



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Doenças dos vitelos de leite - fatores de risco**

**Jaime Reis Simões Seidi**

Orientador: Professora Doutora Elisa Bettencourt

Orientador: Doutor Luís Pinho

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Dissertação de Natureza Científica

Évora, 2016



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Doenças dos vitelos de leite - fatores de risco**

**Jaime Reis Simões Seidi**

Orientador: Professora Doutora Elisa Bettencourt

Orientador: Doutor Luís Pinho

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Dissertação de Natureza Científica

Évora, 2016

# Agradecimentos

Ao Dr. Luís Pinho, orientador científico do estágio curricular, por todo o companheirismo e boa vontade, pelos conhecimentos teóricos e práticos transmitidos, pelas sugestões concedidas, por todo o apoio, interesse e disponibilidade prestada.

À Professora Doutora Elisa Bettencourt, minha orientadora na Universidade de Évora, por ser uma referência pela experiência que possui, pelos conhecimentos e ideias transmitidas, por toda a ajuda e colaboração quer na preparação dos estágios quer na elaboração desta dissertação.

Ao Dr. Carlos Cabral, não só pelos bons momentos, espírito de companheirismo, papel ativo na realização dos estudos científicos presentes nesta dissertação, como também pelos conhecimentos teóricos e práticos transmitidos ao longo do estágio.

Aos Serviços Veterinários Associados, pela possibilidade de realização do estágio curricular, acompanhando toda a equipa durante quase cinco meses, pela transmissão de conhecimentos por parte de excelentes profissionais, pessoas humildes e de bom coração.

Ao Dr. Manuel Paulo Silva, pela possibilidade de realização de parte do estágio curricular, pela forma simples e eficaz de trabalhar, pelos conhecimentos transmitidos, pelo companheirismo e boa vontade demonstrada.

Ao Dr. Richard Touret, pela possibilidade de acompanhar alguns serviços na área de podologia, pelas conversas e sugestões profissionais transmitidas.

Aos meus pais, pela possibilidade de realizar um sonho de menino, por todo o apoio e carinho que me deram sempre ao longo destes vinte e seis anos.

À tia Nica, pela força que demonstraste ao longo da tua vida, que de certa forma me inspirou e fez olhar para a vida de forma diferente. Onde quer que estejas, olha por nós.

À minha irmã Mónica, por toda a ajuda, motivação e conselhos quer na realização deste trabalho quer ao longo da nossa vida.

À tia e madrinha Belinha, por tudo o que me deu e pela nossa cumplicidade.

Ao Tio Luís, aos tios-avós Raúl e Manuela e aos avós Rui e Henriqueta, que olham por mim e pela restante família onde quer que estejam, pela experiência de vida e valores transmitidos.

Aos colegas de turma, pelos momentos de diversão, companheirismo, estudo e pela grande amizade que nos une.

À restante família e amigos, pelo carinho, amizade, bons e maus momentos, que me tornaram na pessoa que hoje sou.

## Resumo

As doenças dos vitelos de leite e mortalidade neonatal têm uma importância não negligenciável entre as diversas causas de perdas económicas na produção de bovinos de leite, sendo que as taxas de sobrevivência neonatal são consideradas indicadores de bem-estar animal.

Nesta dissertação irá abordar-se a problemática e o controlo/prevenção das diarreias neonatais, com incorporação de dois estudos. No primeiro estudo, o objetivo foi avaliar a influência de diversos fatores no estado imunitário de 111 vitelos entre as 24 horas e os 7 dias de vida, através da medição das proteínas séricas como indicador da transmissão de imunidade passiva (TIP). Concluiu-se que o momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro fornecida foi o fator que influenciou o nível de proteínas séricas e, conseqüentemente, a TIP ( $p < 0,001$ ). No segundo estudo, pretendeu-se, primeiramente, determinar a prevalência de isolamentos dos principais agentes infecciosos presentes em vitelos com diarreia neonatal e numa segunda fase estimar a associação entre a prevalência desta doença e o modo e momento de administração de colostro. Concluiu-se então que o agente etiológico mais frequentemente isolado neste estudo foi o Rotavírus, sendo este vírus detetado em 17 amostras ( $p = 60,7\%$ ) e, que o “momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro fornecida” e a “forma de administração de colostro” influenciaram a concentração de proteínas séricas, na primeira semana de vida, e conseqüente TIP ( $p < 0,001$  e  $p \leq 0,01$ , respetivamente).

Os resultados obtidos realçam a necessidade de transmitir conhecimento e especializar, gradualmente, a mão-de-obra com o intuito de implementar práticas de manejo capazes de promover a saúde neonatal na recria, de forma a contribuir para uma redução de perdas económicas e rentabilização máxima nas explorações leiteiras.

**Palavras-chave:** doenças dos vitelos de leite, transmissão de imunidade passiva, diarreias neonatais, colostro.

# Dairy calves diseases – risk factors

## Abstract

Dairy calf's diseases and neonatal mortality have a considerable importance among the various causes of economic losses in dairy cattle production and neonatal survival rates are considered animal welfare indicators.

In this thesis, neonatal calf diarrhea will be addressed regarding its impact in herd health and the control/prevention the disease, with the inclusion of two studies. In the first study the objective was to evaluate the influence of several factors on the immune status of 111 calves aged between 24 hours and seven days, by measuring the serum protein as indicator of passive immunity transmission (PIT). It was concluded that the timing of administration in conjunction with the amount of colostrum provided was the factor that influenced the level of serum proteins, and therefore the PIT ( $p < 0.001$ ). In the second study, the first goal was to determine the prevalence of the main infectious agents present in neonatal diarrhea in cattle and in a second stage to estimate the association between this disease and inadequate administration of colostrum. So it was concluded that the most prevalent agent in this study was Rotavirus (ap=60,7%) and that the amount and timing of administration of colostrum and the form of administration of colostrum influenced the concentration of serum proteins in the first week of life, and consequent PIT ( $p < 0.001$  and  $p \leq 0,01$ , respectively).

The results highlight the need to impart knowledge and gradually to specialize manual labor on dairy farms, in order to implement management practices that promote neonatal health in the growing heifers, thus contributing to a reduction of economic losses and for maximum profitability in dairy farms.

Keywords: dairy calves diseases, transmission of passive immunity, neonatal diarrhea, colostrum.

## Índice Geral

Agradecimentos .....	I
Resumo .....	III
Abstract .....	IV
Índice Geral.....	V
Índice de Figuras .....	IX
Lista de Abreviaturas.....	XII

I – INTRODUÇÃO .....	1
----------------------	---

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: DOENÇAS DOS VITELOS.....	3
--	---

1. Diarreia Neonatal .....	3
----------------------------	---

1.1. Etiologia.....	3
---------------------	---

1.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	4
--------------------------------------	---

1.1.1.1. Epidemiologia .....	5
------------------------------	---

1.1.1.2. Fisiopatologia .....	5
-------------------------------	---

1.1.1.3. Sinais clínicos.....	8
-------------------------------	---

1.1.1.4. Diagnóstico.....	9
---------------------------	---

1.1.2. <i>Cryptosporidium spp</i> .....	10
---	----

1.1.2.1. Epidemiologia .....	11
------------------------------	----

1.1.2.2. Ciclo evolutivo.....	13
-------------------------------	----

1.1.2.3. Fisiopatologia .....	14
-------------------------------	----

1.1.2.4. Sinais clínicos.....	16
-------------------------------	----

1.1.2.5. Diagnóstico.....	16
1.1.3. Rotavírus.....	17
1.1.3.1. Epidemiologia .....	19
1.1.3.2. Replicação .....	20
1.1.3.3. Fisiopatologia .....	21
1.1.3.4. Sinais clínicos.....	22
1.1.3.5. Diagnóstico.....	23
1.1.4. Coronavírus .....	24
1.1.4.1. Epidemiologia .....	25
1.1.4.2. Replicação .....	26
1.1.4.3. Fisiopatologia .....	27
1.1.4.4. Sinais clínicos.....	28
1.1.4.5. Diagnóstico.....	29
1.2. Controlo/ Prevenção .....	30
<b>III – TRABALHO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>34</b>
<b>1. Avaliação da transferência da imunidade passiva em vitelos de leite – estudo de campo .....</b>	<b>34</b>
1.1. Resumo.....	34
1.2. Introdução .....	34
1.3. Objetivos .....	35
1.4. Materiais e métodos .....	35

1.4.1. Estudo de campo .....	35
1.4.2. Questionário .....	36
1.4.3. Colheita e processamento das amostras.....	36
1.4.4. Definição das variáveis .....	38
1.4.5. Análise estatística.....	38
1.5. Resultados .....	39
1.6. Discussão.....	44
1.7. Conclusão.....	46
<b>2. Determinação da prevalência dos principais agentes causadores de diarreias neonatais e fatores de risco associados à administração de colostro .....</b>	<b>46</b>
2.1. Resumo.....	46
2.2. Introdução.....	47
2.3. Objetivos .....	48
2.4. Materiais e métodos .....	48
2.4.1 Estudo de campo.....	48
2.4.2. Questionário .....	49
2.4.3. Colheita e processamento das amostras.....	49
2.4.4. Diagnóstico laboratorial.....	50
2.4.5. Definição das variáveis .....	52
2.4.6. Ensaio estatístico.....	53
2.5. Resultados .....	53
2.5.1. Frequência dos agentes etiológicos.....	53

2.5.2. Coloostro.....	56
2.6. Discussão.....	60
2.7. Conclusão.....	63
3. Conclusão geral .....	63
IV – Bibliografia .....	65
V. Anexos.....	74
Anexo I - Casuística e atividades do estágio curricular realizado nos SVA.....	75
Anexo II - Questionário epidemiológico utilizado em ambos os estudos.....	78
Anexo III - Poster Científico premiado nas XV Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria, 2013 .....	79
Anexo IV - Certificado do prémio destinado ao Poster Científico apresentado nas XV Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria, 2013 .....	80

# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Fatores de virulência da <i>E. coli</i> enterotoxigénica (Adaptado de Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, 2013).....	6
<b>Figura 2</b> - Ciclo de vida do <i>Cryptosporidium</i> spp (Adaptado de Fayer & Xiao, 2007)	10
<b>Figura 3</b> - Estrutura do rotavírus (Adaptado de Korsman <i>et al.</i> , 2014).....	18
<b>Figura 4</b> - Estrutura do coronavírus (Adaptado de Korsman <i>et al.</i> , 2014).....	25
<b>Figura 5</b> - Esquema ilustrativo do registo efetuado nos inquéritos realizados aos responsáveis das explorações .....	36

# Índice de Imagens

<b>Imagem 1</b> - Vitelo com diarreia.....	8
<b>Imagem 2</b> - Vitelo com sintomatologia clínica de colibacilose.....	9
<b>Imagem 3</b> - Eletromicrografia de secções intestinais infetadas experimentalmente com <i>C. parvum</i> : estágios de desenvolvimento do parasita (Adaptado de Tzipori & Ward, 2002).....	14
<b>Imagem 4</b> - Colheita de sangue da veia jugular, em vitelo.....	37
<b>Imagem 5</b> - Processamento das amostras de sangue colhidas .....	37
<b>Imagem 6</b> - Determinação das proteínas totais séricas, recorrendo ao refractómetro ...	38
<b>Imagem 7</b> - Teste TETRASTRIPS BIO K 156 .....	49
<b>Imagem 8</b> – Acondicionamento correto, consoante as indicações do fabricante para processamento das amostras (BioX Diagnostics, 2015).....	50
<b>Imagem 9</b> - Colheita de amostra de fezes, consoante as indicações do fabricante para colheita (BioX Diagnostics, 2015) .....	50
<b>Imagem 10</b> – Metodologia de introdução das tiras para diagnóstico .....	51
<b>Imagem 11</b> - Chave fornecida pelo fabricante.....	51

# Índice de Gráficos

<b>Gráfico 1</b> - Evolução da eficiência aparente de absorção de IgG (AEA) com o decorrer do tempo após o nascimento do vitelo (adaptado de Quigley <i>et al</i> , 2007).....	31
<b>Gráfico 2</b> - Distribuição das amostras por sexo (FR, % n=111).....	39
<b>Gráfico 3</b> - Distribuição das amostras por paridade das mães (FR, % n=111).....	40
<b>Gráfico 4</b> - Distribuição das amostras por níveis de PT .....	40
<b>Gráfico 5</b> - Distribuição das explorações em função da quantidade e momento de administração do colostro (FR,% n=34).....	41
<b>Gráfico 6</b> - Explorações que efetuam avaliação da qualidade do colostro (FR, % n=34) .....	41
<b>Gráfico 7</b> - Distribuição das explorações em função da existência ou não de banco de colostro (FR, % n=34) .....	42
<b>Gráfico 8</b> – Frequência dos quatro agentes etiológicos pesquisados no teste (FR,% n=35).....	54
<b>Gráfico 9</b> - Frequências relativas a infecção simples e infecção mista.....	55
<b>Gráfico 10</b> - Frequência de associação dos agentes nas infecções mistas.....	55
<b>Gráfico 11</b> - Distribuição das explorações por momento da realização da ordenha do colostro (FR, % n=15) .....	56
<b>Gráfico 12</b> - Distribuição das explorações pela forma de administração do colostro (Fr, % n= 15) .....	57
<b>Gráfico 13</b> - Distribuição das explorações pela quantidade e o momento de administração de colostro (FR, % n=15).....	57
<b>Gráfico 14</b> - Distribuição das explorações pela existência ou ausência de banco de colostro (Fr,% n= 15) .....	58

<b>Gráfico 15</b> - Distribuição das explorações pela forma de armazenamento do colostro (FR, % n=15).....	58
--	----

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Período normal de infeção dos vitelos dos principais agentes (adaptado de Radostits <i>et al.</i> , 2007).....	4
<b>Tabela 2</b> - Espécies válidas de <i>Cryptosporidium</i> e respectivos hospedeiros principais, (Adaptado de Fayer <i>et al.</i> , 2000).....	11
<b>Tabela 3</b> – Quadro-resumo da distribuição das amostras pelas variáveis que se pretendiam avaliar na eficácia da transferência de imunidade passiva (TIP).....	42
<b>Tabela 4</b> - Influência dos fatores de risco com o nível de PT.....	43
<b>Tabela 5</b> - <i>Odds ratio</i> de transmissão de imunidade passiva adequada, consoante a quantidade e momento de administração de colostro.....	43
<b>Tabela 6</b> - Especificações do teste (BioX Diagnostics, 2015).....	50
<b>Tabela 7</b> - Prevalência aparente e Prevalência real do teste feito (FR,% n=22).....	54
<b>Tabela 8</b> - Quadro-resumo da distribuição das amostras pelas variáveis que se pretendiam avaliar na eficácia da transferência de imunidade passiva (TIP).....	59
<b>Tabela 9</b> - Influência dos fatores de risco com o nível de PT.....	60

# Lista de Abreviaturas

AMP cíclico - monofosfato de adenosina cíclico

CFA - Fatores de colonização

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigénica

FR – frequência relativa

g – unidade de aceleração não-SI (9,806 65 m/s<sup>2</sup>)

g/dL - Grama por decilitro

g/L - Grama por litro

GMP cíclico - monofosfato de guanosina cíclico

Ig - Imunoglobulinas

IgA - Imunoglobulina A

IgG1 - Imunoglobulina G1

IgG2 - Imunoglobulina G2

IgM - Imunoglobulina M

mL - mililitros

kDa – kilodaltons

L - litros

LPS - Lipopolissacarídeos

p – probabilidade

pa - prevalência aparente

PIT – passive immunity transmission

PT - Proteínas totais

pr - prevalência real

TIP – transmissão de imunidade passiva

# I – INTRODUÇÃO

A suscetibilidade a infecções, por parte de vitelos recém-nascidos, deve-se ao facto do seu sistema imunitário ser imaturo e não totalmente funcional, embora se afirme que nesta fase já se encontra completamente desenvolvido (Cortese, 2009). Outro fator que os torna também mais vulneráveis é o facto de nascerem agamaglobulinémicos, devido à estrutura sinepiteliocorial e cotiledonar da placenta das suas progenitoras (com base nas suas características anatómicas e histológicas, respetivamente) sendo fundamental a administração do colostro nas primeiras horas de vida (Selim *et al.*, 1995; Igwebuike, 2006; Radostits *et al.*, 2007).

