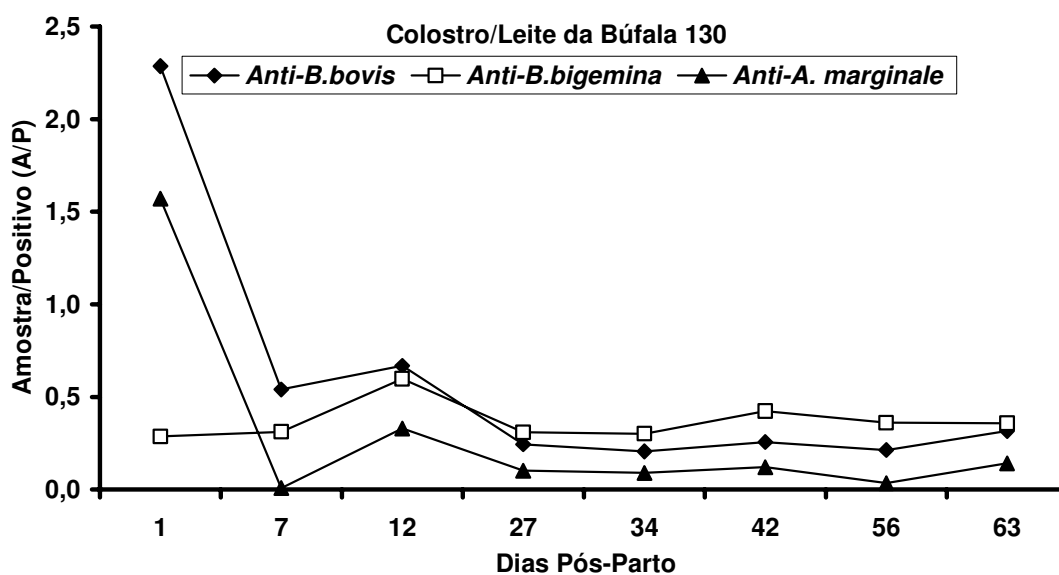


Figura 11: resultados de detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* no colostro da búfala nº 130. Ilha Solteira, 2005.

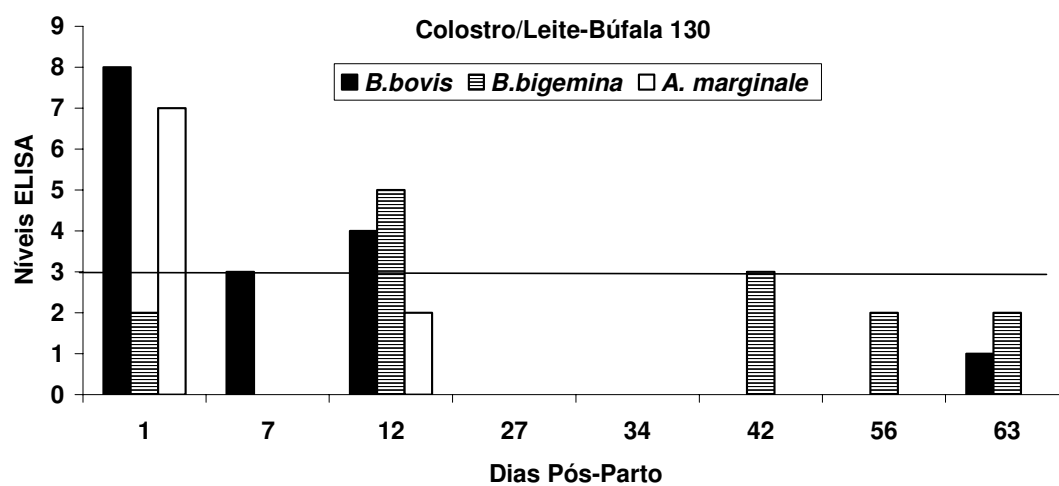


Figura 12: Níveis ELISA de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* no colostro da búfala nº 130. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3. Selvíria, MS, 2005.

Na Tabela 13 e Figuras 13 e 14, visualizam-se o resultado do perfil sorológico do bezerro búfalo nº 366, do nascimento aos 119 dias de idade. Da mesma forma que o bezerro nº 365 (Figura 7), percebeu-se uma ascensão repentina dos níveis de anticorpos dentro das 24 horas e após mamar o colostro. Este resultado também se confirmou quando analisado o perfil sorológico médio de um grupo de bezerros (Figura 5), nas mesmas condições quando analisados individualmente os bezerros 365 e 366 (Figuras 7 e 13, respectivamente). Coincidentemente quando se observa a Tabela 14 e a Figura 15, com os dados da mãe (búfala 134) do respectivo bezerro (bezerro 366), nota-se que a *B. bovis* também se sobressaiu, como sendo a espécie que mais estimulou o sistema imune humoral da búfala nº 134, com os Níveis ELISA variando de 6 a 9, por todo o período analisado (Figura 16).

No entanto, sete dias após o nascimento, observou-se um declínio acentuado nos níveis de anticorpos anti-*B. bovis*, que a partir dos 21 dias de vida, os níveis de anticorpos contra esse parasita igualaram-se com valores bem baixos (NE variando de 0 a 3) e assim, mantiveram-se até o final da experimentação, ao redor de 119 dias (Figura 16). Não se notou, portanto, o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa evidente neste bezerro, no período estudado. A búfala nº 134, no entanto, apresentou na grande maioria das amostras de soro, uma boa resposta imunológica contra os três agentes pesquisados, com Níveis ELISA variando de 5 a 9 para *B. bovis*; 3 a 7 para *B. bigemina*, e 3 a 8 para *A. marginale* (Tabela 14 e Figura 16). Com relação aos anticorpos colostrais (Tabela 15 e Figura 17), a cinética foi muito semelhante à da búfala 130 (Figura 11) e dos colostros analisados em grupo (Figura 5).

Neste estudo, quando se analisou os animais individualmente, observou-se uma variabilidade individual na resposta imune-humoral contra tristeza parasitária, pois esta resposta foi diferente entre as duas búfalas e entre os dois bezerros búfalos analisados. No entanto, a resposta imune humoral contra *A. marginale* foi mais fraca, e contra *B. bovis* mais forte, tanto nos soros dos dois bezerros como em conjunto com o colostro das duas búfalas. *B. bigemina* ficou sempre em uma

categoria intermediária, quando os animais foram analisados individualmente ou quando em grupo.

Tabela 13: Resultados da detecção de anticorpos anti- anti-*Babesia bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* pelo ELISA - teste em amostras de soros do bezerro búfalo n. 366, colhidas desde o nascimento até 119 dias de idade. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 2005.

Bezerro búfalo 366 Idade Dias	Resultados da detecção de anticorpos em D.O. e A/P								
	<i>B.bovis</i>			<i>B.bigemina</i>			<i>A. marginale</i>		
	D.O.	A/P	NE	D.O.	A/P	NE	D.O.	A/P	NE
1*	0,189	0,056	N0	0,244	0,072	N0	0,164	0,078	N0
1	1,162	0,936	N7	0,531	0,396	N3	0,39	0,377	N5
7	0,826	0,632	N6	0,509	0,371	N2	0,272	0,221	N3
21	0,376	0,225	N2	0,287	0,121	N0	0,201	0,127	N1
28	0,554	0,386	N4	0,436	0,289	N2	0,263	0,209	N3
34	0,253	0,114	N0	0,26	0,090	N0	0,160	0,073	N0
49	0,357	0,208	N2	0,399	0,247	N1	0,267	0,215	N3
56	0,314	0,169	N1	0,362	0,205	N1	0,195	0,119	N1
70	0,443	0,286	N3	0,507	0,369	N2	0,28	0,232	N3
77	0,309	0,165	N1	0,356	0,198	N0	0,209	0,138	N1
92	0,464	0,305	N3	0,505	0,366	N2	0,318	0,282	N4
106	0,348	0,200	N2	0,419	0,269	N1	0,305	0,265	N3
119	0,251	0,112	N0	0,375	0,219	N1	0,213	0,143	N1

* = Antes de mamar o colostro. Ponto de Corte: *B. bovis* = 0,316; *B. bigemina* = 0,450 e *A. marginale* = 0,265 e NE = 3; DO = Densidade Ótica; A/P= Amostra/Positivo; NE= Níveis ELISA; DP= Desvio Padrão.

Tabela 14: Resultados da detecção de anticorpos anti- anti-*Babesia bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* pelo ELISA - teste em amostras de soros da búfala 134, mãe do bezerro 366, colhidas antes e após o parto até 119 dias. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 2005.

Búfala 134 Dias pós- parto	Resultados da detecção de anticorpos em D.O. e A/P								
	<i>B.bovis</i>			<i>B.bigemina</i>			<i>A. marginale</i>		
	D.O.	A/P	NE	D.O.	A/P	NE	D.O.	A/P	NE
52*	0,772	0,583	N5	0,593	0,466	N3	0,634	0,880	N7
15*	0,648	0,471	N5	0,411	0,260	N1	0,274	0,262	N3
1*	1,397	1,142	N8	0,879	0,788	N5	0,5	0,650	N6
1	1,316	1,075	N7	0,897	0,808	N5	0,263	0,243	N3
7	1,404	1,154	N8	0,79	0,687	N5	0,329	0,357	N3
21	1,759	1,475	N8	1,09	1,026	N6	0,489	0,631	N6
28	1,515	1,255	N8	0,764	0,658	N4	0,456	0,575	N6
34	0,745	0,559	N5	0,558	0,426	N3	0,311	0,326	N4
49	1,252	1,017	N7	0,659	0,539	N4	0,469	0,597	N6
63	2,051	1,739	N9	0,687	0,571	N4	0,616	0,849	N7
70	1,458	1,203	N8	0,518	0,381	N3	0,466	0,592	N6
77	1,693	1,416	N8	0,54	0,406	N3	0,499	0,649	N6
92	0,912	0,709	N6	0,623	0,499	N3	0,466	0,849	N7
26	0,824	0,630	N6	0,403	0,251	N1	0,437	0,542	N6
119	1,908	1,610	N9	1,372	1,343	N7	0,786	1,145	N8

* = Dias antes do parto. Ponto de Corte: *B. bovis* = 0,316; *B. bigemina* = 0,450 e *A. marginale* = 0,265 e NE = 3. DO Densidade Ótica; A/P= Amostra/Positivo; NE =Níveis ELISA; DP = Desvio Padrão.