A definição de período perinatal varia consoante o estudo, mas geralmente refere-se ao intervalo de tempo até às 48 horas pós-parto e ao qual se antecedeu um período de gestação de pelo menos 260 dias (Mee, 2004). É o mais crítico na vida de todos os animais e é geralmente neste período que ocorrem grande parte dos prejuízos ou perdas, causadas por dificuldades no parto, acidose metabólica e respiratória, hipoglobulinémia, infecções congénitas e onfaloflebitis (Mee, 2004).

O termo neonato é comumente utilizado para descrever vitelos até aos 28 dias de idade, sendo que por sua vez o período neonatal estende-se a partir do terceiro dia pós-parto até aproximadamente ao mês de idade (Raboisson *et al.*, 2012).

Atualmente, a morbidade e mortalidade de vitelos são pontos crescentes de preocupação a nível do bem-estar animal (Ortiz-Pelaez *et al.*, 2008), visto que o seu impacto negativo estende-se não só a perdas em torno do parto, como também na produtividade, saúde, reprodução e economia futura das explorações leiteiras (Mee, 2008).

As doenças mais importantes nos vitelos leiteiros são as diarreias e as infecções respiratórias, sendo que estas são as principais causas de morte (Svensson *et al.*, 2006). Outras doenças também podem ocorrer sendo elas: septicémia, artrite, onfaloflebitis, hérnias umbilicais, dermatofitoses, parasitismo (Virtala *et al.*, 1996; Blowey & Weaver, 2003; Svensson *et al.*, 2003; McGuirk, 2008).

Os agentes patogénicos causadores de diarreia mais comuns são: *Escherichia coli* F5, Rotavírus, Coronavírus, *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp (De la Fuente *et al.*, 1999, Foster & Smith, 2009). No entanto, existem outros agentes capazes de provocar doença, apresentando menor impacto, sendo eles: Vírus da Diarreia Viral Bovina

(BVDV), *Giardia* sp., Coccídeas e *Clostridium* spp. (Van Metre *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2013).

Por sua vez, a doença respiratória em vitelos, geralmente é iniciada por ação vírica, sendo o Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV), o Coronavírus Bovino (BCV), o Parainfluenza Vírus tipo três (PIV-3), o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), o Adenovirus Bovino (BAV) e o Herpesvírus Bovino tipo I, os agentes virais mais importantes (Autio *et al.*, 2007).

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar o estado imunitário de vitelos analisados e verificar se ocorreu ou não transmissão de imunidade passiva.
2. Avaliar o efeito do sexo dos vitelos, paridade das mães e momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro fornecida na eficácia da transmissão de imunidade passiva.
3. Determinar a frequência de identificação dos principais agentes infecciosos responsáveis por diarreia neonatal em 15 explorações de bovinos de leite situadas na região Litoral norte de Portugal.
4. Avaliar a influência da adequada transmissão de imunidade passiva na ocorrência de diarreias.
5. Avaliar o efeito do momento da realização da ordenha do colostro, forma de administração do colostro, a quantidade e o momento de administração de colostro, existência ou ausência de banco de colostro e a forma de armazenamento do colostro na eficácia da transmissão de imunidade passiva.

# II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: DOENÇAS DOS VITELLOS

## 1. Diarreia Neonatal

A diarreia é o resultado de um mecanismo responsável pela combinação do aumento do número de defecações, com o aumento de teor de água presente nas fezes. Pode ocorrer não só devido a lesão das células da mucosa intestinal, por ação de toxinas ou agentes infecciosos, como também devido ao aumento da motilidade intestinal ou ao efeito osmótico de uma sobrecarga nutricional (Bazeley, 2003).

Esta doença, que pode ser evitada com boas práticas de manejo, é uma das principais causas de morbidade e mortalidade de vitelos nas primeiras semanas de vida, provocando elevados prejuízos económicos devidos a custos de tratamento e atrasos no crescimento. A etiologia desta doença é multifatorial e resulta essencialmente da interação entre o vitelo, o ambiente, a nutrição e os agentes patogénicos envolvidos (Scott *et al.*, 2004).

### 1.1. Etiologia

Um amplo grupo de agentes pode estar envolvido neste complexo patológico, sendo que alguns produzem diarreia, enquanto outros provocam envolvimento sistémico. Dentro dos agentes etiológicos que poderão causar esta afeção, agrupam-se os vírus (Rotavírus, Coronavírus), as bactérias (*E. coli*, *Clostridium* spp, *Salmonella* spp) e os protozoários (*Cryptosporidium* spp., *Giardia* sp. e Coccídeas) (Blowey & Weaver, 2003; Van Metre *et al.*, 2008; Constable, 2009; Singh *et al.*, 2009).

A transmissão de agentes patogénicos entre a vaca e o vitelo poderá ocorrer através do colostro ou leite contaminado, camas contaminadas, pela presença de outros animais no mesmo espaço, fómites ou até pelos tratadores de vitelos (McGuirk, 2008).

Atualmente, a *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), o Rotavírus, o Coronavírus e o *Cryptosporidium parvum*, são descritos como os principais agentes etiológicos responsáveis pelo aparecimento desta doença neonatal. A idade de ocorrência de infeção por parte destes agentes patogénicos em vitelos está descrita na tabela 1.

Agente etiológico	Idade (dias)
ETEC	<3
Coronavírus	5-21
Rotavírus	5-15
<i>C. parvum</i>	5-35

**Tabela 1 - Período normal de infecção dos vitelos dos principais agentes (adaptado de Radostits *et al.*, 2007)**

### 1.1.1. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli*, que pertence à família *Enterobacteriaceae*, é classificada como uma bactéria Gram-negativa, em forma de bacilo móvel e não esporulado. Trata-se de uma bactéria anaeróbia facultativa, sendo comensal da microbiota do trato intestinal de animais e seres humanos (Mainil, 2013).

No entanto, algumas estirpes são agentes patogênicos importantes e causadores de um largo espectro de doenças, que variam de autolimitante a doenças intestinais e extraintestinais com risco de vida (Kaper *et al.*, 2004). As infecções causadas por este tipo de estirpes, além de poderem limitar-se simplesmente a superfícies de mucosas ou localmente, provocando infecção do trato urinário, meningite e também doença entérica/diarreia e mastite (Chen & Frankel, 2005; Royster & Wagner, 2015), também podem disseminar-se sistemicamente.

As principais estirpes de *E. coli*, que causam diarreia em humanos, são: *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteropatogénica (EPEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de Adesão Difusa (DEAC) e *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), na qual se inserem *E. coli* Necrotoxigénica (NTEC) e *E. coli* Verotoxigénica (VTEC) (Sahl, 2013). Em vitelos já foram registados casos de diarreia provocada por ETEC, EPEC, NTEC e VTEC (Nagy & Fekete, 2005).

Sendo a ETEC a estirpe que geralmente causa mais transtornos intestinais em animais de espécies pecuárias recém-nascidos (Chen & Frankel, 2005; Nagy & Fekete, 2005), é necessário um entendimento claro sobre a fisiopatologia e fatores de virulência associados a este tipo de *E. coli*, para se poder estabelecer não só um protocolo terapêutico adequado, como também medidas específicas de prevenção para esta afeção.

### **1.1.1.1. Epidemiologia**

Desde finais do século XIX que o papel da *E.coli*, como agente patogénico em vitelos, tornou-se relevante para a comunidade científica mundial, sendo reportado em diversos estudos (Jensen, 1903; Titze e Weichel, 1908; Christiansen, 1917; Carpenter e Woods, 1924; Smith e Orcutt, 1925; citados por Kolenda *et al.*, 2015). Estes focaram-se em vitelos recém-nascidos (menos de 4 dias de idade) e dividiam a doença em enterite com ou sem septicémia (Kolenda *et al.*, 2015).

A colibacilose ocorre com maior frequência em animais recém-nascidos de espécies pecuárias, causando perdas económicas consideráveis. A sua ocorrência depende de diversos fatores, sendo que a exposição do neonato a agentes infecciosos e a sua habilidade de modular a infeção são cruciais para que a doença não progrida. Portanto, o manejo do neonato tem uma influência significativa sobre estes dois fatores, uma vez que o reconhecimento e correção desses riscos envolventes são a chave para a prevenção deste tipo de doença, tanto a nível individual como a nível de grupo (Radostits *et al.*, 2007).

Em bovinos de leite, quando os animais recém-nascidos estão expostos a condições intensivas e de manejo débil, a morbidade pode atingir os 75%, sendo que o valor normal situa-se pelos 30%. Já quanto à mortalidade, dependendo dos níveis de manifestações clínicas, as taxas variam entre 10-50% (Radostits *et al.*, 2007).

A ETEC possui duas características determinantes que a distinguem das outras estirpes não-patogénicas, sendo estas: a capacidade de aderir à superfície da mucosa dos enterócitos e a capacidade de produzir enterotoxinas (Scott *et al.*, 2004).

Este tipo de bactéria geralmente causa diarreia a vitelos entre o primeiro e o quarto dia de vida, sendo que o seu período de incubação situa-se entre as 12 e as 18 horas, em vitelos infetados experimentalmente (Scott *et al.*, 2004). A infeção ocorre usualmente pela exposição oral a coliformes fecais logo após o parto (Smith, 1965 citado por Foster & Smith, 2009). Contudo, a infeção poderá também ocorrer por aerossol ou mesmo até por via umbilical (Radostits *et al.*, 2007).

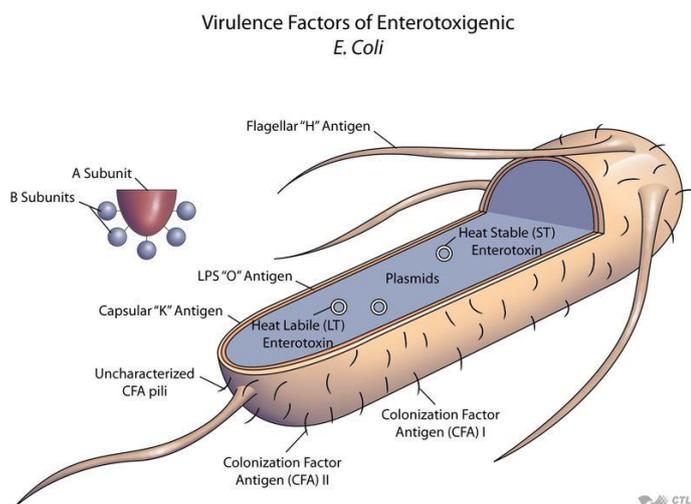
### **1.1.1.2. Fisiopatologia**

Certos fatores tornam-se determinantes na fisiopatologia das diarreias neonatais provocadas por ETEC, uma vez que são responsáveis por conferir condições para que a bactéria se multiplique e seja capaz de causar doença, sendo eles: exposição e ingestão

do organismo; níveis de pH do abomaso dos neonatos situados entre 6 e 7 nos primeiros dias de vida; expressão do antígeno K99 que contribui para adesão aos enterócitos e colonização do íleo. Por sua vez, outros fatores são responsáveis pela severidade da doença, tais como: a produção da enterotoxina STa, responsável por induzir a secreção de líquidos e conseqüentemente um aumento do pH luminal e um movimento retrógrado da bactéria até ao duodeno, aumentando gravemente a secreção de água e eletrólitos, provocando assim desidratação e diarreia (Foster & Smith, 2009).

Os lipopolisacarídeos (LPS) fazem parte da parede celular destas bactérias, sendo estas classificadas sorologicamente consoante os componentes dos LPS presentes, mais propriamente os antígenos somáticos (antígeno O), antígeno flagelar (antígeno H) e antígeno capsular (antígeno K), sendo este último o antígeno mais importante (Fecteau *et al.*, 2001).

Os fatores de virulência responsáveis pela patogénese desta bactéria são as adesinas (fimbrias) e as enterotoxinas (Figura 1) (Nagy & Fekete, 2005).



**Figura 1 - Fatores de virulência da *E. coli* enterotoxigénica (Adaptado de Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, 2013)**

## Adesinas

Pelo menos 3 diferentes classes de adesinas de *E. coli* podem ser definidas: adesinas fimbriais (Fímbrias, Pili), adesinas não-fimbriais ou afimbrias (Afa) e outras proteínas membranares específicas (OMP) (Kaper *et al.*, 2004). As fímbrias são apêndices filamentosos, de natureza proteica, que têm origem na camada mais externa da parede celular das bactérias e que são responsáveis pela aglutinação dos eritrócitos de diferentes espécies (Duguid *et al.*, 1955 citado por Mainil, 2013). Possuem diversos

pesos moleculares, variando entre 15 a 20 kDa, sendo compostas por subunidades estruturais proteicas, denominadas “maior” e “menor”, que são reguladas por genes estruturais e acessórios, respetivamente (Nagy & Fekete, 2005).

Primeiramente, estas estruturas receberam diferentes nomes mas atualmente são denominadas pela letra F seguida de números. Assim sendo, dentro das adesinas fimbriais, podem distinguir-se as F1, F2 e F3, as quais são mais frequentemente encontradas em humanos. No que concerne aos animais, F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F17, F41 e F18 são encontradas em leitões e vitelos, sendo que a F5 é que mais se encontra em vitelos (Nagy & Fekete, 2005). É no intestino delgado que se inicia a colonização por parte desta bactéria, uma vez que este antigénio (F5) é somente expresso em ambientes com níveis de pH inferiores a 6,5 (Smith, 1962; Mylrea, 1968; Francis *et al.*, 1989; Foster & Smith, 2009).

### **Enterotoxinas**

Estas estruturas, que podem ser produzidas por diferentes bactérias, são proteínas extracelulares ou péptidos (exotoxinas) que atuam a nível dos enterócitos. Dentro do grupo das enterotoxinas termo-lábeis (LT) existem dois subtipos, que são antigenicamente e biologicamente diferentes mas estruturalmente semelhantes, sendo elas a LTI e LTII. Estas dividem-se em duas subunidades, A e B. No que concerne às enterotoxinas termo-estáveis (ST) são descritos dois subtipos, STa e STb. Ambos os tipos de enterotoxina têm a particularidade de não causarem lesões patológicas ou danos à mucosa, causando somente alterações funcionais como hipersecreção de H<sub>2</sub>O, Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> e diminuição de absorção de fluidos (Nagy, Tóth & Fekete, 2005).

A subunidade B da enterotoxina termo-lábil facilita a entrada da subunidade A nos enterócitos. Aí, a subunidade A ativa a enzima adenilato ciclase, localizada na membrana basolateral que, por sua vez, aumenta a produção intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico). O aumento da produção de AMP cíclico diminui a absorção do ião sódio (Na<sup>+</sup>) por parte das células das vilosidades, reduzindo assim a absorção de água no lúmen intestinal. Ao mesmo tempo a secreção de iões cloreto (Cl<sup>-</sup>) e, portanto, de água (H<sub>2</sub>O), é estimulada, pelas células das criptas. A enterotoxina termo-estável ativa a guanilato ciclase, estimulando a síntese intracelular de monofosfato de guanosina cíclico (GMP cíclico), o que provavelmente estimula a secreção e reduz a absorção, embora não sejam conhecidos os mecanismos precisos (Scott *et al.*, 2004).

### 1.1.1.3. Sinais clínicos

Os sinais clínicos da doença dependem de certos fatores como a virulência da estirpe, a idade do animal e o seu estado imunitário, sendo que um surto causado por ETEC é clinicamente detetado pela intensificação do quadro clínico de vitelos de diferentes faixas etárias (Scott *et al.*, 2004).

Inicialmente, observa-se uma diarreia profusa e pastosa, amarelada ou esbranquiçada (Imagem 1), podendo ser acompanhada por estrias de sangue e odor fétido, que geralmente progride para diarreia aquosa severa. Este tipo de diarreia rapidamente provoca uma intensa desidratação do vitelo, acidose metabólica e choque, em que por vezes a morte ocorre sem que haja evidência de diarreia (Wattiaux, 2001).



**Imagem 1 - Vitelo com diarreia**

Os vitelos afetados normalmente estão fracos, apresentando a cauda, membros posteriores e períneo sujos (Imagem 1). O reflexo de sucção é fraco ou até mesmo inexistente, sendo que os vitelos mostram-se relutantes ao movimento e podem até mesmo encontrar-se em decúbito lateral (Imagem 2). Podem também apresentar o abdómen distendido, devido ao sequestro de líquido no abomaso e intestinos. Quer arritmia cardíaca, quer bradicardia são achados presentes no exame físico e acompanham os sinais sistêmicos. A temperatura retal mantém-se normal nos estágios iniciais, mas diminui conforme o agravamento do quadro clínico. A desidratação normalmente é superior a 8%, verificando-se um aumento quer do hematócrito, quer das proteínas séricas totais (Van Metre *et al.*, 2008).



**Imagem 2 - Vitelo com sintomatologia clínica de colibacilose**

#### **1.1.1.4. Diagnóstico**

O diagnóstico de diarreia causada por ETEC pode ser sugerido pela idade dos vitelos afetados, pelos sinais clínicos existentes, pela evolução da doença e também recorrendo a técnicas de diagnóstico (Van Metre *et al.*, 2008).

O diagnóstico definitivo requer o isolamento de antígenos patogénicos F, mais precisamente adesinas ou fímbrias, que sejam responsáveis por causar doença em vitelos, visto que são mais facilmente detetadas do que as enterotoxinas. Assim sendo, poderá chegar-se a um diagnóstico usando testes *in vitro*, como ELISA ou teste de aglutinação indireta, sendo que também a imunofluorescência poderá detetar fímbrias *in vivo*, nas fezes (Nagy & Fekete, 2005). As enterotoxinas podem ser detetadas através de PCR (Van Metre *et al.*, 2008).

Através de cultura nas fezes também é possível confirmar diagnóstico, sendo necessário recorrer a meios de cultura especiais, uma vez que a ETEC necessita de certas condições para expressar as adesinas. Isto deve-se ao facto das fímbrias K99 e F41 serem fracamente produzidas por bactérias *in vitro*, embora sejam prontamente produzidas por bactérias que crescem no intestino. Uma vez expressas, podem ser detetadas por recurso a anti-soros específicos em testes de aglutinação, hemaglutinação ou ELISA (Scott *et al.*, 2004).

Como diagnóstico laboratorial rápido e permitindo que o mesmo seja realizado no campo, foram desenvolvidos testes imunocromatográficos, que detetam a fímbria F5 (K99) da *E.coli*, nas fezes. Estes testes facilitam a deteção na exploração da presença de ETEC, o que permite uma mais rápida implementação de medidas terapêuticas e profiláticas.



A criptosporidiose é uma causa importante de diarreia em diversas espécies (Tabela 2), sendo que nos vitelos normalmente decorre no primeiro mês de vida. Poderá ocorrer mortalidade em animais gravemente afetados, sendo mais comum uma diarreia secretora auto-limitante responsável por morbidade e aumento de custos veterinários e produtivos. O *Cryptosporidium parvum*, responsável por colonizar o intestino, o *C. muris* e o *C. andersoni*, ambos com tropismo para o abomaso, podem ser isolados das fezes e apenas só a primeira destas três espécies é capaz de provocar doença em vitelos. Em animais adultos pode ocorrer infecção assintomática, sendo a excreção mais acentuada na altura do parto (Radostits *et al.*, 2007; Trotz-Williams *et al.*, 2007; Naylor, 2009).

No entanto, existem características únicas que distinguem este parasita de outras coccidioses, sendo elas: falha na especificidade do hospedeiro e do órgão que poderá afetar, resistência a antibióticos, capacidade de auto-infecção e a localização exacta que poderá ocupar no interior da membrana da célula hospedeira (Tzipori & Ward, 2002).

<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Tropismo</b>
<i>C. andersoni</i>	Bovinos	Abomaso
<i>C. baileyi</i>	Galinhas	Bursa de Fabricius e Cloaca
<i>C. felis</i>	Gato	Intestino delgado
<i>C. meleagridis</i>	Perú	Intestino delgado
<i>C. muris</i>	Rato	Estômago
<i>C. nasorum</i>	Peixes	Cloaca e Intestino delgado
<i>C. parvum</i>	Rato	Intestino delgado
<i>C. saurophilum</i>	Répteis	Estômago e Intestino delgado
<i>C. serpentis</i>	Répteis	Cloaca
<i>C. wrairi</i>	Porco-da-índia	Intestino delgado

**Tabela 2 - Espécies válidas de *Cryptosporidium* e respectivos hospedeiros principais, (Adaptado de Fayer *et al.*, 2000)**

### **1.1.2.1. Epidemiologia**

Estima-se que o *Cryptosporidium* seja detetado em fezes de 70% dos indivíduos testados entre a primeira e a terceira semana de vida. A infecção poderá ser detetada antes dos 5 dias de idade, sendo que o pico de excreção de oocistos encontra-se entre o nono e o décimo quarto dia de vida. Após serem infetados, o organismo dos vitelos desenvolve resistência a reinfeção e a excreção de oocistos é menor e intermitente em

animais adultos, contudo também se pode verificar taxas de excreção elevadas neste grupo etário (Radostits *et al.*, 2007).

Análises genéticas efetuadas a *C. parvum* isolados de humanos e bovinos permitiram concluir que se podem distinguir dois genótipos deste parasita. O genótipo 1 é transmitido somente entre humanos e o genótipo 2 abrange um ramo maior de hospedeiros, incluindo bovinos. Esta distinção é importante para investigação de potenciais casos zoonóticos de criptosporidiose, uma vez que se for isolado um genótipo 2 de uma pessoa sugere que poderá ser ter sido um bovino ou outro animal a possível fonte (Xiao, 1998 e 1999).

Os ruminantes parecem ser especialmente suscetíveis à infeção, sendo que alguns vitelos recém-nascidos retirados juntos das mães à nascença e colocados em ambientes “limpos” começam a excretar oocistos após 3 dias, o que sugere que são suscetíveis mesmo quando expostos a uma dose infetante baixa ou mesmo transmissão *in útero* (Fayer, 2004).

Os oocistos deste parasita, que apresentam forma oval ou elíptica com uma parede formada por três membranas e duas camadas quitinosas são altamente resistentes, mantendo-se viáveis durante bastantes meses, principalmente em ambientes frios e húmidos. Está descrito que são resistentes à maioria dos desinfetantes (exceto amoníaco, formalina, peróxido de hidrogénio) mas são suscetíveis a dissecação e temperaturas acima de 60°C. A excreção de oocistos inicia-se ao mesmo tempo que o aparecimento de diarreia e geralmente persiste alguns dias após o cessar dos sinais clínicos. Os oocistos são infetantes no interior do intestino, sendo que a autoinfeção pode levar a doença crónica (Radostits *et al.*, 2007).

O período pré-patente, que se entende como intervalo de tempo entre a ingestão da forma infetante até a excreção de oocistos que determina o fim do ciclo de vida, tanto pode ser completo em poucos dias (3 a 5 dias) como se pode estender num período maior (2 semanas) (Fayer, 2004).

Foi experimentalmente comprovado que vitelos infetados com  $10^5$  oocistos podem excretar  $10^9$  a  $10^{10}$  oocistos durante um período de 7 a 10 dias (Fayer, 2004). Alguns estudos revelam que 100% das vacarias estão infetadas com *C. parvum* (Xiao & Herd, 1994; O’Handley *et al.*, 1999), tornando-se na maior fonte de contaminação ambiental, uma vez que os vitelos podem excretar  $10^7$  oocistos por grama de fezes. A excreção de oocistos em gado de carne é menos frequente que no gado aleitante (Foster & Smith, 2009).

Em Portugal, estudos efetuados por Fonseca (2000) determinaram uma prevalência global de criptosporidiose para o Alentejo e Ribatejo de 21,1% e 34%, respetivamente. Foi também detetada uma prevalência mais alta desta doença em vitelos mais novos (com idades compreendidas entre oito e 15 dias - 41,7%), comparativamente com vitelos mais velhos (com idades compreendidas entre os 16 e 24 dias - 47,2%) (Fonseca, 2000).

Infeções mistas podem ocorrer, geralmente com *E.coli*, vírus (rotavírus e coronavírus), sendo as diarreias mais severas nestes casos (Radostits *et al.*, 2007, Van Metre *et al.*, 2008).

### **1.1.2.2. Ciclo evolutivo**

O ciclo de vida deste parasita é direto e monoxeno e inicia-se com a ingestão de oocistos esporulados, seguida pelo desenquistamento (resultante da ação do ácido gástrico e também de sais biliares) no trato gastrointestinal do hospedeiro, ocorrendo a libertação de 4 esporozoítos de cada oocisto. Uma vez libertados, os esporozoítos atingem o bordo luminal dos enterócitos, mediante movimentos de contração-extensão e deslizamento (foto 1 da imagem 3). Aí, invaginam-se em forma de “dedo de luva”, sendo englobados pela membrana da célula hospedeira, que encapsula o parasita no interior de um vacúolo parasitóforo iniciando a fase de esquizogonia (foto 2 da imagem 3) (Mora, Bautista & Vásquez, 2002; Tzipori & Ward, 2002).

No decurso da esquizogonia, formam-se 8 ou 4 merozoítos dependendo de se tratar uma esquizogonia de primeira ou segunda geração, respetivamente. Assim, existem 2 tipos de esquizontes: o tipo I é o primeiro a aparecer no ciclo biológico e tem 8 merozoítos (foto 3 da imagem 3) e o tipo II que possui 4 merozoítos (foto 4 da imagem 3). Dos merozoítos do tipo I podem resultar novas esquizogonias de primeira geração ou formação de merontes do tipo II, a partir dos quais se desenvolvem os macrogamontes (foto 6 da imagem 3) e microgamontes. A maioria dos merozoítos do tipo II que entram na célula vai formar microgamontes, que possuem 16 microgametas no seu interior (foto 5 da imagem 3) (Mora, Bautista & Vásquez, 2002).

Da união resultante dos microgamontes e macrogamontes, surge o zigoto (foto 7 da imagem 3), sendo que a fertilização ocorre após a penetração dos microgametas, através do vacúolo parasitóforo e da membrana do microgamonte. A formação da parede do

oocisto acontece antes da esporulação. A esporogonia ocorre no interior do hospedeiro (Mora, Bautista & Vásquez, 2002).

Deste processo, resultam oocistos de parede grossa (foto 8 da imagem 3), que são expelidos nas fezes e contaminam o ambiente e oocistos de parede fina, responsáveis pela auto-infecção dos hospedeiros (Foster & Smith, 2009). Nestes últimos, a parede relativamente frágil rompe-se logo após a sua libertação da célula hospedeira e os esporozoítos penetram as células epiteliais adjacentes, reiniciando-se assim o ciclo endógeno deste parasita (Mora, Bautista & Vásquez, 2002).

A forma infetante (oocisto) é excretada pelas fezes em grande número e sem que seja necessário um período de maturação no exterior do hospedeiro, o que permite que a infecção se espalhe rapidamente dentro de um grupo de animais próximos. Verifica-se portanto um padrão de infecção semelhante ao existente no Rotavírus (Scott *et al.*, 2004).