Tabela 15: Resultados da detecção de anticorpos colostrais anti-*Babesia bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*Anaplasma marginale* pelo ELISA-teste realizado em colostros/leite da búfala adulta 134, mãe do bezerro 366 colhidas no dia do parto e até aos 42 dias pós-parto. Dados em DO, A/P e NE. Selvíria, MS, 2005.

Búfala 134 Dias pós- parto	Resultados da detecção de anticorpos em D.O. e A/P								
	<i>B.bovis</i>			<i>B.bigemina</i>			<i>A. marginale</i>		
	D.O	A/P	NE	D.O	A/P	NE	D.O	A/P	NE
1	2,309	2,120	N7	0,698	0,923	N5	1,220	1,602	N7
7	0,719	0,492	N3	0,393	0,355	N2	0,312	0,211	N0
12	0,667	0,438	N2	0,356	0,287	N2	0,262	0,135	N0
21	0,904	0,681	N4	0,451	0,463	N3	0,302	0,196	N0
28	0,311	0,074	N0	0,260	0,108	N0	0,196	0,034	N0
34	0,460	0,226	N0	0,315	0,210	N0	0,178	0,006	N0
42	0,310	0,073	N0	0,284	0,153	N0	0,142	0,049	N0

Ponto de Corte: *B. bovis* = 0,596; *B. bigemina* = 0,505 e *A. marginale* = 0,435 e NE = 3;
DO= Densidade Ótica; A/P= Amostra/Positivo; NE =Níveis ELISA; DP Desvio Padrão.

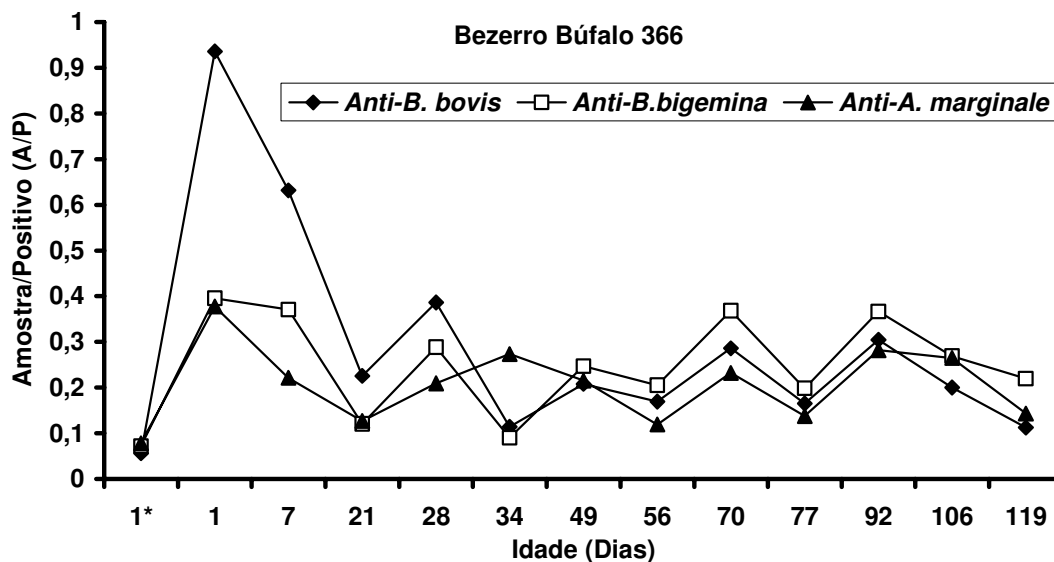


Figura 13: Resultados de detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros do bezerro nº 366. * Dia do nascimento antes de mamar o colostro. Selvíria, MS, 2005.

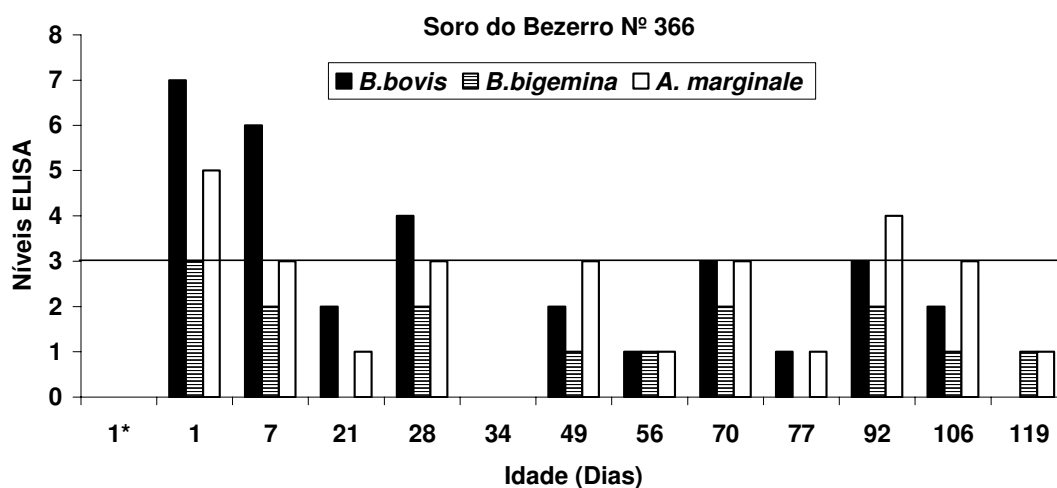


Figura 14: Níveis ELISA de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros do bezerro nº 366. * Dia do nascimento antes de mamar o colostro. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3, Selvíria, MS, 2005.

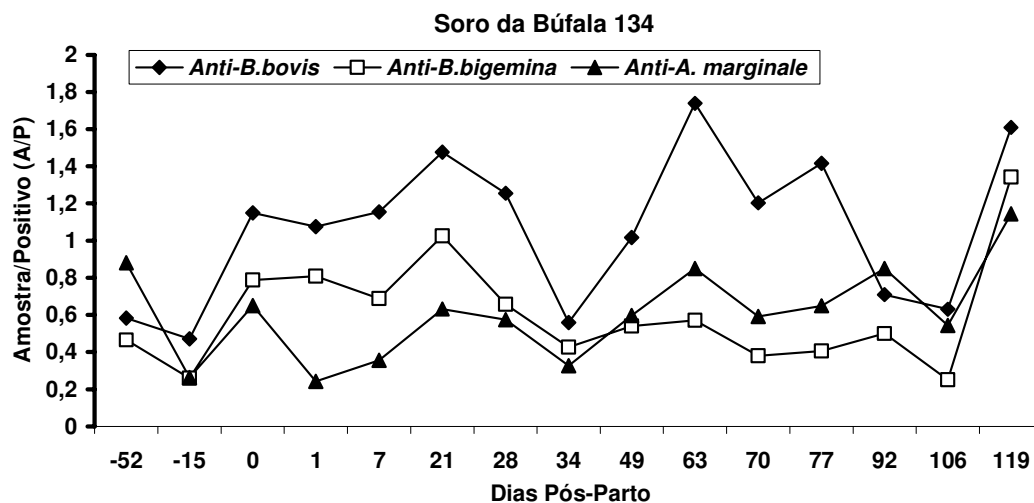


Figura 15: Resultado de detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros da búfala nº 134. Selvíria, MS, 2005.

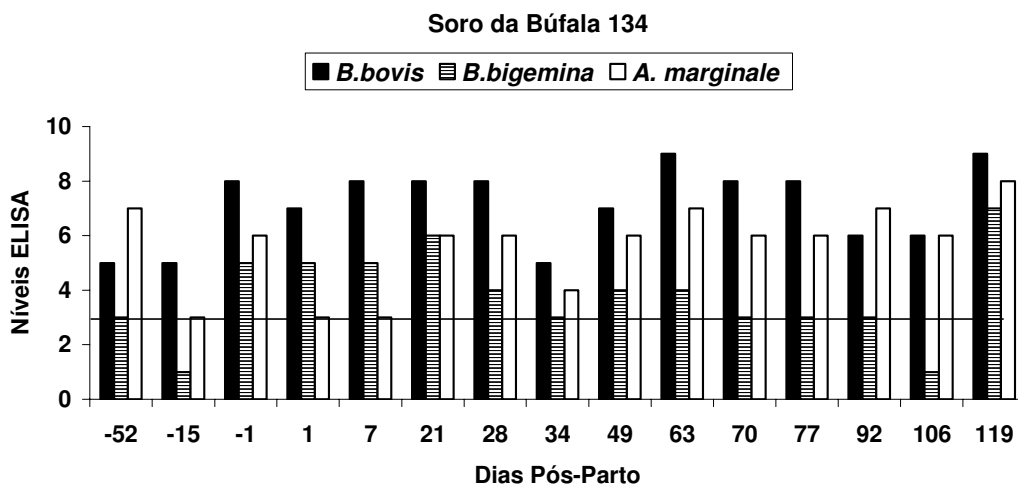


Figura 16: Níveis ELISA de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* nos soros da búfala nº 134. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3. Selvíria, MS, 2005.