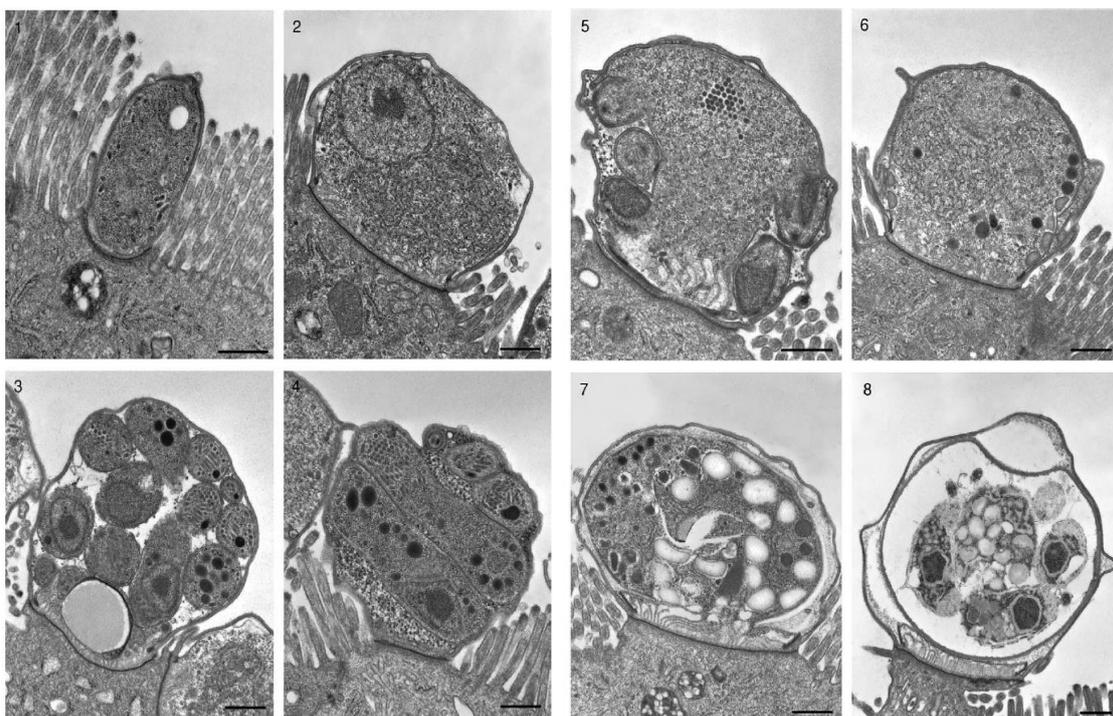


Imagem 3 - Eletromicrografia de secções intestinais infetadas experimentalmente com *C. parvum*: estágios de desenvolvimento endógeno do parasita (Adaptado de Tzipori & Ward, 2002)

### 1.1.2.3. Fisiopatologia

Os estádios intracelulares do parasita decorrem no interior do vacúolo parasitóforo que se forma no seu ciclo de vida, depois de alojados na região das microvilosidades da célula hospedeira. O *Cryptosporidium* já no interior do hospedeiro aparece livre no

lúmen intestinal e invade o epitélio da porção distal do intestino delgado (fora do citoplasma), onde tipicamente se concentra a infecção, mas poderá estender-se em qualquer parte do trato gastrointestinal desde o abomaso ao cólon (Foster & Smith, 2009). Liga-se às microvilosidades dos enterócitos, localizando-se logo abaixo da membrana celular e torna-se responsável pela destruição, atrofia e fusão das microvilosidades intestinais, destruição de enzimas da bordadura em escova e redução da área superficial das vilosidades. Numa fase posterior, ocorrem alterações inflamatórias nas áreas afetadas. A mucosa aparece congestionada, juntamente com os enterócitos, que se tornam escamosos e cubóides. As criptas podem aparecer dilatadas e preenchidas com células esfoliadas e neutrófilos. A lâmina própria aparece infiltrada com células mononucleares inflamatórias, neutrófilos e eosinófilos (Scott *et al.*, 2004).

A infecção por *C. parvum* induz uma atrofia severa das vilosidades em diversas espécies, incluindo nos vitelos, sendo que esse processo é causado pela perda de enterócitos maduros e subsequente retração das vilosidades para garantir a continuidade da barreira epitelial e aumento de enterócitos imaturos. A hiperplasia das criptas ocorre com o intuito de substituir as células epiteliais destruídas, mas no entanto em infecções severas poderá ocorrer quebra da barreira epitelial (Radostits *et al.*, 2007; Foster & Smith, 2009).

Apesar de serem reconhecidas as consequências da infecção, o mecanismo preciso da perda celular permanece desconhecido, não se percebendo se é um efeito da ação do parasita ou se da resposta imunitária do hospedeiro (ou combinação dos dois), na tentativa de minimizar a infecção. No entanto, existem 2 potenciais modelos explicativos para a perda celular epitelial, sendo que o primeiro sugere o efeito citotóxico do parasita no tecido intestinal e o segundo refere que a apoptose é o mecanismo responsável pela perda celular (Foster & Smith, 2009).

A absorção é comprometida não só devido à perda de enterócitos e os seus transportadores associados, como também da diminuição de área superficial total absorvente. Assim sendo, a ação deste parasita provoca uma diarreia por malabsorção nos hospedeiros. A atividade de lactase na mucosa está marcadamente deprimida e a habilidade para digerir e absorver alimento está reduzida (Scott *et al.*, 2004). A absorção de sódio e água pode ainda assim ocorrer nas criptas, quando ligados a glicose ou outros aminoácidos neutros (glutamina), o que se deve ter em conta aquando se pretende realizar rehidratação oral. Contudo, a absorção total de carboidratos, lípidos e aminoácidos permanece reduzida (Foster & Smith, 2009).

#### **1.1.2.4. Sinais clínicos**

Este parasita tem maior impacto em indivíduos jovens, onde a imunidade não se encontra totalmente desenvolvida. Não existem sinais patognomónicos que permitam distinguir a infeção por *Cryptosporidium* de outro tipo de infeções causadas por agentes enteropatogénicos bacterianos e virais (Van Metre *et al.*, 2008).

Após infeção, os sinais clínicos podem durar entre 4 a 17 dias, sendo que o pico dos sintomas ocorre entre o terceiro e o quarto dia. Estes podem variar de leve a graves, sendo eles: dor abdominal, tenesmo, depressão, desidratação e anorexia. Normalmente são acompanhados por uma diarreia profusa e aquosa, de cor amarela/esverdeada que poderá conter sangue (hematoquésia) e muco (Scott *et al.*, 2004). Esta diarreia por malabsorção pode variar de leve a severa com risco de vida para o hospedeiro, dependente da carga infecciosa e presença de outros agentes patogénicos. (Foster & Smith, 2009).

A morbilidade é geralmente alta e a mortalidade é baixa, no entanto alguns surtos poderão ser associados com mortalidade elevada, dependendo do estado imunitário, do maneio existente e das condições ambientais (Scott *et al.*, 2004).

#### **1.1.2.5. Diagnóstico**

A criptosporidiose pode ser diagnosticada por diversas formas, sendo umas mais simples e outras mais complexas. Para determinar a presença de *Cryptosporidium*, podem realizar-se a análise de fezes ou o exame pós-morte da mucosa intestinal. Em ambos os casos, o diagnóstico é feito por observação de oocistos no microscópio ótico.

A deteção de oocistos em amostras de fezes consiste num dos meios de diagnóstico mais usais desta doença, tendo em conta que animais clinicamente afetados excretam oocistos em abundância, tornando fácil o diagnóstico (Tzipori & Ward, 2002). Através do microscópio ótico é possível identificar oocistos deste parasita nas fezes, mas torna-se praticamente impossível determinar a que sub-espécie pertencem. É um método rápido, barato e se o número de oocistos for elevado é fácil chegar ao diagnóstico. Poderá recorrer-se a técnicas de centrifugação, sedimentação e flutuação, com o intuito de aumentar a concentração de oocistos e garantir uma maior sensibilidade dos esfregaços efetuados (Scott *et al.*, 2004; Wyatt *et al.*, 2010).

O uso de colorações diferenciais tem sido útil para identificar oocistos ao microscópio ótico. Inicialmente recorria-se a colorações Giemsa e Gram, mas devido à

pouca diferenciação com os materiais de fundo caíram em desuso, surgindo outros corantes mais eficazes, como por exemplo a conjugação de azul de metileno com bórax ou safranina. A técnica de Ziehl Neelsen modificada e a microscopia de fluorescência também são amplamente utilizadas como forma de diagnóstico (Wyatt *et al.*, 2010).

O diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium* pode também ser efetuado por meio da observação histológica das formas de desenvolvimento intracelular, em material de necrópsia ou biópsias de tecido intestinal. No entanto, raramente se efetuam devido à necessidade de amostras frescas de necrópsia e à baixa mortalidade verificada. Por via histológica, amostras de jejuno, íleo e colon podem ser fixadas em formalina a 10% (Scott *et al.*, 2004; Radostits *et al.*, 2007).

Atualmente, existe também a possibilidade de identificar *C. parvum* em animais com diarreia, recorrendo-se a testes de imunocromatografia de fluxo. Foram desenvolvidos então kits que permitem identificar este agente etiológico de forma rápida e no campo.

Os dados relativos à sensibilidade e especificidade deste tipo de teste serão referidos no diagnóstico laboratorial do segundo estudo do capítulo III – Trabalho experimental.

### **1.1.3. Rotavírus**

A designação Rotavírus provém do latim *rota* (que significa roda) dada a morfologia característica que o seu virião apresenta (Estes & Greenberg, 2013).

Embora, os Rotavírus humanos tenham sido descobertos em 1973, vários vírus animais foram descobertos na década anterior. Concluiu-se anos mais tarde que se tratariam de Rotavírus animais, com base na morfologia característica exibida e pela partilha de antígeno de grupo semelhante ao dos Rotavírus humanos (Estes & Greenberg, 2013). Estes vírus são responsáveis por causar diarreia em vitelos, borregos, leitões, poldros e crianças, sendo que as espécies são morfologicamente indistinguíveis entre si (Radostits *et al.*, 2007).

São membros da família *Reoviridae* e apresentam uma forma icosaédrica e sem envelope. O seu genoma possui 11 segmentos de RNA de cadeia dupla, rodeado por uma cápside de camada tripla composta por uma camada externa, uma camada intermédia, e uma camada de núcleo interna. Esta estrutura confere resistência perante enzimas proteolíticas e à maior parte dos desinfetantes. O genoma viral codifica 6

proteínas estruturais (VP1-4, VP6, VP7) e 6 proteínas não estruturais (NSP1-NSP2) (Figura 3), sendo que a proteína viral mais abundante é a VP6. Esta proteína encontra-se na camada média de proteínas e a VP4 e VP7 na camada externa (Chen *et al.*, 2012).

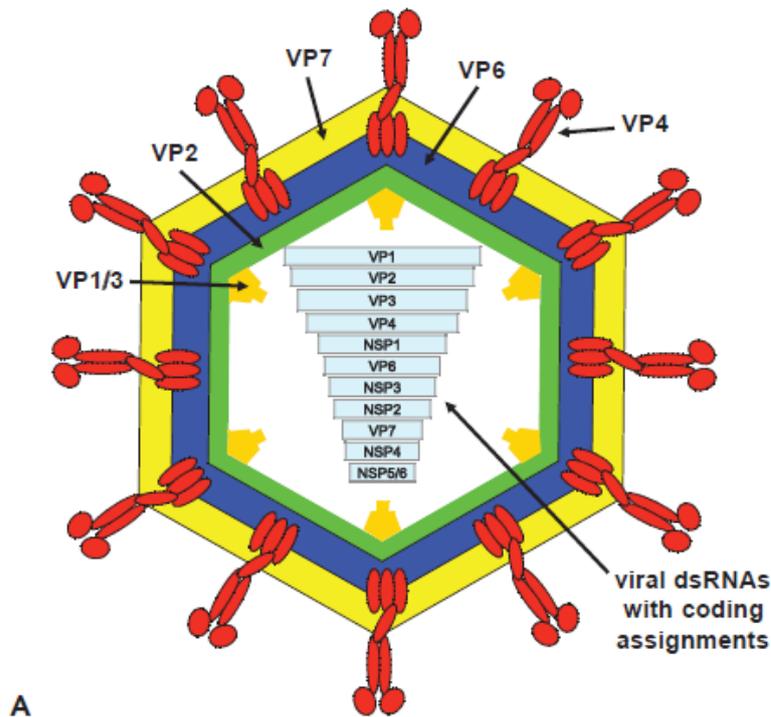


Figura 3 - Estrutura do rotavírus (Adaptado de Korsman *et al.*, 2014)

Os Rotavírus dividem-se em serogrupos, conforme os antígenos que possuem. Existem 7 serogrupos, nos quais a sua divisão é feita de A a G e em que a VP6 é um importante antígeno determinante enquanto responsável por essa mesma divisão (Chen *et al.*, 2012). Por sua vez, os serogrupos são também divididos em dois serotipos, consoante a especificidade da proteína estrutural da camada externa. A proteína VP7 é uma glicoproteína, sendo que os serotipos determinados por esta proteína são denominados por "serotipos G". Assim, a VP4 é uma proteína clivada por protease (tripsina) e os seus serotipos são denominados "serotipos P" (Radostits *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012; Estes & Greenberg, 2013). Estas proteínas têm particular relevância para a epidemiologia da doença e eficácia na produção de vacinas (Velasquez *et al.*, 2014).

Quase todos os Rotavírus bovinos compartilham um antígeno comum e foram inseridos no serogrupo A (Scott *et al.*, 2004). O Rotavírus do grupo A é o mais frequentemente detetado como causa de diarreia quer em animais de produção quer em

humanos, o do grupo B já foi isolado em bovinos adultos com diarreia (Radostits *et al.*, 2007).

Este vírus além de possuir determinadas características referidas anteriormente, evidencia outras, sendo elas: necessidade de cálcio para manter a integridade da cápside externa, existência de polimerase RNA dependente de RNA e outras enzimas capazes de produzir transcritos de RNA, capacidade de rearranjo genético por parte de Rotavírus do mesmo grupo e exibição de via única morfogenética, isto é, os viriões formam-se por gemulação no retículo endoplasmático durante a morfogênese (Estes & Greenberg, 2013).

### **1.1.3.1. Epidemiologia**

O Rotavírus é um agente ubiqüitário em ambientes de animais, sendo que inquéritos serológicos indicam que 50 a 100% de gado bovino, ovino, suíno e equino adulto possui anticorpos para este vírus (Radostits *et al.*, 2007). É um dos principais agentes etiológicos de diarreias neonatais bovinas, constituindo um problema mais significativo em vitelos de carne, devido ao maior risco de contaminação cruzada entre vitelos, sazonalidade dos partos e restrições financeiras que levam a menores consumos nutricionais durante o final da gestação (Scott *et al.*, 2004).

Os vitelos mais velhos e os bovinos adultos podem ser portadores assintomáticos do vírus, excretando intermitentemente o vírus nas fezes, estimando-se que 20% de vitelos saudáveis poderão excretar o vírus. Muitas infecções são subclínicas e não são detetadas especificamente, com implementação de tratamento sintomático, ou seja, a rehidratação e correção dos desequilíbrios eletrolíticos, poderão evoluir para diarreia severa e provocar morte (Scott *et al.*, 2004; Radostits *et al.*, 2007).

A prevalência de infecção com Rotavírus do grupo A é alta, sendo bastante superior à registrada para o grupo B. É comum, para o grupo A, observarem-se prevalências de 30% em vitelos normais e de 40% em animais que apresentam sintomatologia clínica (Radostits *et al.*, 2007).

Os neonatos (<14 dias de vida) têm um maior risco de contrair infecção. A prevalência de infecção em explorações leiteiras portadoras de Rotavírus normalmente é alta, coincidindo com uma morbidade também alta e uma mortalidade variável (Van Metre *et al.*, 2008).

A transmissão dá-se por via feco-oral, sendo o animal adulto a primeira fonte de infeção para o neonato. Devido ao facto deste vírus ser muito estável no ambiente e ser eliminado em grandes quantidades nas fezes (fezes infetadas podem conter  $10^{10}$  partículas virais por grama de fezes), torna-se num agente bastante contagioso (Radostits *et al.*, 2007; Estes & Greenberg, 2013). Podem também ser disseminados por via aérea, uma vez que sobrevivem bem em estado de aerossol e em níveis médios de humidade relativa (Radostits *et al.*, 2007).

O período de incubação pode variar entre as 15 horas e os 5 dias e é seguido de excreção que começa na segunda semana de idade. O pico de incidência de diarreia ocorre entre o décimo e o décimo quarto dia de vida (Scott *et al.*, 2004). Uma característica epidemiológica importante consiste no facto de que a proteção contra a doença depender da presença de anticorpos colostrais específicos no lúmen intestinal. A proteção em vitelos com elevados títulos de anticorpos neutralizantes maternos deve-se à imunidade colostrais e à imunidade local a nível do intestino (Radostits *et al.*, 2007).

### **1.1.3.2. Replicação**

In vivo, este vírus apresenta tropismo para as células das vilosidades intestinais, de enterócitos diferenciados do intestino delgado, o que sugere que estas células apresentam recetores específicos para a adesão e entrada nas mesmas. Após ocorrer replicação no intestino delgado, as partículas infecciosas são libertadas no lúmen intestinal e a sua replicação continua ao longo da área distal do intestino delgado (Estes & Greenberg, 2013).

A entrada do vírus ocorre quase exclusivamente através da membrana apical devido à presença de ácido siálico terminal nessa área, apesar de algumas estirpes recorrerem à membrana basolateral e também à apical simultaneamente (Estes & Greenberg, 2013).

A replicação nos enterócitos altera a função destas células, observando-se alterações drásticas na permeabilidade da membrana plasmáticas das células infetadas e lise celular, que originam libertação de células e de proteínas virais. VP4 tem um papel ativo, visto que interage com actina e lípidos e pode remodelar microfilamentos, sendo isto sugerido como mecanismo de destabilização da membrana da bordadura em escova de células epiteliais polarizadas, permitindo assim a saída do Rotavírus das células. O

vírus é libertado apicalmente a partir dos enterócitos polarizados por uma vesícula sem efeitos citopáticos extensos ou por lise celular (Estes & Greenberg, 2013).

### **1.1.3.3. Fisiopatologia**

Este agente etiológico afeta preferencialmente enterócitos maduros, causando uma atrofia parcial das vilosidades que recuperam por maturação rápida de células indiferenciadas das criptas, facto que contribui para a cura da lesão (Radostits *et al.*, 2007).

A infeção dos enterócitos ocorre através de recetores específicos, com replicação viral no seu interior, mais concretamente nos retículos endoplasmáticos de citoplasma, levando à morte dos enterócitos e substituição subsequente destas células colunares por células imaturas e cubóides provenientes das criptas (Van Metre *et al.*, 2008; Foster & Smith, 2009). Apesar destas novas células serem mais resistentes à infeção, não apresentam capacidade de realizar a sua função digestiva e absorptiva normal devido a deficiência de dissacaridases e de atividade da bomba sódio-potássio (Van Metre *et al.*, 2008).

A patogénese da infeção por Rotavírus é multifatorial, sendo que o despoletar da doença depende de fatores relacionados quer com o hospedeiro, quer com o vírus. Como por exemplo, a idade do indivíduo aquando a inoculação viral pode aligeirar ou intensificar os sintomas. A diarreia induzida por rotavírus tem sido atribuída a vários mecanismos, sendo eles: má-absorção devido a destruição de enterócitos ou perturbação das funções de absorção dos enterócitos das vilosidades, isquémia das vilosidades, uma proteína não estrutural do vírus que age como enterotoxina (NSP4) (Estes & Greenberg, 2013).

As alterações morfológicas e funcionais no intestino levam a má-digestão e malabsorção, que conseqüentemente contribuem para diarreia, desidratação, acidose e perda de eletrólitos. As lesões aparecem nas primeiras 24 horas pós-infeção, com exfoliação das células infetadas. A regeneração celular geralmente ocorre em 4-6 dias após o aparecimento da diarreia e as vilosidades retornam ao normal 7 dias após o recuperar da diarreia. Contudo, os vitelos em convalescença podem precisar de 10-21 dias para recuperarem totalmente a taxa de crescimento normal (Radostits *et al.*, 2007).

Devido à perda de área superficial no interior do intestino ocorre malabsorção de glicose e carboidratos, há também um aumento de pressão osmótica e

consequentemente afluxo de líquidos para o interior do lúmen. Além disso, a secreção de fluidos a partir das criptas aumenta também a quantidade de fluido no interior do lúmen intestinal, notando-se uma incapacidade de absorção por parte das vilosidades, o que contribui também para o aparecimento de diarreia.

No entanto, em vitelos infetados por rotavírus, a severidade dos sinais clínicos não é acompanhada por alterações histológicas correspondentes nas vilosidades, suspeitando-se que outro mecanismo pode ser também responsável pela indução da diarreia (Foster & Smith, 2009).

Na década de 90, a proteína NSP4, além de ter sido a primeira enterotoxina viral a ser descoberta, foi também demonstrada como sendo crucial na patogénese desta afeção. Através de estudos, concluiu-se que esta glicoproteína é capaz de induzir uma diarreia dose e idade-dependente, clinicamente semelhante à causada por Rotavírus. A confirmação de que a NSP4 seria libertada de células infetadas por Rotavírus e teria um efeito parácrino nas células não infetadas adjacentes foi efetuada quer *in vitro*, quer *in vivo* (Foster & Smith, 2009; Estes & Greenberg, 2013).

A exposição intra e extracelular a esta proteína altera o movimento de nutrientes e água através do epitélio. O aumento de níveis de cálcio no espaço intracelular inibe a translocação de dissacaridases das vesículas intracelulares para a superfície luminal, diminuindo a capacidade de digestão de carboidratos e levando a má digestão e exacerbação da diarreia. A NSP4 também poderá estar implicada na secreção de cloreto através do aumento de cálcio intracelular, mas essa secreção ganha mais força pelo mecanismo de ativação do sistema nervoso entérico. O mecanismo por si só ainda não se encontra totalmente explicado, mas as prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios podem desempenhar um papel ativo nessa secreção (Foster & Smith, 2009).

A existência de infeções mistas com *E. coli* enterotoxigénica resultam em lesões mais severas, podendo neste caso não só infetar mais gravemente o intestino delgado, como também afetar o cólon (Radostits *et al.*, 2007).

#### **1.1.3.4. Sinais clínicos**

A intensidade das manifestações clínicas desta patologia e a mortalidade em vitelos dependem de diversos fatores, sendo eles: estirpe envolvida, resistência do indivíduo infetado (resistência não específica, proteção do colostro), dose infetante, infeções

concomitantes do trato gastrointestinal e outros sistemas, stress e condições de estabulação (Van Metre *et al.*, 2008).

Como acontece com a maioria dos agentes patogénicos entéricos, quanto mais jovem for indivíduo afetado, maior a probabilidade de aparecimento de sinais clínicos graves devido às perdas de água, eletrólitos e reservas de nutrientes do corpo secundárias à diarreia. Os sinais clínicos de depressão, desidratação e choque são mais comuns em vitelos mais novos (5 dias de idade) e raramente ocorrem em vitelos mais velhos (2 semanas de idade) (Van Metre *et al.*, 2008).

Os vitelos infetados podem apresentar doença inaparente, leve, moderada ou até mesmo fatal. Inicialmente, os vitelos apresentam-se prostrados e com reflexo de sucção diminuído. Assim sendo em vacas de carne, o úbere das mães torna-se distendido por acumulação de leite e pode ser a primeira indicação de que o vitelo se encontra doente (Scott *et al.*, 2004).

As fezes diarreicas apresentam tom amarelo-pálido ou branco, podendo conter muco. Em casos mais graves, a desidratação e a acidose metabólica podem tornar-se fatais. Os vitelos podem apresentar distensão abdominal do quadrante inferior direito devido ao sequestro de fluídos ao nível do intestino delgado. A excreção de grande quantidade de fezes parecidas com iogurte são típicas das infeções por Rotavírus, que poderá dever-se à passagem de leite parcialmente digerido ou por digerir. A ocorrência de febre pode variar, sendo geralmente leve ( $<39.5^{\circ}\text{C}$ ) (Scott *et al.*, 2004).

#### **1.1.3.5. Diagnóstico**

Não existem sinais patognomónicos desta afeção em vitelos que permitam diferenciá-la da diarreia causada por outros agentes patogénicos, sendo necessário portanto a realização de diagnóstico laboratorial para identificar este agente etiológico.

O diagnóstico pode ser efetuado através da identificação de partículas virais nas fezes de vitelos afetados, sendo que estas devem ser frescas e colhidas nas primeiras 24 horas em que se manifesta a doença e a diarreia (Van Metre *et al.*, 2008). O isolamento de partículas víricas das fezes não determina por si só o diagnóstico desta afeção, uma vez que podem ser identificados níveis de excreção viral consideráveis em vitelos saudáveis e assintomáticos. Assim sendo, poderá ser necessário a comparação de fezes de vitelos saudáveis com fezes de vitelos doentes, para precisar a etiologia da doença (Scott *et al.*, 2004). As fezes submetidas a exame laboratorial podem ser analisadas ao

microscópio eletrónico para observação direta de partículas virais ou poderão ser testadas recorrendo a outras técnicas, como a aglutinação em latex ou ELISA para detetar a presença de antigénios e a técnicas de imunofluorescência em análises de tecidos recolhidos em necrópsia (Van Metre *et al.*, 2008).

Atualmente, o teste de ELISA tem sido o método mais usado para a deteção de Rotavírus não só devido à sua elevada sensibilidade, como também pelo facto de não requerer equipamento especializado, ser relativamente barato e estar disponível comercialmente em formatos validados. Por sua vez, a eletroforese em gel de poliacrilamida também se tornou igualmente satisfatória. As técnicas de RT-PCR também poderão ser usadas como meio de obter o diagnóstico desta afeção, apresentando sensibilidade e especificidade elevadas e ainda a vantagem adicional de ser capaz de determinar génotipos, em contraste com a técnica de ELISA (Estes & Greenberg, 2013).

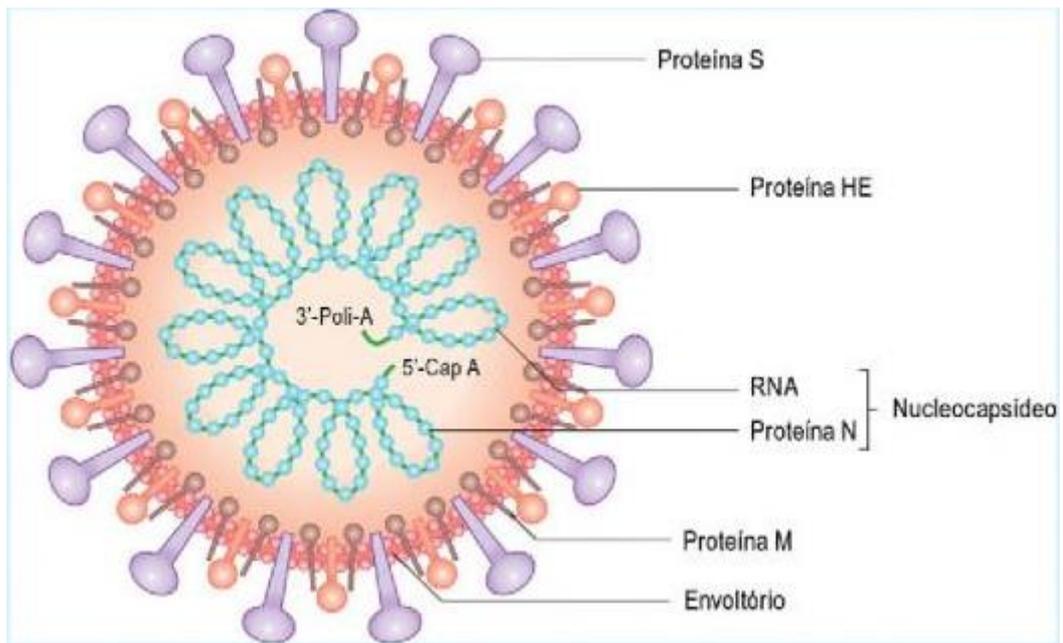
Existe também a possibilidade de identificar rotavírus em animais com diarreia, tendo sido desenvolvidos testes de imunocromatografia de fluxo, que permitem identificar este agente etiológico de forma rápida e no campo.

Os dados relativos à sensibilidade e especificidade deste tipo de teste serão referidos no diagnóstico laboratorial do segundo estudo do capítulo III – Trabalho experimental.

#### **1.1.4. Coronavírus**

Os coronavírus (CoV) são um amplo grupo de agentes etiológicos em animais e humanos, apresentando tropismo para o trato respiratório, digestivo (intestino e fígado) e também para o sistema neurológico por vezes. O primeiro coronavírus foi isolado de embriões de galinha, em 1937 (Wang *et al.*, 2015).

Este vírus pertence à subfamília Coronavirinae, inserindo-se na ordem Nidovirales. Trata-se de um virião com forma pleomórfica e esférica, sendo o seu genoma constituído por uma cadeia simples de RNA, não segmentado e com envelope (Figura 4) (Yang & Leibowitz, 2015). Peplómeros, estruturas proeminentes geralmente constituídas por glicoproteínas e lipídios, projetam-se da superfície do envelope viral conferindo um aspeto de coroa, daí a designação de Coronavírus (Scott *et al.*, 2004).



**Figura 4 - Estrutura do coronavírus (Adaptado de Korsman *et al.*, 2014)**

Dentro dos coronavírus que podem afetar animais, existe uma divisão em 3 grupos antigénicos, que é determinada pelo hospedeiro que poderá infetar e por propriedades do vírus. O coronavírus bovino (BCoV) insere-se no grupo 2, sendo que o que o difere dos outros CoV é a presença de hemaglutinina-esterase no seu envelope (Boileau & Kapil, 2010).

Existindo apenas um serótipo de coronavírus bovino (BCoV), este é um dos agentes habitualmente implicado nas diarreias em vitelos quer de leite quer de carne, sendo tão prevalente como o Rotavírus e fazendo-se notar especialmente em infeções mistas (Van Metre *et al.*, 2008). Está descrito que este vírus é responsável por causar doença respiratória (Complexo Respiratório Bovino) e diarreia não só em vitelos como também bovinos adultos. Além disso, também é agente de disenteria de inverno em gado bovino adulto (Boileau & Kapil, 2010).

A severidade da doença depende de diversos fatores, sendo eles: a idade do indivíduo afetado, o seu estado imunitário, a dose infetante e a virulência da estirpe envolvida (Boileau & Kapil, 2010).

#### **1.1.4.1. Epidemiologia**

Trata-se de um vírus ubiqüitário e quase todos os bovinos adultos são seropositivos, pelo que a sua fácil disseminação contribui para perdas económicas

significativas quer em explorações leiteiras, quer em explorações de engorda (Radostits *et al.*, 2007).

A transmissão ocorre normalmente por via feco-oral, podendo também ocorrer através de aerossóis (inalação de partículas virais), uma vez que o vírus consegue replicar-se no trato respiratório superior (Radostits *et al.*, 2007). O período de incubação é de 20 a 30 horas (Scott *et al.*, 2004).

Os picos de doença são mais marcados no Inverno, o que pode sugerir que este vírus é mais resistente em meios frios e húmidos e quando sujeito a baixa radiação solar (Radostits *et al.*, 2007).

Normalmente, a doença manifesta-se entre os 5 e 30 dias de vida, sendo que os sinais clínicos podem aparecer entre as primeiras 24 horas de vida (no caso de vitelos que foram privados do colostro) e aos 5 meses de vida. Caracteriza-se também por causar morbidade elevada, mas mortalidade moderada (Boileau & Kapil, 2010).