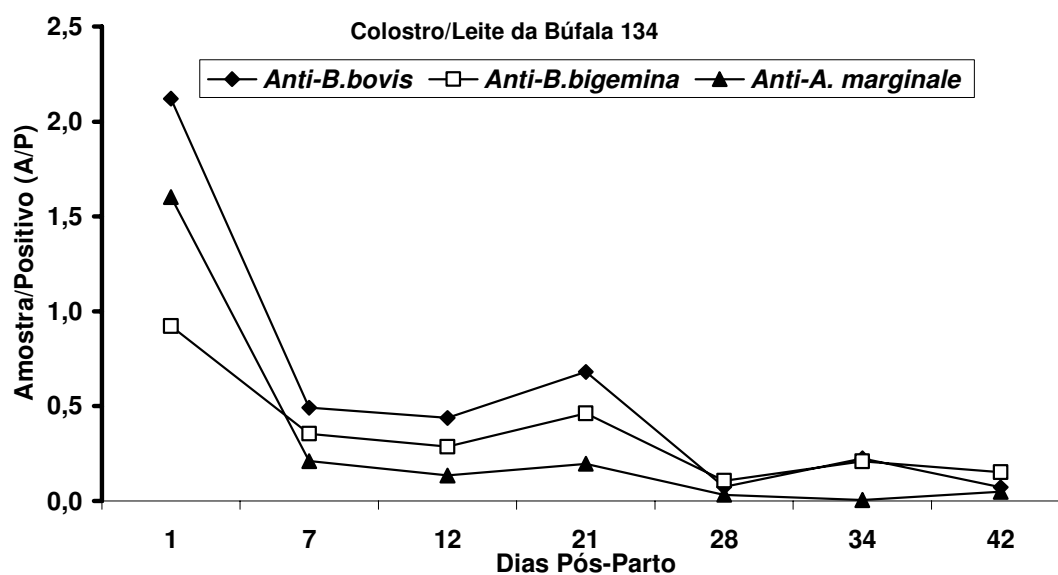


Figura 17: Resultados de detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* no colostro da búfala nº 134. Selvíria, MS, 2005.

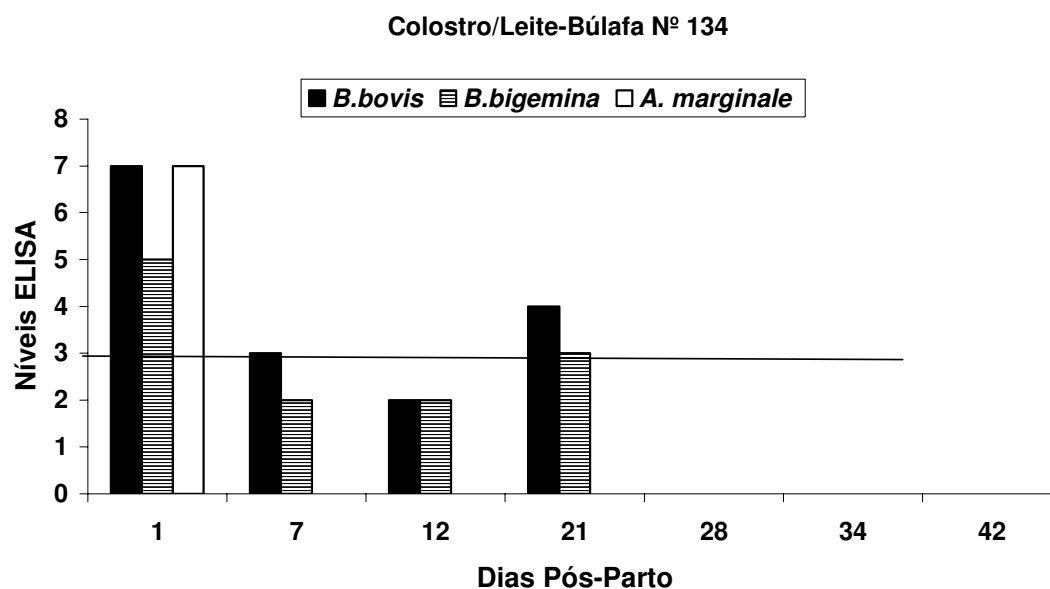


Figura 18: Níveis ELISA de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* no colostro da búfala nº 134. Linha contínua representa o ponto de corte no nível ELISA, NE = 3. Selvíria, MS, 2005.

6 DISCUSSÃO

Analisando-se os anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* detectados no soro de búfalas adultas, verificou-se que o perfil da resposta imune humoral a estes três agentes foi semelhante no período do parto; ou seja: houve, uma leve queda na concentração destes anticorpos aos 14 dias antes do parto e esta queda continuou até o sétimo dia pós-parto. Embora, com uma leve elevação no nível dos anticorpos séricos, a partir do sétimo dia, estes continuaram ainda em concentração baixa até os 90 dias pós-parto. Comparando-se estes resultados, referentes aos dados médios do grupo, com aqueles das duas búfalas analisadas individualmente, verificou-se uma resposta imune humoral bastante semelhante. Os níveis baixos de anticorpos verificados nestas búfalas, durante o período pós-parto, podem indicar uma transferência passiva destes anticorpos sangüíneos para a glândula mamária. Com relação à esta possibilidade, NEWBY & BOURNE (1977) constataram que as imunoglobulinas presentes no colostro de bovídeos derivam quase que exclusivamente do soro, embora haja alguma síntese na glândula mamária, mas somente após estímulo antigênico local. Posteriormente, MACHADO NETO et al. (1995) observaram em bovinos, que a formação do colostro ocorria, principalmente, durante as quatro últimas semanas da gestação, período no qual ocorria também a migração das imunoglobulinas presentes na corrente sangüínea da mãe para a glândula mamária. O processo de transporte era seletivo, predominando a transferência de IgG e, mais especificamente, IgG1. Neste caso, em função desta transferência de imunoglobulinas para a glândula mamária, haveria uma queda na concentração de anticorpos do soro das búfalas. Uma segunda possibilidade seria a imunodepressão, pois segundo LLOYD (1983) tal fato se observa durante a prenhez e a lactação. Desta forma, poderia ser em função das alterações endocrinológicas que ocorrem no animal durante este período. Nesta situação os níveis de prolactina, corticosteróides adrenais e hormônios adrenocorticotróficos seriam supressivos *in vivo*, levando à supressão da reatividade do linfócito e o aumento da susceptibilidade aos parasitas (LLOYD,

1983). Esta imunodepressão pós-parto foi verificada por AMERASINGHE et al. (1994) em búfalos, mas com relação ao ascarídeo *Toxocara vitulorum*, entretanto não foi verificada por SOUZA et al. (2004) estudando a resposta imune humoral contra este mesmo parasita, em búfalas, no peri-parto.

A transferência de anticorpos para o colostro, ao nosso ver, é a explicação plausível, sendo constatada quando se realizou o teste ELISA em amostras dos colostros das búfalas, quando analisadas em grupo ou individualmente. Houve pico máximo de concentração de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* no dia do parto, em seguida os níveis declinaram durante os primeiros 15 dias, coincidindo com a queda de anticorpos do soro destas búfalas. Com relação aos protozoários, *B. bovis* e *B. bigemina*, estes estimularam mais a síntese de anticorpos pelas búfalas analisadas em grupo, e isto pode ser verificado nos seus soros e colostros. A búfala 130 apresentou, por outro lado, predominância de anticorpos contra *B. bovis* e *A. marginale* no colostro, mas no soro a concentração das três espécies foram semelhantes até o 42º dia pós-parto. Já a búfala 134 apresentou anticorpos em maior concentração para as três espécies, mas no soro predominou anticorpos anti-*B. bovis*. Embora houvesse uma variabilidade individual com relação às espécies, verificou-se claramente uma similaridade ou uma concordância entre a resposta colostrada e a sorológica entre as búfalas. Um exemplo, é com relação aos anticorpos anti-*A. marginale* os quais, foram detectados em concentração muito baixa no colostro e no soro das búfalas e seus bezerros durante os primeiros 90 dias após o parto (animais analisados em grupo).

MADRUGA et al. (1985) demonstraram próxima à região estudada, que a ausência de proteção colostrada pode refletir em um problema sério nestas áreas de estabilidade enzoótica, como visto, nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do país, onde ocorrem casos clínicos muitas vezes fatais para bovinos, evidenciando a importância da imunidade humoral como um dos fatores de resistência à anaplasmosose em animais jovens, pois os bezerros infectam-se nos primeiros dias de vida, quando ainda não têm proteção colostrada contra o agente.

A participação dos anticorpos na proteção dos animais contra *A. marginale* tem grande importância, mormente os colostrais, em função do constante desafio dos bezerros quando ainda bem novos em áreas endêmicas. Os mecanismos imunes envolvidos na resposta protetora contra *A. marginale* ocorrem com a opsonização do microorganismo, bloqueio dos sítios de ligação e penetração nos eritrócitos, lise direta dos corpúsculos iniciais por anticorpos e complemento e também citotoxicidade anticorpo-dependente (MADRUGA et al., 2001) contribuindo para que os animais não adoeçam de anaplasmose. Mas, pode levar à morte do animal da espécie bovina na ausência da resposta imunológica humoral e celular contra este agente. Contudo, os búfalos da presente pesquisa, embora apresentando baixos níveis de anticorpos nos primeiros 90 dias de vida contra *A. marginale* não apresentaram sinais clínicos evidentes de infecção por este agente, indicando que, possivelmente, os animais ou não estavam infectados ou se estavam, esta infecção era ainda recente para os anticorpos séricos serem detectados.

No entanto, dos 91 aos 335 dias pós-parto, houve uma elevação na concentração dos anticorpos em Níveis ELISA, variando de 5 a 6 para *B. bovis* e *B. bigemina* e de 3 a 5 para *A. marginale*, sugerindo que as búfalas respondiam ao estímulo imunológico, possivelmente em função de novos desafios antigênicos oriundos de infestações por larvas de carrapatos infectados, presentes nas pastagens além das poucas ninfas que apresentam também a capacidade de transmitir *B. bigemina* (KUTTNER, 1998). Os resultados de pesquisas realizadas por STARKE et al. (1985 e 1994), na mesma fazenda do presente trabalho, revelaram que os búfalos eram infectados, particularmente por larvas de carrapatos *R. (B.) microplus*, pois, 75% das contagens desta espécie era representada por metalarvas, e poucas conseguiam alcançar o estágio adulto, mostrando pouca adaptabilidade dos carrapatos aos búfalos. Por outro lado, sabe-se que as metalarvas apresentam também potencial de transmissão de *B. bovis* e possivelmente *A. marginale* (SHIMADA et al., 2002). Carrapatos são considerados vetores da *A. marginale* para bovinos (KESSLER, 2001; KOCAN et al., 2004). O *R. (B.) microplus* é um carrapato monoxênico, mas os adultos, principalmente os

machos, podem migrar entre os animais por contatos físicos, principalmente entre mães e filhos e animais em atividades sexuais facilitando a transmissão transestadial e intraestadial de *A. marginale* de um animal a outro (KESSLER, 2001; CONNELL, 1974; MASON; NORVAL, 1981). Além disso, a presença de DNA de *A. marginale* em larvas originárias de teleóginas de *R. (B.) microplus* sugere uma transmissão transovariana (SHIMADA et al., 2004), aumentando em muito o risco da manutenção da infecção entre os animais, principalmente por meio de metalarvas. A transmissão transplacentária pode ser também uma outra forma de transmissão de *A. marginale* para os animais (ANDRADE et al., 2004).