Os vitelos infetados podem excretar uma grande quantidade de vírus (1 bilião de partículas virais por mL de fezes), sendo que vitelos clinicamente recuperados podem continuar a excretar, em níveis mais baixos durante semanas (Boileau & Kapil, 2010). Verificam-se taxas de isolamento do vírus entre 8-69% e 0-24% em vitelos com diarreia e vitelos saudáveis, respetivamente (Radostits *et al.*, 2007).

O pico de excreção em animais adultos geralmente ocorre nos meses de Inverno e na altura do parto, sendo que a vacinação das mães no período seco diminui essa excreção. Os vitelos nascidos de mães portadoras estão em risco elevado de contrair doença devido à contaminação fecal do períneo, úbere e do local do parto (Boileau & Kapil, 2010). Estima-se que o BCoV seja eliminado por mais 70% de indivíduos adultos, com presença de anticorpos específicos no seu soro e nas suas fezes (Radostits *et al.*, 2007).

#### **1.1.4.2. Replicação**

Pelo facto de possuir envelope, a penetração do BCoV nas células depende que ocorram determinados processos, que são mediados pela proteína S. A ligação à superfície da célula-alvo ocorre por adesão por parte das partículas virais aos recetores dessas mesmas células ou por endocitose (Millet & Whittaker, 2014; Yang & Leibowitz, 2015). A fusão do envelope com a membrana celular origina libertação de

genoma viral (RNA) no citoplasma das células alvo, permitindo assim que a replicação viral ocorra (Millet & Whittaker, 2014).

A replicação ocorre através da produção de genomas completos e intermediários subgenômicos de cadeia negativa, pouco depois da entrada e fusão do envelope viral. A translação de mRNA's subgenômicos dá origem a proteínas virais estruturais e não estruturais. O genoma RNA replicado é encapsulado e transformado em novos viriões (Yang & Leibowitz, 2015).

A síntese de partículas virais dá-se no citoplasma por gemulação, transformando-se em vesículas de parede dupla no retículo endoplasmático rugoso. Após a gemulação, essas mesmas partículas virais acumulam-se no complexo de Golgi, onde maturam. Por fim, atravessam o complexo de Golgi e são transportadas em vesículas exocíticas, que eventualmente se fundem com a membrana plasmática, para libertar vírus no espaço extracelular (Yang & Leibowitz, 2015).

De referir que esta replicação viral é citocida, o que significa que depois de acumuladas, as novas partículas virais são libertadas da célula por malabsorção com lise celular (Scott *et al.*, 2004). Esta inicialmente ocorre ao longo do comprimento das criptas e vilosidades em todos os níveis do intestino delgado, eventualmente espalhando-se ao longo do cólon, até ao seu final e reto, causando uma diarreia malabsortiva (Boileau & Kapil, 2010).

### **1.1.4.3. Fisiopatologia**

O vírus é citolítico, infetando os enterócitos maduros presentes na superfície das criptas e vilosidades intestinais e também as células epiteliais do trato respiratório superior. Inicialmente, o vírus adere-se aos enterócitos por fusão do envelope com a membrana celular ou vesículas de endocitose, contando com a participação da hemaglutinina (HE) e da proteína S. Ocorre replicação e excreção viral no interior da célula, seguindo-se morte celular. De referir que a diarreia inicia-se no momento da entrada do vírus na célula, bem antes de ocorrer morte celular (Foster & Smith, 2009).

Verifica-se uma hiperplasia compensatória das células das criptas, que juntamente com o aumento de secreções por parte das mesmas originam um aumento de líquidos no lúmen intestinal. A perda de área de superfície resultante da ação do vírus e a substituição de enterócitos maduros por células imaturas, que são incapazes de secretar

enzimas digestivos, comprometem a capacidade de absorção e digestão normal (Boileau & Kapil, 2010).

A doença causada por BCoV é mais severa do que se for causada por Rotavírus, resultando numa enterocolite muco-hemorrágica (Boileau & Kapil, 2010). O intestino delgado, mais propriamente o jejuno e íleo, são severamente danificados devido à descamação de células infetadas. Por sua vez, células superficiais e células das criptas do cólon também são afetadas (Scott *et al.*, 2004).

As lesões observadas no intestino delgado apresentam um padrão semelhante àquelas produzidas por Rotavírus, assim como se pensa que o mecanismo responsável por causar diarreia também seja semelhante ao verificado pelo Rotavírus. Por sua vez, no cólon observa-se destruição nas criptas, resultando em atrofia da mucosa e dilatação das criptas, contendo células exfoliadas mortas (Scott *et al.*, 2004).

#### **1.1.4.4. Sinais clínicos**

O BCoV afecta as criptas dos enterócitos e como a renovação celular ocorre das criptas para as vilosidades intestinais, os sinais clínicos desta afeção são de maior duração (Foster & Smith, 2009).

A severidade da diarreia torna-se maior e o período de incubação menor em vitelos mais novos, especialmente naqueles em que por algum motivo ocorreu falha de transmissão de imunidade passiva, sendo comum ocorrer depressão severa com desidratação progressiva em 4-5 dias (Scott *et al.*, 2004).

Normalmente, a diarreia é aquosa e mais severa que outro tipo de diarreias virais, sobretudo aquela causada por Rotavírus. Ocorre assim uma desidratação e acidose mais agressiva e também perdas substanciais de iões, nomeadamente, sódio, potássio, cloreto e bicarbonato. Numa fase inicial, poderão ser vistas fezes amarelas fluidas, tornando-se depois num líquido amarelo contendo coágulos de leite, muco e ocasionalmente rasgos de sangue (hematoquésia), que em casos mais graves evolui para uma diarreia aquosa profusa (Scott *et al.*, 2004).

Alguns vitelos podem desenvolver síndrome pneumoentérico, estando presente sintomatologia intestinal (diarreia) e sinais leves de doença respiratória (pneumonia) em simultâneo (Van Metre *et al.*, 2008).

#### 1.1.4.5. Diagnóstico

O diagnóstico desta doença, tal e qual como nas afeções por Rotavírus, é baseado na deteção do vírus ou de antígenos em amostras de tecido intestinal ou fezes. Também é possível chegar ao diagnóstico por deteção viral em zaragoas nasais.

As fezes deverão ser colhidas o mais cedo possível, após o início da manifestação de diarreia e enviadas de forma refrigerada para o laboratório. Por sua vez, as amostras de tecido deverão ser enviadas de forma congelada (Radostits *et al.*, 2007).

A identificação de BCoV nas fezes através de microscopia eletrónica tem sido o meio de diagnóstico “standard” por ser fácil observar o vírus se for concentrado por ultracentrifugação. No entanto, requer equipamento e perícia (Radostits *et al.*, 2007).

Pode recorrer-se a técnicas de ELISA direto, com o intuito de identificar antígenos, sendo que o anticorpo monoclonal Z3A5 é geralmente o escolhido, no caso de diagnóstico de BCoV (Boileau & Kapil, 2010).

No diagnóstico por imunohistoquímica, o uso de anticorpo monoclonal 8F2 é recorrente, sendo que este se liga com a proteína mais predominante (nucleocápside) do BCoV (Boileau & Kapil, 2010).

Técnicas de hemaglutinação e aglutinação também poderão confirmar o diagnóstico desta doença. Tanto o teste de hemaglutinação de eritrócitos de rato, como o teste rápido de aglutinação em lâmina podem ser utilizados (Boileau & Kapil, 2010).

A utilização de RT-PCR demonstrou ser bastante sensível na deteção de partículas virais, mais concretamente o gene da nucleocápside, sendo que a deteção da proteína S permite diferenciar estirpes e é útil para investigações epidemiológicas (Boileau & Kapil, 2010).

Nas necrópsias, o cólon espiral é local de eleição para se obter amostras úteis para o diagnóstico de BCoV, uma vez que o vírus apresenta maior tropismo para essa zona (Boileau & Kapil, 2010).

Atualmente, existe também a possibilidade de identificar coronavírus em animais com diarreia, tendo sido desenvolvidos testes de imunocromatografia de fluxo, que permitem identificar este agente etiológico de forma rápida e no campo.

Os dados relativos à sensibilidade e especificidade deste tipo de teste serão referidos no diagnóstico laboratorial do segundo estudo do capítulo III – Trabalho experimental.

## 1.2. Controlo/ Prevenção

A diarreia neonatal pode dever-se não só a fatores infecciosos, como também a não-infecciosos, tornando assim difícil o controlo desta afeção nas explorações. Um plano de prevenção e controlo bem executado torna-se então determinante, para reduzir perdas económicas nas explorações e melhorar o bem-estar animal (Mukhtar *et al.*, 2015).

Um dos pontos mais importantes da prevenção das diarreias neonatais passa por realizar-se sempre um encolostramento de forma adequada. O colostro é considerado um fator de importância elevada num vitelheiro saudável, sendo portanto necessário avaliar se o colostro fornecido é adequado no que toca a níveis de Ig. A sua qualidade é determinada pela concentração de imunoglobulinas existentes na sua composição, sendo que um colostro de boa qualidade deverá conter uma concentração de imunoglobulinas superior a 50g/L (Godden, 2008). Este facto pode por si ser uma das causas de insucesso de transferência imunitária passiva.

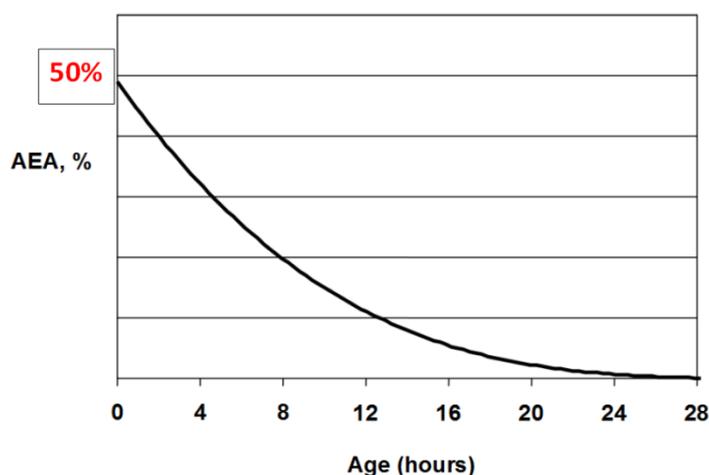
Após o nascimento, os vitelos por serem agamaglobulinémicos estão totalmente dependentes da transferência não só de imunoglobulinas, como também de células imunes, de outras substâncias imunológicas não-específicas, de citocinas, de elementos nutricionais e de fatores de crescimento, no decorrer das primeiras horas de vida, visando a defesa eficaz do seu organismo contra agentes infecciosos, causadores de diarreias e outro tipo de infeções (McGuirk & Collins, 2004).

O colostro irá satisfazer as necessidades dos vitelos, contendo na sua composição mais teor em proteína, em imunoglobulinas, em nitrogénio não-proteico, em gorduras, em vitaminas, em cinzas e minerais do que o leite (McGuirk & Collins, 2004). As imunoglobulinas que fazem parte da composição do colostro são IgG, IgA e IgM, sendo que constituem aproximadamente 85 a 90%, 5% e 7%, respetivamente, para a composição total de imunoglobulinas, sendo que a IgG1 representa 80 a 90% do total de IgG (Godden, 2008).

Para que a transferência de imunidade passiva seja bem-sucedida, o vitelo deve consumir uma massa suficiente de Ig no colostro e, em seguida, ser capaz de absorver com sucesso uma quantidade suficiente dessas moléculas para a sua circulação (Godden, 2008). Os principais fatores que afetam a massa de Ig consumida pelo vitelo incluem a qualidade e o volume de colostro alimentado. Para os animais de aptidão leiteira, está aconselhada a ingestão de pelo menos 100 g de imunoglobulinas por vitelo a cada toma, sendo a administração de colostro realizada em duas tomas. A primeira

deverá ser efetuada com a maior brevidade possível, até às seis horas de vida, numa quantidade mínima de 2 litros e a segunda até as 12 horas de vida, com a mesma quantidade da primeira (Quigley, 1997; Scott *et al.*, 2004).

O principal fator que afeta a absorção de moléculas de Ig em circulação é a rapidez, após o nascimento, com o qual a primeira administração de colostro é realizada (Godden, 2008). O “turnover” celular intestinal, o desenvolvimento de secreções intestinais e a formação de vacúolos digestivos intra-epiteliais iniciam-se logo após o nascimento do vitelo, sendo que o transporte macromolecular no intestino, sem que ocorra digestão, diminui gradualmente, apresentando-se praticamente nulo entre as 20 e 24 horas de vida (Quigley, 2007) (Gráfico 1). Consequentemente, é de extrema importância para o vitelo recém-nascido, a ingestão de colostro de boa qualidade na quantidade adequada e, bem como, no intervalo de tempo em que a absorção se encontra nos níveis adequados. Este facto deve-se às imunoglobulinas serem absorvidas por pinocitose ao longo do intestino delgado e transportadas através do epitélio, em direção aos vasos linfáticos e, subsequentemente, para a circulação sanguínea (Godden, 2008; Cortese, 2009).



**Gráfico 1 - Evolução da eficiência aparente de absorção de IgG (AEA) com o decorrer do tempo após o nascimento do vitelo (adaptado de Quigley *et al.*, 2007)**

Para além dos fatores inerentes ao colostro supracitados, a transferência de imunidade passiva pode ainda ser influenciada por outros fatores, tais como: paridade das mães, tempo de duração do período seco, número de lactação, raça da vaca, vacinação e o sexo dos vitelos (Quigley, 1998; Youngquist, 2007; Godden, 2008).

A maior parte dos estudos, mas não todos, reporta a tendência para vacas mais velhas produzirem um colostro de melhor qualidade, no que toca a concentração de Ig presentes na composição (Godden, 2008). A concentração de imunoglobulinas no colostro parece aumentar com o número de lactações de cada vaca, devido a uma estimulação antigénica mais prolongada no tempo, uma maior capacidade secretória e um sistema de transporte de imunoglobulinas mais eficiente nas vacas mais velhas (Corke, 2010). Tal efeito só se verifica a partir da 3ª lactação em diante (Radostits *et al.*, 2007).

No entanto, num estudo efetuado por em gado Holstein, Besser & Gay (1999) concluíram que vacas primíparas produziam colostro com concentração de imunoglobulinas semelhante a vacas em 3ª lactação. Os produtores das explorações leiteiras devem ser desencorajados a descartar o leite de vacas primíparas, uma vez que também poderá ser de boa qualidade (Besser & Gay, 1999).

No que toca à raça, estudos efetuados comprovam que este fator poderá ter um efeito com a qualidade do colostro. Corke (2010) comprovou que a raça Holstein produz menor concentração de imunoglobulinas do que as raças Jersey, Guernsey, Parda Suíça e Ayrshire, podendo ser o resultado do efeito de diluição que ocorre em vacas Holstein por produzirem maiores volumes de colostro (Corke, 2010).