Cabe ressaltar aqui, que as búfalas da presente pesquisa tinham aproximadamente a idade média de 10 anos, vieram para a fazenda experimental quando ainda bezerras e sempre se apresentaram clinicamente saudáveis. Como a região em estudo é considerada enzooticamente estável para a ocorrência de carrapatos e doenças transmissíveis (MADRUGA et al., 1984;1985, ARTILES et al., 1995; MADRUGA et al., 1997), a resistência imunológica natural conferida a estes animais existe, como também pode ser observada em outra espécie de búfalo (*Syncerus caffer*), após desafiar os animais com cepas patogênicas de *B. bigemina* (KARBE et al., 1979). Além disso, mesmo apresentando títulos altos de anticorpos, particularmente para *Babesia*, ou até mesmo para *Anaplasma* nos bezerros, estes animais não indicavam sinais clínicos da doença. Com relação à espécie bovina, VIEIRA et al. (2002), notaram a presença de 100% de animais soropositivos para *A. marginale*, mas com baixa infestação por *R.(B.) microplus* e concluíram que a manutenção da resposta imune humoral não estava relacionada com o índice parasitário pelo carrapato. Por outro lado, ANDRADE et al. (2001) relataram uma correlação positiva entre o aumento nos níveis de anticorpos anti-*A. marginale* com a carga de carrapatos encontrados em bezerros bovinos. Em búfalos, MIRAMPURI (1988) assinalou que era possível a transmissão de *A. marginale* por vetores biológicos, mecânicos e fômites, sendo os mesmos mecanismos de transmissão aos bovinos (VIDOTTO & MARANA, 2001). Assim sendo, várias formas de transmissão podem estar incriminadas na infecção dos

búfalos na região estudada, merecendo mais estudos a este respeito, corroborando com algumas informações de KESSLER (2001).

O presente trabalho demonstrou que os soros dos bezerros búfalos recém nascidos, colhidos antes dos mesmos terem acesso ao colostro, encontravam-se desprovidos de anticorpos contra os antígenos de todos os agentes testados. Porém, pelas análises sorológicas desses bezerros dentro das primeiras 24 horas pós-nascimento e com acesso ao colostro, foi constatada a presença de anticorpos em níveis aumentados para os agentes da TPB. Também SOUZA et al. (2004), demonstraram que anticorpos anti- *T. vitulorum* estiveram aumentados em bezerros búfalos após mamarem o colostro. Os dados do presente trabalho validam o que já foi constatado por outros autores de que não há transferência de imunoglobulinas da classe IgG, por via transplacentária nos bovídeos, pois sendo a placenta do tipo sindesmocoreal, esta não permite a passagem de macromoléculas para o feto (RAM & CHANDRA, 1984). Assim, o bezerro búfalo ao nascer apresenta um sistema imunológico imaturo e a ingestão do colostro é de fundamental importância para sua sobrevivência. A IgG é a imunoglobulina predominante no colostro destes animais, correspondendo de 65% a 90% das imunoglobulinas colostrais (TIZARD, 2002). Nas búfalas, 80% das proteínas do colostro são representadas pelas imunoglobulinas, o que revela sua importância durante as semanas iniciais de vida do bezerro (SILVA et al., 1993). Porém, para a absorção ser máxima, a primeira mamada deve ocorrer no máximo até as primeiras seis (06) horas de vida, porque com o passar do tempo a absorção das imunoglobulinas pelas vilosidades intestinais diminui gradualmente (ESCRIVÃO et al., 2005). Em geral, a permeabilidade é mais alta imediatamente após o nascimento e declina após seis horas, diminuindo para níveis de absorção relativamente baixos após 24 horas (TIZARD, 2002). Segundo GHIONNA et al. (1987), as concentrações de IgG colostrais da mãe bubalina sofrem significativo decréscimo 24 horas após o nascimento (SILVA et al., 1993).

No presente trabalho, verificou-se nos bezerros búfalos, uma transferência de anticorpos colostrais para a corrente sanguínea, pois se detectou, principalmente anticorpos anti-*B. bovis* e anti-*B. bgemina* nos soros dos recém-

nascidos, dentro das primeiras 24 horas após os animais mamarem o colostro. Estes anticorpos passivamente recebidos pelos bezerros declinaram rapidamente do nascimento aos 30 dias e mantiveram-se em níveis baixos até os primeiros 105 dias (animais analisados em grupo). Para a espécie bovina, MADRUGA et al. (1984; 1997) demonstraram que os anticorpos séricos contra *B. bigemina*, adquiridos com o colostro, permaneceram em níveis adequados nos primeiros 30 dias de vida dos animais.

Estes dados estão em perfeita concordância com os resultados obtidos das búfalas, tanto nos anticorpos dos colostros como nos soros, mais uma vez indicando a transferência passiva de imunidade humoral das mães para os bezerros búfalos. Estes anticorpos tiveram seu pico dentro das primeiras 24 horas de nascidos, e em seguida começaram a declinar suavemente durante os primeiros 30 dias. Como já discutido, o sucesso na proteção e na transferência das imunoglobulinas no soro de bezerros búfalos está próximo aos títulos dos adultos nas primeiras 24 horas (SILVA et al, 1993).

Verificou-se que após os 30 primeiros dias, os anticorpos anti-*Babesia* dos bezerros continuaram em queda até aproximadamente 105 dias de idade, significando uma ausência da resposta imune humoral ativa, principalmente contra *Babesia* neste período. Anticorpos anti-*Babesia* sempre estiveram inferior ao ponto de corte. Anticorpos anti-*Anaplasma*, ao contrário, continuaram elevando-se a partir dos 30 dias de idade e atingindo níveis superiores ao ponto de corte até os 365 dias de vida.

Quando os anticorpos entram em declínio e deixam de ser considerados protetores, os animais necessitam do contato com os agentes da TPB para desenvolver a imunidade ativa. Os vetores, principalmente os carrapatos, são influenciados pelo clima e também pelo tipo de pastagens para sua manutenção no ambiente (FURLONG & EVANS 1991; FURLONG, 1993; GAUSS & FURLONG, 2002). Entretanto, STARKE et al. (1985 e 1994) verificaram que apesar dos búfalos permanecerem sob as mesmas condições climáticas, pastagem, manejo e alimentação com os bovinos, estes últimos apresentaram seis vezes mais

carrapatos adultos do que os búfalos, demonstrando maior adaptabilidade destes ixodídeos aos bovinos.

A região em estudo apresenta temperaturas com pouca variação durante o ano, onde a média anual oscilou em torno de 24^o C e a precipitação pluvial delimita duas estações distintas; uma seca, que compreende os meses de maio a setembro e uma chuvosa aos meses de outubro a abril. Os búfalos apresentam uma estação de nascimento, que se inicia em fins de janeiro e prolonga-se até aproximadamente o mês de maio, com concentração maior durante fevereiro a março. O período em que os animais encontravam-se nesta faixa etária e com baixo nível de imunidade humoral (30 a 105 dias), correspondia exatamente com período de março a junho, entre o fim das águas e o início da seca. Observando-se o trabalho de STARKE et al. (1985) realizado no mesmo local, este foi o período em que os bezerros apresentaram também baixos índices de infestação por carrapatos, com uma tendência à elevação, para atingir a máxima infestação durante o período seco do ano (maio a setembro). No geral, raramente os búfalos adultos encontram-se infestados por carrapatos, mesmo coabitando as mesmas pastagens dos bovinos (STARKE-BUZETTI em comunicação pessoal). Embora, o carrapato *R. (B). microplus* seja ainda considerado o vetor biológico mais importante (RIBEIRO, 1991; NARI, 1995; VIDOTTO & MARANA, 2001), a anaplasmose pode ser transmitida mecanicamente por dípteros hematófagos, como *Haematobia irritans exigua* (ALLINGHAM et al., 1994), *Stomoxys calcitrans* (POTGIETER et al., 1981), ou tabanídeos, que são prolíferos na região estudada. LA FUENTE et al. (2004) detectaram DNA de *A. marginale* na probóscide de tabanídeo, sugerindo ser este muscídeo um potencial vetor mecânico deste agente. No entanto, a comprovação da transmissão de anaplasmose por vetores mecânicos necessita ainda ser realizada, principalmente para os bubalinos.

Por outro lado, a elevação nos níveis de anticorpos anti-*A. marginale* após os 105 dias, sugere uma resposta imune adaptativa destes búfalos em contato com este agente infeccioso, respondendo imunologicamente pela produção de anticorpos e iniciando uma imunidade ativa. Para bovinos, alguns autores também sugeriram que esta elevação posterior dos anticorpos, com o avançar da idade,

pode ser uma aquisição de imunidade ativa pelo contato subsequente com os carrapatos ou outros agentes, indicando uma infecção após o nascimento (VIDOTTO et al., 1999; ANDRADE et al., 2001; YOSHIHARA et al., 2003; ANDRADE et al., 2004; PACHECO et al., 2004), podendo perdurar por longo período dependendo da taxa de infestação diária de carrapatos infectados (VIDOTTO, 1999; LABRUNA & MACHADO, 2006). Segundo FARIAS & LEMOS (2001), mesmo quando ocorre a eliminação do agente, encontra-se ainda anticorpos anti-*A. marginale* por um grande período, ou seja, por até 5 anos.

Quando se tenta comparar os dados obtidos neste trabalho com os de bovinos, deve-se levar em consideração que os búfalos são considerados resistentes à infestação por carrapatos (STARKE et al., 1985;1994) e conseqüentemente à tristeza parasitária (COSTA et al. 1997). Como relatado por STARKE et al. (1985 e 1994), os búfalos adquirem uma infestação de *R. (B.) microplus* muito inferior aos bovinos, mesmo convivendo na mesma pastagem. Os bezerros búfalos infestam-se com metalarvas dos carrapatos, mas apenas um percentual de 1 a 2% delas evoluem para o estágio adulto. Entretanto, estas poucas larvas podem ser suficientes para infectá-los com *Babesia* ou *Anaplasma*. Este baixo nível de infecção destes animais é suficiente para sensibilizar o sistema imunológico dos bezerros e os tornarem resistentes às infecções subsequentes. As búfalas já adultas, pelo contato diário com novas metalarvas provenientes das pastagens, mantêm ativamente a resposta imune e, desta forma, transferem anticorpos anti-*Babesia* e anti-*Anaplasma* para o colostro e conseqüentemente para os bezerros.

No presente trabalho, houve uma variabilidade individual entre os animais na resposta imune à tristeza parasitária, principalmente quando se analisou individualmente dois bezerros e suas respectivas mães. Mas, percebeu-se claramente que as búfalas apresentaram níveis de anticorpos bem mais altos do que os bezerros, e que estes últimos demoraram vários meses (3 a 4 meses) para iniciar a aquisição da imunidade ativa. Este período pode ser variável e dependente da condição de infestação de carrapatos e outros agentes transmissores. Ainda nos bezerros, o aparecimento da imunidade ativa contra *A.*

marginale foi mais precoce do que para as espécies de *Babesia*, no entanto, a imunidade foi mais duradoura e mais sólida contra *Babesia*, particularmente, *B. bovis*, como se verifica nas búfalas adultas.

Mottlelib (1987) citado por COSTA et al. (1997) verificou que bezerros bubalinos com baixa resistência orgânica podem desenvolver a doença de forma bastante severa, isto tudo se deve quando submetidos a manejo e higiene precários e em regimes intensivos com altas lotações de animais. No entanto, os resultados aqui discutidos representam os de um rebanho bubalino com bom manejo nutricional, que sempre se apresentaram saudáveis e sem qualquer manifestação clínica da TPB ou de outras enfermidades infecciosas, parasitárias ou metabólicas.

7 CONCLUSÕES

1. As búfalas e os seus bezerros apresentaram resposta imune humoral contra *Babesia* e contra *Anaplasma*.
2. Foi verificada a transferência passiva de anticorpos colostrais anti-*B.bovis*, anti-*B.bigemina* e anti-*A. marginale* para os bezerros búfalos.
3. Nos bezerros, houve produção ativa de anticorpos, mas acima dos 105 dias de idade e somente para *A. marginale*. A imunidade contra *Babesia*, particularmente, *B. bovis*, foi mais duradoura e mais sólida nas búfalas adultas, pelo menos durante o período do monitoramento (até 12 meses pós-parto/nascimento).
4. Observou-se variabilidade individual quanto à ocorrência de anticorpos anti-*Babesia* e anti-*Anaplasma* nos animais adultos e nos bezerros.
5. Os anticorpos, embora detectados em baixos níveis, demonstram que estes animais são considerados portadores resistentes dos agentes da babesiose e anaplasmosose.

8 REFERÊNCIAS

ALLINGHAM, P. G.; LEATCH, G.; KEMP, D. H. An attempt to transmit *Anaplasma marginale* by buffalo flies (*Haematobia irritans exigua*). **Aust. Vet. J.**, v. 71, n. 4, p. 122-123, 1994.

AMERASINGHE, P. H.; VASANTHILAKE, V. W. S. M.; LLOYD, S.; FERNANDO, S. T. Periparturient reduction in buffalo of mitogen-induced lymphocyte proliferation and antibody to *Toxocara vitulorum*. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 26, p. 109-116, 1994.

ANDRADE, G. M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C.; YOSHIHARA, E.; KANO, F. S.; AMARAL, C. H. S. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in dairy cattle and studies on the dynamics of natural infection of Holstein calves in Southern Brazil. **Semina, Ci. Agrar.**, v. 22, n. 2, p. 155-159, 2001.

ANDRADE, G. M.; GAVA, F. N.; MACHADO, R. Z. Estudo da transmissão do *Anaplasma marginale* em bezerros recém-nascidos antes e após ingestão do colostro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13, 2004, Ouro Preto, **Anais...** Ouro Preto: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2004. p. 351.

ANUALPEC: Anuário de pecuária brasileira. **Rebanho bubalino no Brasil**, 2004. p. 300.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; LEAL, C. R. B.; SCHENK, M. A. M.; KESSLER, R. H.; MARQUES, A. P. C.; LEMAIRE, D. C. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. **Vet. Parasitol.**, v. 74, p. 101-108, 1998.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 23, n. 4, p. 139-148, 2003.

ARTECHE, C. C. P. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil. Uso de cepas atenuadas da *Babesia* spp e de cepa de *Anaplasma*. **Hora Vet.**, v. 11, n. 66, p. 39-42, 1992.

ARTILES, J.; ALVES-BRANCO, F. P. J.; MARTINS, J. R.; CORREA, L. B.; SAPPER, M. F. Prevalência de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma*

marginale no município de Bagé, RS. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.4, n.2, p.179, 1995. Suplemento 1.1

BALDANI, C. D.; MACHADO R. Z.; BOTTEON, P. T. L.; TAKAKURA, F. S.; MASSARD, C. L. An enzyme-linked immunosorbant assay for the detection of IgG antibodies against *Babesia equi* in horses. **Ci. Rur.**, v. 34, n. 5, p. 1525-1529, 2004.

BANERJEE, D. P.; MOMIM, R. R.; SAMANTA, R. A. Y. Cross transmission of *Babesia bigemina* from cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*) to buffalo (*Bubalus bubalis*). In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 2, 1998, New Delhi **Proceedings...** New Delhi: Indian Council of Agricultural Research, 1998. p. 329.

BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; MYLER, P. J.; MCGUIRE, T. C. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide. AM 105L. **Infec Immunol.** v. 55, p. 2428-2435, 1987

BERNARDES, W.; BERNARDES, O. Exploração leiteira de búfala: aproveitamento industrial de búfalos. In: SAMARA, S. I.; DUTRA, I. S.; FRANCESCHINI, P. H.; MOLERO FILHO, J. R.; CHACUR, M. G. M. (Ed.) **Sanidade e produtividade em búfalos** Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1993. p. 161-171.

BROCKLESBY, D. W. Recent observation on piroplasmiasis of cattle in the United Kingdom. **Bull. L'off int. des Épizoot.**, v. 86, p. 19-26, 1976.

CALLOW, L. L.; PARKER, R. J.; RODWELL, B. J.; OTTLEY, M. L. Piroplasmiasis in buffaloes and its serological diagnosis based on a homology between buffalo and bovine immunoglobulins. **Aust. Vet. J.**, v. 52, p. 40-41, 1976

COCKRILL, W. R. **O búfalo em ascensão**: animal doméstico fundamental, criação, proteção e saúde animal. In: RAMOS, A.A.; VILLARES, J.B.; MOURA, J.C.(Ed.). **Os búfalos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1981. p. 01-54.

COSTA, C. L.; KOHAYAGAWA, A.; DELL'PORTO, A.; BOMFIM, S.R.M. Determinação dos níveis de anticorpos anti-babesia spp. em bezerros bubalinos (*Bubalus bubalis*), desde o nascimento até um ano de idade. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.6, n. 2, p. 117-121, 1997.

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. **Vet. Parasitol.**, v. 13, p. 317-323, 1983.

DE LA FUENTE, J.; NARANJO, V; RUIZ-FONS, F.; HÖFLE, U.; MERA, I. G. F.; VILLANÚA, D.; ALMAZÁN, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; KOCAN, K. M.; GORTÁZAR, C. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of

Anaplasma marginale and *A. phagocytophilum* in Central Spain. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases.**, v. 5, n.4, p. 390- 401, 2005.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

ERIKS, I. S.; STILLER, D.; GOFF, W. L.; CALYPOOL, P. L.; EDWARDS, W.; EWING, S. A.; McGUIRE, T. C.; HAIR, J. A.; BARRON, S. J. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. **J. Clin. Micro.**, v.31, p. 2091-2096, 1993.

ESCRIVÃO, S. C.; BASTIANETTO, E.; NASCIMENTO, E. F.; GHELLER, V. A.; AMARAL, F. R.; SERRANO, A. L. Criação de bezerros bubalinos. **Rev Bras Reprod Anim.** v. 29, n. 1, p. 46-48, 2005.

FAJARDO, F. A piraplasrose bovina no Rio de Janeiro. **Rev. Med. São Paulo**, v. 18, p. 315-319, 1901.

FARIAS, N. A. R.; LEMOS, R. A. A Tristeza Parasitária Bovina. In: LEMOS, R. A. A.; BARROS, N.; BRUM, K. B. **Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte**: perguntas e respostas. Campo Grande:UFMS, 2002. p. 199-209.

FRANZOLIN-NETO, R, DELL'PORTO, A.; LACAZ RUIZ, R. Anaplasmosis and babesiosis: a clinical case in Buffalo (*Bubalus bubalis*) calf in Brazil. **Buffalo Bull.**, v. 8, n. 3, p. 54-68, 1989.

FRANZOLIN-NETO, R. Perspectiva da criação de búfalos no Brasil. Aproveitamento industrial de búfalos. In: SAMARA, S. I.; DUTRA, I. S.; FRANCESCHINI, P. H.; MOLERO FILHO, J. R.; CHACUR, M. G. M. (Ed.) **Sanidade e produtividade em búfalos** Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1993. p. 01-15.

FONSECA, A. H.; PEREIRA, M. J. S.; FONSECA, A. H. LEITE, R. C. Desempenho do programa BABSIM no estudo epidemiológico de *Boophilus microplus* (Canestrini) 1889) (Acari: Ixodidae). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 52, n. 4, p. 342-349, 2000.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Cad. Tec. UFMG**, Belo Horizonte, n.8, p. 49-61, 1993.

FURLONG, J.; EVANS, D. Epidemiologia do carrapato *B. microplus* no Brasil: necessidade de uma abordagem compreensível para seu estudo realístico. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 7, 1991, São Paulo **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1991, p.48-50.

GAUSS, C. L. B.; FURLONG, J. Comportamento de larvas infestantes de *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Ci. Rur.**, v. 32, n. 3, p. 467-472, 2002.