A secreção de imunoglobulinas inicia-se aproximadamente cinco semanas antes do parto (Godden, 2008). Besser & Gay (1999) não encontraram diferenças significativas na concentração de imunoglobulinas no colostro a partir dos 30 dias de período seco (Besser & Gay, 1999). Noutro estudo realizado, Pritchett *et al.*, (1991) concluíram que a concentração de imunoglobulinas é máxima em vacas com período seco de pelo menos 40 dias, mas sem exceder os 90 dias (Pritchett *et al.*, 1991).

Num estudo (Roy, 1990) citado por Quigley (2007), demonstrou que as fêmeas apresentaram uma taxa de absorção maior que os machos. Assim, o sexo do vitelo também poderá ter influência na absorção de imunoglobulinas e influenciar a transferência de imunidade passiva (Quigley, 2007).

A vacinação também poderá ser um ponto importante na prevenção de doenças. No período seco, entre as três e as seis semanas antes do parto, este método profilático pode fazer aumentar as concentrações de anticorpos colostrais e também aumentar os títulos de anticorpos passivo em vitelos de mães vacinadas. Trata-se de uma boa forma de prevenir e controlar as infeções por certos agentes patogénicos neste período crítico para

os vitelos, tais como: *Escherichia coli*, rotavírus, coronavírus, Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) (Godden, 2008; Cho *et al.*, 2013).

Para isso, existem várias vacinas disponíveis no mercado, sendo elas inativadas. Quer a vacina Trivacton® 6, quer a Lactovac® C são utilizadas com o intuito de conferir imunidade passiva aos vitelos contra a Coronavirose, Colibacilose e Rotavirose. Por sua vez, a Rotavec® Corona também confere anticorpos maternos aos vitelos contra a Rotavirose, Colibacilose e Coronavirose. A Bovilis® BVD é utilizada para a imunização ativa de vacas e novilhas, a partir dos oito meses de idade, de modo a proteger o feto contra a infecção transplacentária pelo Vírus da BVD.

As boas práticas de manejo nas explorações leiteiras tornam-se também um ponto importante prevenção de doenças em vitelos. É essencial excluir focos de infecção, assegurando boas práticas de higiene e biossegurança. Estudos indicam que o manejo ambiental dos vitleiros reduz a incidência de diarreias e o despoletar de surtos dentro das explorações. Deverá adotar-se um sistema de “all-in all-out” no vitleiro. A higienização e desinfecção quer das maternidades, quer dos vitleiros, assim como a desinfecção regular de utensílios e a presença de palha adequada foram identificados como fatores importantes no manejo (Mukhtar *et al.*, 2015).

A limpeza das maternidades antes do parto deverá ser feita sempre, utilizando desinfetantes ou então, no caso de as camas serem compostas por palha, efetuar a mudança da mesma, pois pode ocorrer contato com agentes patogénicos na altura do parto (Scott *et al.*, 2004).

Cada vez mais, o controlo de doenças infecciosas assenta no aumento da resistência do hospedeiro à infecção, removendo reservatórios da infecção e impedindo que o contacto resulte na transmissão de agentes infecciosos (Maunsell & Donovan, 2008).

## **III – TRABALHO EXPERIMENTAL**

### **1. Avaliação da transferência da imunidade passiva em vitelos de leite – estudo de campo**

#### **1.1. Resumo**

Os mecanismos de defesa de um vitelo, aquando do nascimento, não estão ainda completamente funcionais, uma vez que o seu sistema imunitário apesar de estar desenvolvido, só atinge a maturidade por volta dos seis meses de idade (Hunt, 1999). Este estudo foi efetuado com o objetivo de avaliar a transmissão de imunidade passiva em vitelos de leite e perceber que variáveis podem influenciar essa transmissão. Apesar de 50% (n=17) das explorações envolvidas neste estudo administrar quantidades de colostro adequadas e dentro do tempo pós-nascimento considerado aconselhado, apenas 41% (n=43) dos vitelos analisados encontravam-se com níveis de IgG adequados. Adicionalmente, concluiu-se que o momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro fornecida influenciou o nível de proteínas séricas na primeira semana de vida ( $p < 0,001$ ). Existe, portanto, lugar a uma adequada sensibilização e formação técnica por parte dos produtores e tratadores desta região de forma a melhorar o maneo do colostro nos vitelos recém-nascidos.

#### **1.2. Introdução**

A proteção contra agentes infecciosos nos vitelos está diretamente relacionada com a quantidade de colostro por eles ingerida nas primeiras horas de vida, uma vez que o tipo de placenta (Sinepiteliocorial e cotiledonar) presente nos ruminantes impede a transmissão de imunoglobulinas e de células de linha branca do sangue da mãe para o feto ao longo da gestação, os vitelos nascem agamaglobulinémicos (Tizard, 2000; Igwebuike, 2006; Godden, 2008).

Uma administração inadequada de colostro e conseqüentemente uma baixa transmissão de imunoglobulinas, será responsável por um estado imunitário débil, o que aumenta a predisposição dos vitelos para diarreias neonatais e outras infeções, que para além de implicarem custos de tratamento elevados e atrasos no crescimento, também poderão levar à morte dos mesmos (Mee, 2008). Deste modo, torna-se fundamental para

o vitelo, nas primeiras horas de vida, ingerir colostro de boa qualidade, em quantidade adequada e no intervalo de tempo em que a absorção das imunoglobulinas se encontra nos níveis adequados: transferência de imunidade passiva (Godden, 2008; Cortese, 2009).

A aferição da transferência da imunidade passiva pode ser realizada através da determinação das proteínas totais no soro sanguíneo, estando estas fortemente correlacionadas com o nível de gamaglobulinas séricas (Radostits *et al.*, 2007). Essa aferição deve ser feita entre as 24 horas e os 3 dias após o nascimento, para garantir que as Ig sejam absorvidas por completo no intestino e passem assim para a corrente sanguínea. Depois dos 3 dias a relação entre proteína do soro e Ig pode mudar, devido a absorção de proteínas da dieta e migração de Ig do sangue para outras localizações no organismo (Quigley, 2001). Poderá ser feita de forma simples com o uso de refratômetro, sendo portanto um teste simples e rápido de se realizar, não havendo necessidade de recorrer a laboratórios especializados. No entanto, esta avaliação também pode fazer-se através da determinação laboratorial de IgG1 no soro de vitelos.

Os valores de PT considerados como indicadores de transferência imunitária passiva com sucesso são valores iguais ou superiores a 5,5g/dL, sendo que valores inferiores a este limite são considerados indicadores de falha de transferência de imunidade passiva (Quigley, 2001).

### **1.3. Objetivos**

Os objetivos deste estudo foram:

1. Avaliar o estado imunitário de vitelos analisados e verificar se ocorreu ou não transmissão de imunidade passiva.
2. Avaliar o efeito do sexo dos vitelos, paridade das mães e momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro fornecida na eficácia da transmissão de imunidade passiva.

### **1.4. Materiais e métodos**

#### **1.4.1. Estudo de campo**

Este estudo foi realizado em explorações pertencentes às regiões de Entre Douro e Minho (n=33) e Aveiro (n=1), tendo sido realizadas colheitas de amostras de sangue

venoso (n=111) em visitas de clínica ambulatoria e visitas incluídas em sistemas de avanço de controlo reprodutivo.

#### 1.4.2. Questionário

Foi realizado um questionário epidemiológico (ver Anexo II) aos responsáveis das explorações com o objetivo de registar:

1. Procedimentos de manejo geral da exploração: quantidade e o momento de administração do colostro aos vitelos, existência ou ausência de banco de colostro e verificação da realização de avaliação da qualidade do colostro.

2. Informações relativas ao parto: paridade da mãe.

3. Informações referentes ao vitelo: sexo do vitelo (gráfico 2).

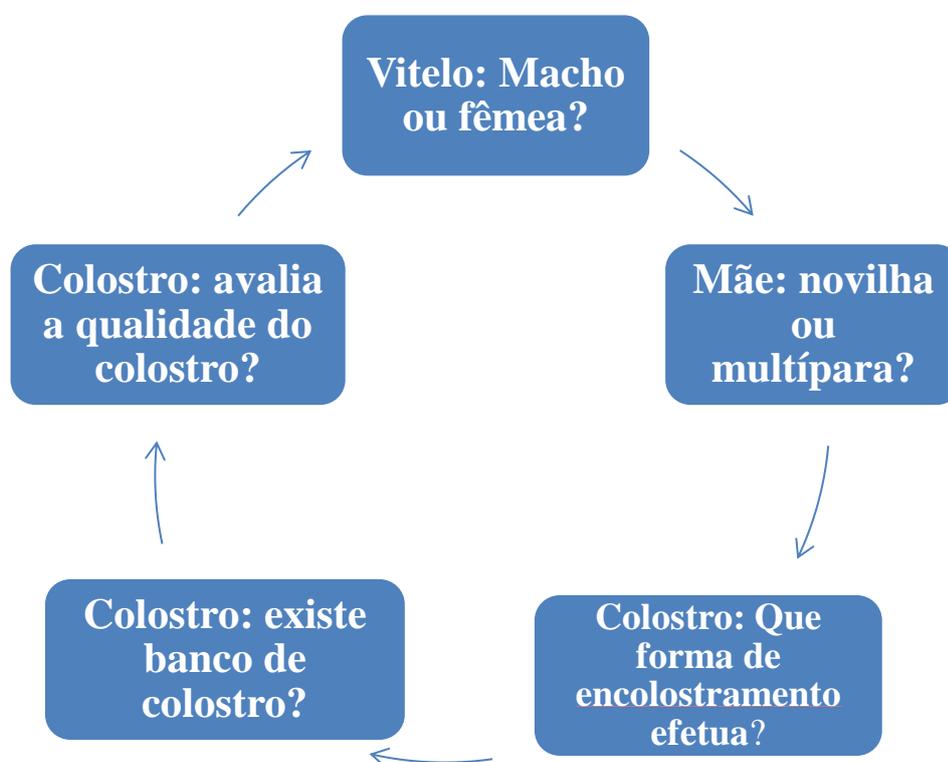


Figura 5 - Esquema ilustrativo do registo efetuado nos inquéritos realizados aos responsáveis das explorações

#### 1.4.3. Colheita e processamento das amostras

As amostras de sangue foram colhidas da veia jugular, recorrendo a tubos de vácuo sem anticoagulante, entre as primeiras 24 horas e sete dias de vida (Imagem 4). Após formação do coágulo sanguíneo, os tubos de sangue foram centrifugados a 1008 g durante 15 minutos, nas 24 horas seguintes à sua colheita (Imagem 5). Relativamente à

determinação das proteínas séricas totais no soro, esta foi realizada por um refractómetro clínico manual, Zuzi Modelo 50303122 (Série ECO) com compensação automática de temperatura (10-30° C), à temperatura ambiente ( $\pm 20^{\circ}\text{C}$ ), segundo a técnica descrita por Calloway e Morrill (Imagem 6) (Calloway, 2002, Morrill, 2012).



**Imagem 4 - Colheita de sangue da veia jugular, em vitelo**



**Imagem 5 - Processamento das amostras de sangue colhidas**



**Imagem 6 - Determinação das proteínas totais séricas, recorrendo ao refractómetro**

#### **1.4.4. Definição das variáveis**

Para determinar a associação entre as práticas de manejo e o nível de PT foram definidas variáveis correspondentes às respostas obtidas nos questionários.

Foram definidos como vitelos com absorção de imunidade passiva adequada todos os vitelos com proteínas séricas superiores ou iguais a 5,5g/dL, Todos os vitelos com valores de proteínas séricas inferiores a 5,5g/dL foram definidos como tendo falha de transferência de imunidade passiva.

Como explorações consideradas como tendo administração adequada de colostro (explorações A) consideraram-se as explorações em que a primeira toma de 2 litros colostro era feita até às 6 horas de vida, sendo administrados mais dois litros até as 12 horas de vida. As explorações foram consideradas como tendo uma administração inadequada quando se administrava menos de 4 litros até às 12 horas (explorações B) ou até às 24 horas de vida (explorações C).

Na variável “sexo dos vitelos”, agrupou-se separadamente machos e fêmeas; os critérios referentes à transferência de imunidade passiva foram os mesmos descritos anteriormente.

Quanto à “paridade das mães”, foram consideradas vacas multíparas e vacas primíparas; os critérios referentes à transferência de imunidade passiva foram os mesmos descritos anteriormente.

#### **1.4.5. Análise estatística**

Utilizando os dados resultantes do ensaio experimental e as variáveis definidas, foi elaborada uma análise de frequências com recurso ao programa Microsoft Excel, sendo

que os mesmos dados foram utilizados para uma posterior análise univariada através do modelo linear geral do programa R<sup>®</sup> (The R Foundation for Statistical Computing, 2013), de forma a determinar se o sexo dos vitelos, a paridade das mães e o momento em conjugação com a quantidade de colostro administrado poderiam ser considerados fatores de risco associados à transmissão de imunidade passiva, recorrendo para tal a ANOVA. Os resultados foram considerados significativos para um intervalo de confiança de 95% e para um valor de  $p < 0,05$ .

Após análise, determinou-se que o único dos três fatores de risco com influência nos valores de proteínas totais séricas seria o momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro fornecida, tendo-se realizado também uma regressão logística para estimar-se o *odds ratio*, com a finalidade de entender qual seria a probabilidade de ocorrer falha de transferência de imunidade passiva, conforme as diferentes formas de administração do colostro.

## 1.5. Resultados

Das 111 amostras processadas, 53% correspondiam a fêmeas, sendo que houve um vitelo que não se registou o sexo (Gráfico 2).

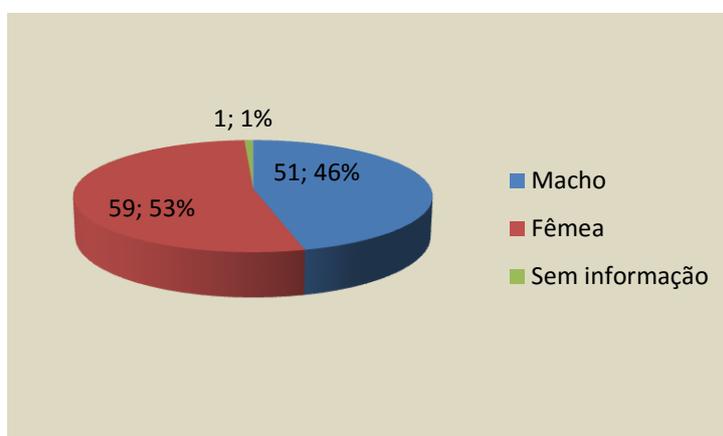
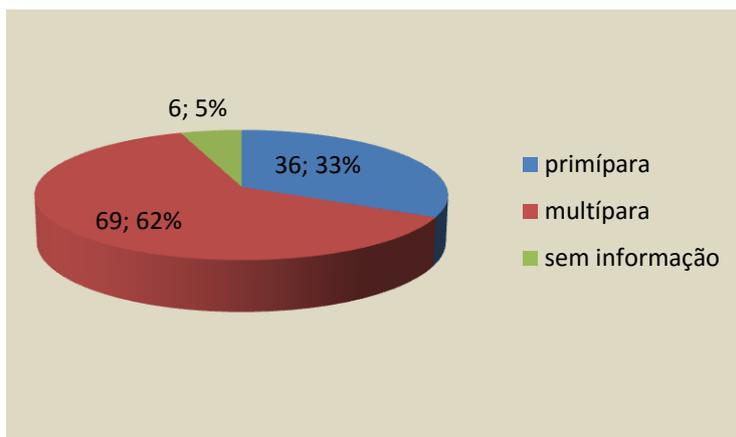


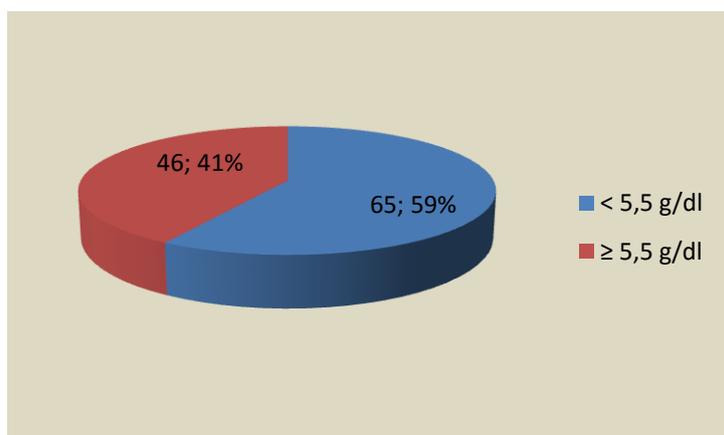
Gráfico 2 - Distribuição das amostras por sexo (FR, % n=111)

Relativamente à paridade das mães, 33% das amostras correspondiam a vitelos filhos de vacas primíparas. De referir que não foi possível registar a paridade em seis das amostras colhidas (Gráfico 3).