GE, N. L.; KOCAN, K. M.; BLOUIM, E. F.; MURPHY, G. L. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales:Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adults using nonradioactive in situ. **J. Med. Ent.**, v. 33, p. 911-920, 1996.

GOMES, R.A.; STARKE-BUZETTI, W.A.; MACHADO, R.Z. Resposta imune-humoral de búfalos (*Bubalus bubalis*) infectados naturalmente por *B. Bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13, 2006, Ribeirão Preto **Anais...** Ribeirão Preto: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p.312.

GONZÁLES, J.C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Can. 1887) (Revisão histórica e conceitual). **Hora Vet.** v. 21, n. 125, p. 23-28, 2002.

GHIONNA, C. M.; VERNA, M.; CATILLO, G. Chemical composition of water buffalo colostrum in six milking after calving. **An. Inst. Sperim. Zootec.**, v. 20, p. 59-72, 1987.

GRIFFITHS, R. B. Parasites and parasitic diseases. In: COCKRILL, W. R. (Ed) **The husbandry and health of the domestic buffalo**. Rome: FAO, 1974. p. 236-275.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G. E. M.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Vet.**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GUIDO, M. C.; DELL'PORTO, A.; FUJII, T. U.; ARTES, R. Prevalence of hemoparasites in buffaloes from Ribeira Valley south coast of São Paulo, Brazil State-Brazil. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, São Paulo. **Proceedings...**, 1994, Brazil. p. 325-327.

GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Vet. Parasitol.** v. 57, p. 109-119, 1995.

HODGSON, J.H. Biology and transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 653, p. 42-51, 1992.

HOOGSTRAAL, H. Review article: the epidemiology of tick-borne Crimean-Congo Hemorrhagic fever in Asia, Europe and Africa. **J. Med. Entomol.**, v.15, p.307-417,1979.

KARBE, E.; GROOTENHUIS, J. G.; KELLEY, S. KARSTAD, L. Experiments on the *Babesia bigemina* carrier state in East African buffalo and eland. **Tropenmed. Parasitol.** v. 30, n. 3, p. 313-317, 1979.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001

KOCAN, K. M., GOFF, W. L., STILLER, D.; CLAYPOOL, P. L.; EDWARDS, W. EWING, S. A.; HAIR, J. A., BARON, S. J. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) im male Dermacentor andersoni (Acari;Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible cattle. **J. Med. Ent.**, V.29, p. 657-668, 1992.

KROLOW, R. P.; BRITTO, C. F.; RUAS, J. P.;SANTOS, T. B.; BERNE, M. E. A.; SACCO, A. M. S.; FARIAS, N. A. *Babesia bovis*: Imunidade colostral, primoinfecção e resposta imune em bovinos naturalmente infectados, no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA,12, 2002a Rio de Janeiro, **Anais eletrônicos...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002a. 1CD-ROOM

KROLOW, R. P.; BRITTO, C. F.; RODRIGUES, A. S. L.; RUAS, J. P.; BERNE, M. E. A.; SANTOS, T. B.; FARIAS, N. A. *Babesia bigemina*: Imunidade colostral, primoinfecção e resposta imune em bovinos naturalmente infectados, no Sul do Rio Grande do Sul. In: In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29, 2002b, Gramados **Anais eletrônicos...** Gramados: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária. 2002b. 181. 1CD ROOM

KUTTER, K. L. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. **J. Wildl. Dis.**, v. 20, p. 12-20, 1984.

KUTTLER, K. L. Babesiosis. foreign animal diseases “ The gray Book” 1998. Disponível em: <[http:// www.vet.uga.edu/vpp/gray_book/pdf/cover.htm](http://www.vet.uga.edu/vpp/gray_book/pdf/cover.htm)> Acesso em 12 dez. 2001

LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região Neotropical. In: BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. (Ed.). **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical**: um guia ilustrado para identificação das espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. Cap.10, p.155-164.

LAU, H. D. Babesiose e Anaplasmosse. In: LAU, H. D. **Doenças em búfalos no Brasil**. diagnóstico, epidemiologia e controle. Brasília. EMBRAPA., 1999. p.99-145.

LEITE, R. C.; LIMA, J. D. Fatores sanitários que influenciam na criação de bezerros. **Arq. Esc. Vet. UFMG.**, v. 34, n. 3, p. 485-492, 1982.

LEVINE, N.D. Taxonomy of the piroplasm. **Trans. Am. Microsc. Soc.**, v. 90, p. 2-23, 1971.

LIU, Z.; ZHAO, G.D.; MA, L.; YAO, B. An investigation of babesioses in buffaloes in Hubei province. **Acta Vet. Zootec. Sin.**, v. 17, n. 1, p. 49-54, 1984.

LIU, Z.; ZHAO, J.; MA, L.; YAO, B. *Babesia orientalis* sp. nov., a parasite of buffaloes (*Bubalus bubalis*) in China. **Acta Vet. Zootec. Sin.**, v. 28, n. 1, p. 84-89, 1997.

LLOYD, S. Effect of pregnancy and lactation upon infection. **Vet. Immunol. Immunopath.**, v. 4, p. 153-176, 1983.

MAAS, J.; LINCOLIN, S. D.; COAN, M.E. Epidemiological aspects of bovine anaplasmosis in semiarid range conditions of south Idaho. **Am. J. Vet. Res.**, v. 47, p. 528-533, 1986.

MACHADO NETO, R.; PRADO, G. V. B.; BESSI, R.; HATTNER, F. L. Flutuação das proteínas séricas em vacas primíparas e múltíparas no período pré-parto. **Sci. Agric.**, v. 52, n. 1, p. 158-160, 1995.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R. F.; VALADÃO, I. F. 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.**, v. 71, p. 17-26, 1997.

MADRUGA, C. R.; AYCARD, E.; PUTL, N. Epidemiologia de anaplasmoses e babesiose em bovinos na região do cerrado do Estado de Mato Grosso do Sul. I Prevalência. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 35, n. 5, p. 631-640, 1983.

MADRUGA, C. R.; AYCARDI, E.; KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.; FIGUEIREDO, G. R.; CURVO, J. B. E. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *B. bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamento de Nelore. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 19, n. 9, p. 1163-1168, 1984.

MADRUGA, C. R.; KESSLER, R. H.; GOMES, A.; SCHENK, M. A. M.; ANDRADE, D. F. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 1985.

MADRUGA, C. R.; MARQUES, A. P. C.; QUEIROZ, R. A.; VAZ, E. C. Avaliação de um teste Elisa para detecção de anticorpos contra *B. bigemina* em bovinos de áreas de estabilidade enzoótica e instabilidade enzoótica In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, 10.1997, Itapema **Anais...** Itapema: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1997. p.302.

MADRUGA, C. R., ARAUJO, F. R.; SOARES, C. O. (Ed.) **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001, 306 p.

MARTINS, J. R.; CERESÉR, V. H.; CORREA, B. L.; ARTECHE, C. C. P.; MINGUITA, M.; LEAL, C. R. B.; CARVALHO, E. L. L. Prevalência de anticorpos *B. bovis* em Santana do Livramento, RS. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINARIA DO CONE SUL, 1. CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINARIA, 12. 1994, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Riograndense de Medicina Veterinária, 1994. p.57.

MASSARD, C. L.; FREIRE, R. B. Etiologia, manifestações e diagnóstico das babesioses bovinas no Brasil. **Hora Vet.**, v. 23, p. 53-56, 1985.

MELHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Adv. Parasitol.**, v.23, p.37-99, 1984.

MIRANPURI, G. S. Tick parasitising the Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) and their possible role in disease transmission. **Vet. Parasitol.**, v. 27, p. 357-362, 1988.

MISHRA, A. K., REDDY, G. G. B.; RAO, J. R.; TEWARI, A. K. Detection of *Babesia bigemina* antibodies by Dot-Elisa in cattle and buffaloes. **Acta Parasitol.**, v. 43, n. 1, p. 43-45, 1998.

MOHAN, R. N. Diseases and parasites of buffaloes. III. Parasitic and miscellaneous diseases. **Vet. Bull.**, v. 38, p. 735-756, 1968.

MONTEIRO, A. M. F.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; FACURY FILHO, E. J. Perfil sorológico para *Anaplasma marginale* em bezerros naturalmente infectados em Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EPARASITOLOGIA VETERINARIA, 10, 1997 Itapema **Anais...** Itapema: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1997. p. 326.

MOURA, A. B.; VIDOTTO, O.; YAMAMURA, M. H.; VIDOTTO, M. C.; PEREIRA, A. B. L. Studies on the *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) infection in *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) using 'NESTED' PCR **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 12, n. 1, p. 27-32, 2003.

MURALEEDHARAN, K.; SYED ZIAUDDIN, K.; GOPALASWAMY, K.; MURALEEDHAR, T.; SESHADRI, S. J. Some observations on clinical cases of *Babesia bovis* (BABES, 1888) Starcovici, 1893, in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Ind. Vet. J.**, v. 61, p. 76-79, 1984.

NARI, A. Strategies for control of one-host ticks and relationship whit tick-borne diseases in South America. **Vet. Parasitol.**, v. 57, p. 153-165, 1995.

NEWBY, T. J.; BOURNE, J. The nature of the local immune system of the bovine mammary gland. **The J. Immunol.**, v. 118, n. 2, p. 461-465, 1977.

NUÑES, J. L.; MUÑOZ-COBEÑAS, M. E.; MOLTEDO, H. L. **Boophilus microplus the commom cattle tick**. Berlin: Springer-Verlag, 1985. 204p.

OLIVEIRA, A. L. Aproveitamento industrial de búfalos. In: SAMARA, S. I.; DUTRA, I. S.; FRANCESCHINI, P. H.; MOLERO FILHO, J. R.; CHACUR, M. G. M. (Ed.) **Sanidade e produtividade em búfalos**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1993. p. 185-202.

OLIVEIRA, G. P. Fatores que afetam economicamente a produção de bovinos. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 26, n. 3, 1983.

OSAKI, S. C.; VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M.; VIDOTTO, M. C.; YOSHIHARA, E.; PACHECO, R. C.; IGARASHI, M.; MINHO, A. P. Ocorrência de anticorpos anti *Babesia bovis* e estudo sobre a infecção natural em bovinos da raça nelore na região de Umuarama, Paraná, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 11, n. 2, p. 77-83, 2002.

PACHECO, R. C.; VIDOTTO, O.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M.; KAWASAKI, P.; PRUDÊNCIO, L. B.; MARANA, E. R. M., LUZ PEREIRA, A. **Dinâmica da infecção natural pelo *Anaplasma marginale* em vacas e bezerros da raça Holandesa, na região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil** **SEMINA**, v.25 ,n.3 , p. 235-244, 2004.

PALMER, G. H. *Anaplasma vaccines* In: WRIGHT, I.G. **Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines**. Boca Raton :CRC Press,1989. p. 1-29.

PATARROYO SALCEDO, J. H. P.; RIBEIRO, M. F. B.; SANTOS, J. L.; FARIA, J. E. Epidemiologia das babesioses no Estado de Minas Gerais: I. Prevalência de Anticorpos fluorescentes na Zona da Mata-MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 39, p. 423-429, 1987.

POTGIETER, F. T.; SUTHERLAND, B.; BIGGS, H. C. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca raptipes* and *Stomoxys calcitrans*. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 48, n. 2, p. 119-122, 1981.

PRADA-SANMIGUEL, G. A. Determination of endoparasites population in water buffalos (*Bubalus bubalis*) in Magdalena Media, Colombia. **J. Anim. Sci.** v. 84, p. 164, 2006. Suppl. 1

PUMELL, R. E. Babesiosis in various hosts. In: RISTIC M., KREIER, J.P. (Ed.), **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981, p. 25-63.

QUINTÃO E SILVA, M. G.; RIBEIRO, M. F. B. Infection rate of *Babesia* spp. Sporokinetes in engorged *Boophilus microplus* from an area of enzootic stability in

the State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 999-1002, 2003.

RAM, R.; CHANDRA, G. Macroscopic studies on the placenta of buffalo (*Bubalus bubalis*). **Indian Vet. J.**, v. 61, p. 458-462, 1984.

RAJPUT, Z. I.; HU, SONG-HUA; ARIJO, A. G.; HABIB, M.; KHALID, M. Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. **J. Zhejiang Univer. Scien.**, v. 6, n. 11, p. 1057-1062, 2005.

RIBEIRO, M. F. B.; SALCEDO, J. H. P. Anaplasmosose e babesiose. **Inf. Agropec.**, Belo Horizonte, v. 8, n. 95, p. 17-19, 1982.

RIBEIRO, M. F. B. **Morfologia, evolução e reprodução do *Anaplasma marginale* Theiler, 1910 em células epiteliais intestinais de teleógenas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Estudo ao microscópio óptico e eletrônico.** 1991. 134 f. Tese (Doutorado), UFMG, Belo Horizonte, 1991.

ROCHA, U. F.; SERRA, O. P.; GROCK, R.; SERRA, R. G. Infestação natural de búfalos, *Bubalis bubalis* L., 1758 dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil, por *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) e por *Anocenter nitens* (Neumann, 1897), Acari, Ixodidae. **Arq. Inst. Biol.**, v. 36, p. 197-199, 1969.

ROYCHOUDHURY, G. K. ; GAUTAM, O. P. Experimental studies on the pathogenicity of *Babesia bigemina* in buffalo calves. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 11, p. 91-93, 1979.

SANTOS, T. R. B.; GONZALES, J. C.; CHIES, J. M.; FARIAS, N.A.R. Transmissão transovariana de *B. bigemina* (SMITH & KILBORNE, 1883) por partenógenas de *B. microplus* (CANESTRINI, 1887) **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 7, n. 1, p. 07-10, 1998.

SERRA-FREIRE, N. M. Tristeza parasitaria bovina. Retrospectiva. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE AS PARASITÓSES, 1, 1979, Campo Grande **Anais...** EMBRAPA/CNPQC, 1979. p.271-278.

SHARMA, S. P. Characterization of *Anaplasma marginale* infection in buffaloes. **Indian J. Anim. Scien.** v. 57, n. 2, p. 76-78, 1987.

SHIMADA, M. K.; YAMAMURA, M. H.; KAWASAKI, P.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M.; HIRAKAVA, M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. Detection of *A. marginale* DNA in larvae of *B. microplus* ticks by Polymerase Chain Reaction. **Ann. N. Y. Sci.**, 1026, p. 95-102, 2004.

SILVA, M. C.; QUEIROZ, W. T.; LAU, H. D.; VALE, W. G. Colostrum and serum protein levels in water buffaloes. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 28, n. 6, p. 751-757, 1993.

SILVA, G. A. C.; KROLOW, R. C. P. CUNHA-FILHO, N. A.; SACCO, A. M. S.; FARIAS, N. A. R. *Anaplasma marginale*: Imunidade passiva e ativa em bovinos nascidos na primavera no sul do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 30, 2003, Manaus **Anais eletrônicos...** Manaus: Colégio Brasileiro de Medicina Veterinária.2003. p. 146. 1CD ROOM

SMITH, T.,; KILBOURNE, F.L. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. **Bur. Anim. Ind. Bull.**, v. 1, p. 1-301, 1893.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; SCOFIELD, A.; MADRUGA, C. R.; CUNHA, N. C.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Soroprevalência da *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 26-30, 2000a.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; SCOFIELD, A.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 20, n. 3, p. 97-101, 2000b.

SOUZA, E. M.; STARKE-BUZETTI, W. A.; FERREIRA, F. P.; NEVES, M. F.; MACHADO, R. Z. Humoral immune response of water buffalo monitored with three different antigens of *Toxocara vitulorum*. **Vet. J.** v. 122, p. 67-78, 2004.

SRIVASTAVA, R.; AHLUWALIA, S. S. A clinical case of anaplasmosis in buffalo. **Indian Vet. J.**, v. 51, n. 5, p. 371-374, 1974.

STARKE, W. A.; ROCHA, U. F.; MACHADO, R. Z.; ZOCOLLER, M. C. Prevalence and intensity of infestation by *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), under natural conditions, in buffalos in Mato Grosso do Sul State, Brazil. In: CONFERENCE OF THE WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY. 11, 1985, Rio de Janeiro, **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1985. p. 10.

STARKE, W. A.; EVANGELISTA, F. M. M.; ZOCOLLER, M. C. Comparative study of the natural infestation by *Boophilus microplus* tick between buffalo and cattle. In: WORLD BUFALLO CONGRESS, 4, 1994, São Paulo **Anais...** v. 2, 1994. p. 102.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology**. An Introduction. In: **Immunity in the fetus and newborn**, Philadelphia, 6^o edição, W.A Saunders Company, 2002. 532 p.

VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C.; YAMAMURA, M. H. ANDRADE, G. M.; YOSHIRA, E. B.; KNOWLES, D. P. Detecção de *Anaplasma marginale* em diferentes estágios evolutivos do *Boophilus microplus*, utilizando a técnica de PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA. 10, 1997, Itapema **Anais...** Itapema: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1997a , p. 322.

VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C.; ANDRADE, G. M.; PALMER, G.; McELWAIN, T.; KNOWLES, D. P. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* on cattle in Paraná state, Brazil, by major surface protein 5 competitive enzyme-linked immunosorbent assay. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, 10, 1997, Itapema **Anais...** Itapema: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1997b, p. 321, 1997b.

VIDOTTO, O.; ANDRADE, G. M.; KANO, F. S.; PACHECO, R. C.; MOURA, A. B. Determinação dos níveis de anticorpos anti-*Anaplasma marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*, pela técnica cElisa e imunofluorescência indireta, em bezerros da raça simental, do nascimento até um ano de idade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, 11, 1999, Salvador **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 203.

VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M. Diagnóstico em anaplasmose bovina. **Ci. Rur.** v. 31, n. 2, p. 361-368, 2001.

VIEIRA, M. I. B.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R.; SACCO, A. M. S.; SILVA, J. G. C. Resposta imune humoral contra *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) em bovinos submetidos a distintas estratégias de controle do carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 11, n. 2, p. 71-76, 2002.

ZHAO, J. L.; LIU, Z. L.; YAO, B. A.; MA, L. H. Culture-derived *Babesia orientalis* exoantigens used as a vaccine against buffalo babesiosis. **Parasitol. Res.**, v. 88, p. 38-40, 2002.

YAO, B.; ZHAO, J.; LIU, E.; DING, S.; SHI, J.; LIU, Z. L. Sorological investigations on *Babesia orientalis* infection. Status of water buffaloes in Hubei Province. **Parasitol. Res.**, v. 88, p. 11-12, 2002.

YOSHIHARA, E.; VIDOTTO, O.; YAMAMURA, M. H.; MARANA, E. R. M.; PACHECO, R.; SILVEIRA, A. P. Studies of natural infection with *Anaplasma marginale* in nelore cattle in the Umuarama municipality, Paraná State, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 12, n. 1, p. 21-26, 2003.

ANEXOS

- Anexo 1:** Soros de referência negativo de bezerros búfalos antes de mamar o colostro. Soros analisados por meio do ELISA-teste indireto para antígenos de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.
- Anexo 2:** Soros de referência positivo de búfalas adultas. Soros analisados por meio do ELISA-teste indireto para antígenos de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.
- Anexo 3:** Resultados dos Níveis ELISA para anticorpos anti- *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* calculado para anticorpos sorológicos de búfalas adultas e bezerros búfalos.
- Anexo 4:** Colostros/leites de referência negativo analisados por meio do ELISA-teste indireto para antígenos de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.
- Anexo 5:** Colostros/leites de referência positiva analisados por meio do ELISA-teste indireto para antígenos de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.
- Anexo 6:** Resultados dos Níveis ELISA para anticorpos anti- *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* calculado para anticorpos presentes no colostros/leites de búfalas adultas.
- Anexo 7.** Gráfico bioclimático com as precipitações pluviiais e temperaturas médias de março de 1999 a fevereiro de 2000. Selvíria, MS, 1999/2000.
- Anexo 8.** Gráfico bioclimático com as precipitações pluviiais e temperaturas médias de janeiro a dezembro de 2005. Selvíria, MS., 2005.

Anexo 1: Titulação de anticorpos em soros de referência negativa obtidos de bezerros búfalos antes de mamar o colostro. Soros analisados pelo teste ELISA indireto para antígenos de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.

Soros	Titulação de anticorpos (DO)		
	Anti- <i>B. bovis</i>	Anti- <i>B. bigemina</i>	Anti- <i>A. marginale</i>
N1	0,120	0,162	0,106
N2	0,122	0,186	0,108
N3	0,122	0,186	0,103
N4	0,129	0,182	0,106
N5	0,131	0,196	0,105
N6	0,129	0,188	0,108
N7	0,134	0,173	0,107
Média	0,1265	0,1801	0,1058
Desvio Padrão	0,006	0,011	0,0015

DO= Densidade Ótica

Anexo 2: Titulação de anticorpos em soros de referência positiva obtidos de búfalas adultas. Soros analisados pelo teste ELISA indireto para antígenos de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.

Soros	Titulação de anticorpos (DO)		
	Anti- <i>B. bovis</i>	Anti- <i>B. bigemina</i>	Anti- <i>A. marginale</i>
P1	0,982	1,318	0,868
P2	0,944	0,924	0,690
P3	1,053	1,070	1,449
P4	1,092	0,936	0,715
P5	1,214	1,005	0,698
P6	1,397	0,906	0,842
P7	0,923	1,056	1,763
P8	1,697	1,096	0,650
P9	1,191	0,934	0,651
P10	0,902	1,025	0,665
P11	1,415	1,276	0,655
P12	1,856	1,276	0,655
P13	1,363	1,006	0,881
P14	-	1,207	-
P15	-	0,972	-
Média	1,233	1,0671	0,8601
Desvio Padrão	0,301	0,1390	0,3475

DO= Densidade Ótica

Anexo 3: Resultados dos níveis ELISA (NE) para anticorpos anti- *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* calculado nos soros das búfalas adultas e bezerros búfalos.

	Níveis ELISA (NE)		
	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>
N0	0,000 – 0,138	0,000 – 0,204	0,000 – 0,108
N1	0,139 – 0,186	0,205 – 0,276	0,109 – 0,146
N2	0,187 – 0,251	0,277 – 0,372	0,147 – 0,197
N3	0,252 – 0,338	0,373 – 0,502	0,198 – 0,266
N4	0,339 – 0,457	0,503 – 0,678	0,267 – 0,359
N5	0,458 – 0,617	0,679 – 0,915	0,360 – 0,484
N6	0,618 – 0,833	0,916 – 1,235	0,485 – 0,654
N7	0,834 – 1,124	1,236 – 1,667	0,655 – 0,883
N8	1,124 – 1,517	1,668 – 2,251	0,884 – 1,192
N9	≥ 1,518	≥ 2,252	≥ 1,193
Ponto de Corte	0,316	0,450	0,265

Anexo 4: Titulação de anticorpos em colostros/leites de referência negativa analisados por meio do teste ELISA indireto para antígenos de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.

Colostro/Leite	Titulação de anticorpos (DO)		
	Anti- <i>B. bovis</i>	Anti- <i>B. bigemina</i>	Anti- <i>A. marginale</i>
N1	0,244	0,208	0,180
N2	0,263	0,197	0,175
N3	0,258	0,197	0,179
N4	0,228	0,201	0,164
N5	0,220	0,205	0,154
N6	0,230	0,202	0,154
N7	0,235	0,201	0,156
N8	0,245	0,205	0,149
N9	0,228	0,208	0,248
N10	0,238	0,200	0,179
Média	0,239	0,202	0,174
Desvio Padrão	0,014	0,004	0,028

DO= Densidade Ótica

Anexo 5: Titulação de anticorpos em colostros/leites de referência positiva analisados por meio do teste ELISA indireto para antígenos de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.

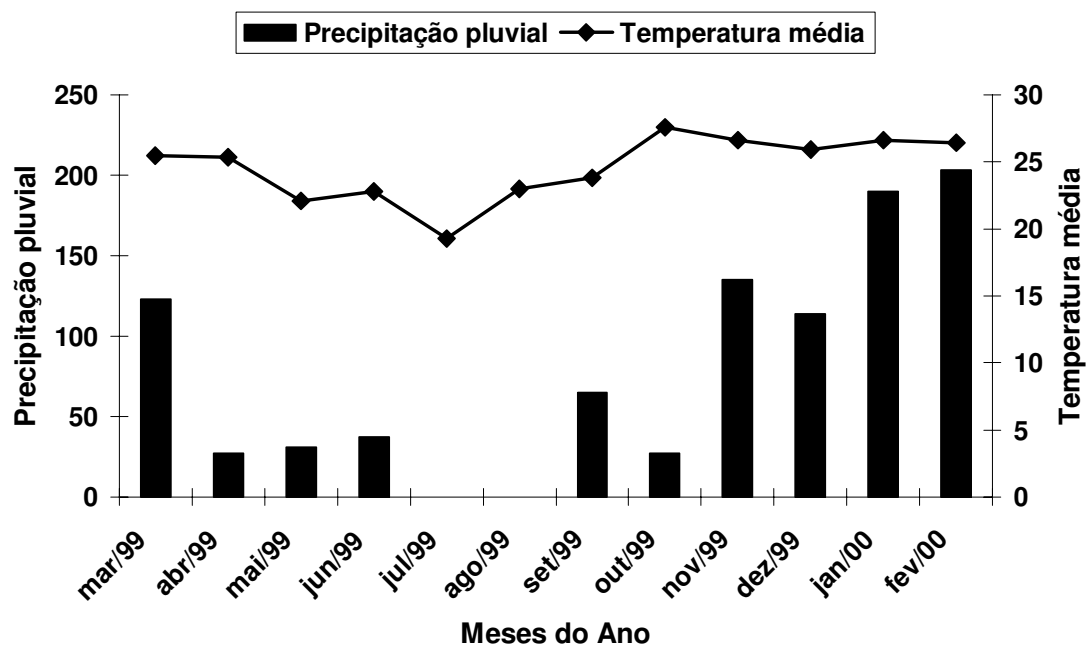
Colostro/Leite	Titulação de anticorpos (DO)		
	Anti- <i>B. bovis</i>	Anti- <i>B. bigemina</i>	Anti- <i>A. marginale</i>
P1	1,479	0,792	1,200
P2	1,650	0,662	1,220
P3	1,610	0,886	0,429
P4	1,210	0,776	0,462
P5	1,211	0,624	-
P6	0,768	0,698	-
P7	0,892	-	-
P8	0,904	-	-
Média	1,4504	0,739	0,827
Desvio Padrão	0,3414	0,096	0,014

DO= Densidade Ótica

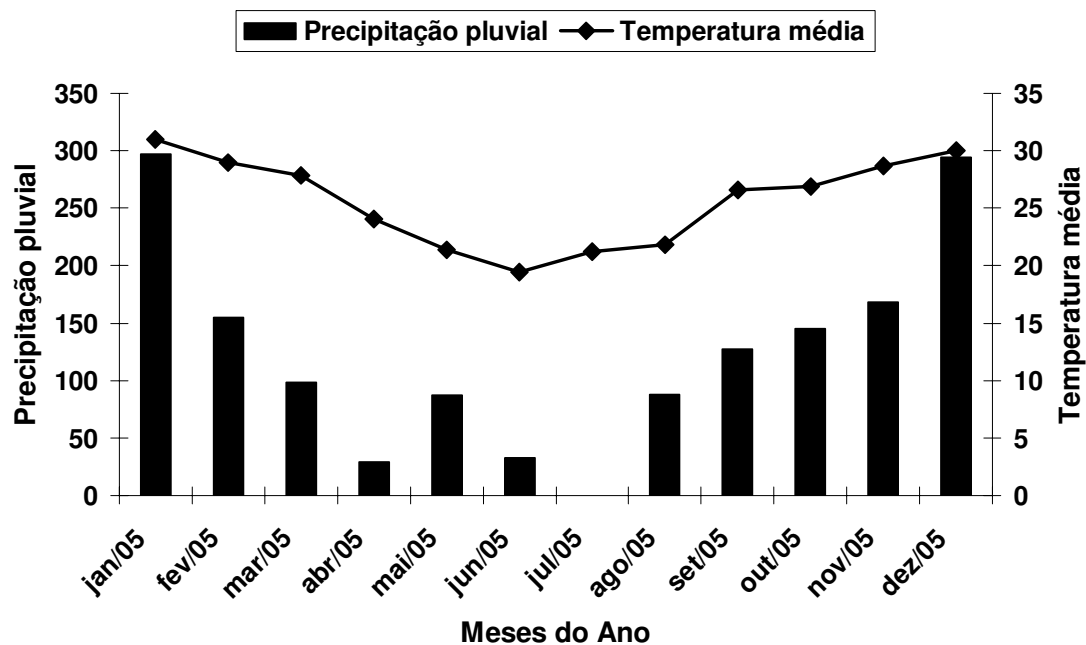
Anexo 6: Resultados dos Níveis ELISA (NE) para anticorpos anti- *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* calculado no colostro/leite de búfalas adultas.

	Níveis ELISA (NE)		
	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>
N0	0,000 - 0,267	0,000 - 0,210	0,000 - 0,230
N1	0,268 - 0,360	0,211 - 0,284	0,231 - 0,311
N2	0,361 - 0,486	0,285 - 0,383	0,312 - 0,419
N3	0,487 - 0,656	0,384 - 0,517	0,420 - 0,566
N4	0,657 - 0,886	0,518 - 0,698	0,567 - 0,764
N5	0,887 - 1,196	0,699 - 0,942	0,765 - 1,031
N6	1,197 - 1,614	0,943 - 1,272	1,032 - 1,392
N7	1,615 - 2,179	1,273 - 1,717	1,393 - 1,879
N8	2,180 - 2,942	1,718 - 2,318	1,880 - 2,537
N9	≥ 2,943	≥ 2,319	≥ 2,538
Ponto de Corte	0,596	0,505	0,435

Análise dos Dados Climáticos



Anexo 7. Gráfico bioclimático com as precipitações pluviais e temperaturas médias de março de 1999 a fevereiro de 2000. Selvíria, MS, 1999/2000.



Anexo 8. Gráfico bioclimático com as precipitações pluviais e temperaturas médias de janeiro a dezembro de 2005. Selvíria, MS., 2005.