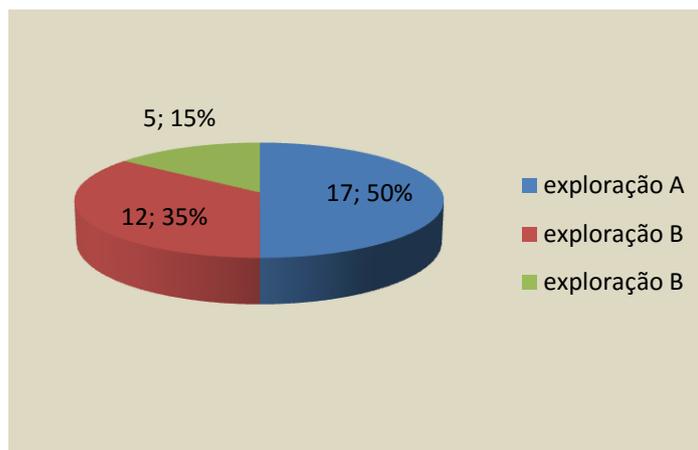
**Gráfico 3 - Distribuição das amostras por paridade das mães (FR, % n=111)**

Quanto aos valores de proteínas séricas totais (PT), a média do valor das 111 amostras foi de 5,367 g/dL (desvio-padrão= 0,622), onde 59% das amostras processadas se encontravam em níveis inferiores a 5,5 g/dL, sugestivos de falha de transmissão de imunidade passiva (Gráfico 4).



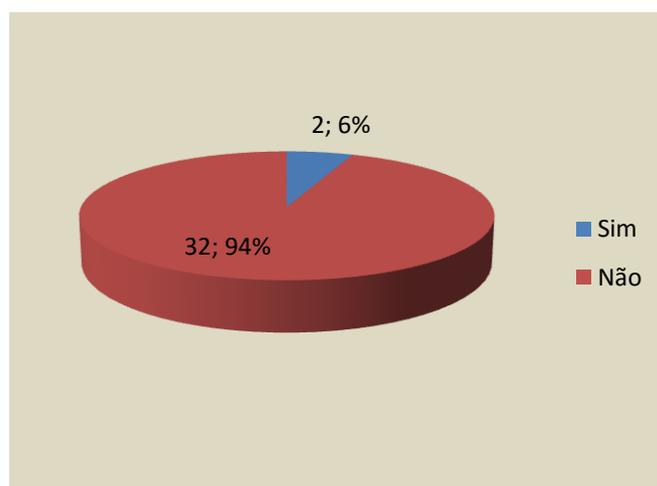
**Gráfico 4 - Distribuição das amostras por níveis de PT**

No que se refere às 34 explorações inseridas neste estudo, observou-se que 50% delas administrava uma primeira toma de dois litros de colostro até às seis horas de vida e uma segunda toma, também nas mesmas quantidades até às 12 horas de vida (explorações A). As explorações que administram menos de quatro litros de colostro até às 12 horas de vida (explorações B) corresponderam a 35% das explorações e apenas 15% administram uma quantidade de colostro inferior a quatro litros, até as 24 horas de vida do vitelo (explorações C) (Gráfico 5).



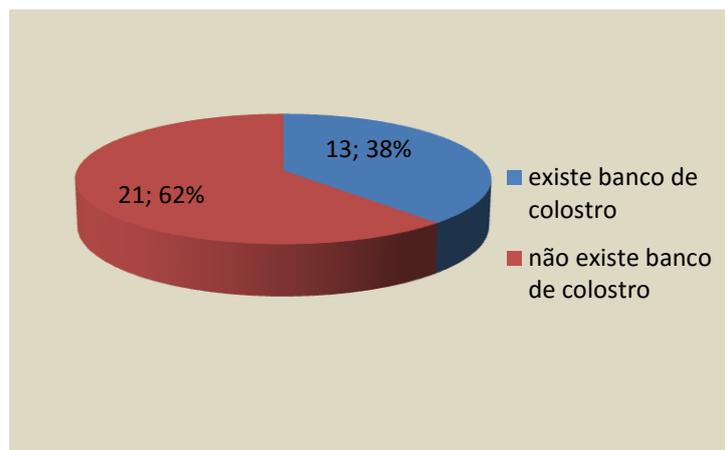
**Gráfico 5 - Distribuição das explorações em função da quantidade e momento de administração do colostro (FR, % n=34)**

Apenas seis por cento das explorações possuem colostrómetro, tendo a possibilidade de fazer uma avaliação prévia da qualidade do colostro antes da administração do mesmo (Gráfico 6).



**Gráfico 6 - Explorações que efetuam avaliação da qualidade do colostro (FR, % n=34)**

Após realização do questionário, verificou-se também que 38% das explorações possuíam banco de colostro (Gráfico 7).



**Gráfico 7 - Distribuição das explorações em função da existência ou não de banco de colostro (FR, % n=34)**

Observou-se que 59,4% dos vitelos incluídos no estudo apresentaram uma adequada transmissão de imunidade passiva, sendo que esse registo nas explorações B e C foi de 20 e 8,3%, respetivamente. Quanto ao sexo dos vitelos, verificou-se que 37,3% dos vitelos machos e 44,1% das fêmeas apresentaram uma adequada transmissão de imunidade passiva. Por fim, no que toca à paridade, registou-se que 36,1% de vitelos nascidos de vacas primíparas e 42% de vitelos nascidos de vacas múltíparas apresentaram uma adequada transmissão de imunidade passiva (Tabela 3).

		<b>TIP</b>		
		<b>FA</b>	<b>Falha (&lt;5,5 g/dL)</b>	<b>Adequada (≥5,5 g/dL)</b>
<b>Quantidade e o momento de administração do colostro</b>	Explorações A	<b>FA</b>	26	38
		<b>FR, %</b>	40,6%	59,4%
	Explorações B	<b>FA</b>	28	7
		<b>FR, %</b>	80,0%	20,0%
	Explorações C	<b>FA</b>	11	1
		<b>FR, %</b>	91,7%	8,3%
<b>Sexo dos vitelos</b>	Macho	<b>FA</b>	32	19
		<b>FR, %</b>	62,7%	37,3%
	Fêmea	<b>FA</b>	33	26
		<b>FR, %</b>	55,9%	44,1%
<b>Paridade</b>	Primípara	<b>FA</b>	23	13
		<b>FR, %</b>	63,9%	36,1%
	Múltípara	<b>FA</b>	40	29
		<b>FR, %</b>	58,0%	42,0%

**Tabela 3 – Quadro-resumo da distribuição das amostras pelas variáveis que se pretendiam avaliar na eficácia da transferência de imunidade passiva (TIP)**

Pela realização da ANOVA, não se verificaram diferenças significativas na eficácia da transmissão da imunidade passiva em função da paridade ( $p=0,351$ ) e do sexo dos vitelos ( $p= 0,882$ ). A quantidade e momento de administração do colostro influenciaram significativamente a eficácia da transferência de imunidade passiva ( $p<0,001$ ) (Tabela 4).

<b>Fatores de risco</b>	<b>p-value</b>
Sexo dos vitelos	0,351
Paridade das mães	0,882
Quantidade e momento de administração de colostro	<0,001

**Tabela 4 - Influência dos fatores de risco com o nível de PT**

Recorreu-se ao modelo linear generalizado (GLM), com o intuito de perceber dentro das duas diferentes formas de administração de colostro, que se consideram mais propícias a que ocorra falha de transmissão de imunidade passiva (conforme o momento e a quantidade administrada), qual seria a probabilidade de ocorrer falha de transferência de imunidade passiva nos vitelos. Para a forma de administração B (1ª toma <4l até 12h) obteve-se uma significância estatística de  $p<0,001$ , sendo que na forma C (<4l até 24h) foi de  $p=0,009$ .

<b>Quantidade e momento de administração de colostro</b>	<b>p-value</b>	<b>Odds ratio</b>
Explorações B	0.000344	$\cong 6$
Explorações C	0.009750	$\cong 16$

**Tabela 5 - Odds ratio de transmissão de imunidade passiva adequada, consoante a quantidade e momento de administração de colostro**

Em função da quantidade e momento de administração do colostro, observou-se que nas explorações B e C, existem 6 e 16 vezes mais chances de ocorrer falha de transferência de imunidade passiva em relação as explorações A, respetivamente (Tabela 5).

## 1.6. Discussão

Somente 41% (n=46) dos vitelos analisados se encontravam com valores séricos de proteínas totais, compatíveis com adequada transferência de imunidade passiva apesar de 50% (n=17) das explorações envolvidas neste estudo referirem que administram quantidades de colostro adequadas e atempadamente na fase pós-nascimento.

Embora se pudesse supor que as fêmeas poderiam ter valores mais elevados de proteínas séricas totais (Quigley, 2007), atendendo ao diferente cuidado e sensibilidade que quotidianamente os produtores demonstram no seu manejo por serem animais com maior potencial produtivo e económico, de facto isso não se verifica e o sexo dos vitelos não é determinante nos níveis de proteínas totais presentes no soro dos animais testados ( $p > 0,05$ ).

Conforme descrito por alguns autores, o colostro de vacas primíparas é de pior qualidade no que se refere à concentração e volume de imunoglobulinas comparativamente ao de vacas múltiparas (Pritchett *et al.*, 1991, Tyler, 1999), pelo que seria normal que os vitelos nascidos de vacas primíparas tivessem níveis de proteínas séricas totais mais baixos, facto que não se verificou neste estudo ( $p > 0,05$ ). Assim sendo, não foram encontradas diferenças significativas entre vitelos nascidos de vacas primíparas ou de múltiparas no que concerne a eficácia na transmissão da imunidade passiva avaliada por este método. Não obstante, devemos ter presente que vitelos nascidos de vacas primíparas podiam ter ingerido colostro de múltiparas, uma vez que em algumas explorações, nas quais existia um banco de colostro onde era congelado colostro de vacas múltiparas, que apresenta uma concentração superior de Ig em relação aos das vacas primíparas, administrariam prioritariamente aos vitelos e por falta de registos apropriados não foi possível efetuar a rastreabilidade do colostro administrado a cada vitelo.

Contudo, e como já havia sido descrito (Quigley, 1998, Youngquist, 2007, Godden, 2008), verificou-se uma relação elevada e extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) para o momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro fornecida, sendo que administrar colostro corretamente, fazendo a primeira toma de 2 litros até às 6 horas de vida e voltando a fazer uma segunda toma, também ela de 2 litros, até às 12 horas de vida, influencia os níveis de proteínas séricas totais.

Das três formas de administração de colostro que se tiveram em conta neste estudo, e assumindo que nas explorações B e C mais facilmente ocorreria uma falha de

transferência de imunidade passiva, observou-se que um vitelo que seja encolostrado com menos de 4L até as 24h (C) tem aproximadamente 16 vezes mais probabilidade de não adquirir uma imunização adequada em relação às explorações A. Por outro lado, se for encolostrado com menos de 4L até as 12h (B) a probabilidade de ocorrer então falha de transferência de imunidade passiva diminui em relação à forma de administração C, sendo aproximadamente 6 vezes mais provável que esta aconteça.

Com o objetivo de avaliar corretamente a transferência passiva de imunidade nos vitelos de uma exploração, as proteínas plasmáticas totais deverão ser determinadas em pelo menos 12 vitelos, pelo que se 20% dos vitelos apresentarem valores inferiores a 5,5 g/dL, estar-se-á perante um problema de encolostramento (McGuirk, 2003). A amostra deste estudo, na maioria das explorações, não atinge um total de 12, uma vez que as colheitas foram feitas em deslocamentos de clínica ambulatória e de controlo reprodutivo durante um limitado período de tempo. Neste sentido, os resultados aqui apresentados deverão ser interpretados no âmbito desta amostragem.

De referir, que ao longo deste estudo, não foram avaliados o estado nutricional e sanitário das vacas secas, a duração do período seco, o tipo de manejo geral, o tipo de vacinação a que as vacas foram submetidas, os índices de qualidade do leite, a qualidade do colostro e o nível de produção existente em cada exploração inserida neste estudo, fatores esses que também poderiam influenciar os níveis de proteínas séricas e, conseqüentemente, a transmissão de imunidade passiva. Da mesma forma não se determinou se a estação do ano teria efetivamente influência na transferência de imunidade passiva, visto que o período de tempo em que se realizou este estudo se confinou ao período de Inverno e parte da Primavera.

Alguns vitelos tinham mais de 3 dias de idade, sendo que a partir daí não se torna ideal avaliar se ocorreu transferência imunitária eficiente, pois a concentração de proteínas plasmáticas totais e imunoglobulinas séricas não são apenas consequência da ingestão de colostro e da transferência de imunidade passiva, registando-se um declínio das imunoglobulinas maternas e existência de produção endógena de imunoglobulinas pelo vitelo e alterações na concentração de proteína sérica de acordo com a dieta (Quigley, 2000).

## **1.7. Conclusão**

Das três variáveis objeto de estudo, somente o momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro fornecida influenciou o nível de proteínas séricas no decorrer da primeira semana de vida ( $p < 0,001$ ), sendo que o sexo dos vitelos e a paridade das mães não influenciaram os valores de proteínas plasmáticas totais, de forma a serem considerados como variáveis influentes.

Constata-se a necessidade de uma adequada sensibilização e formação técnica dos responsáveis das explorações leiteiras, visando melhorar o manejo do colostro nos vitelos recém-nascidos, bem como, incentivar a administração de colostro nas quantidades consideradas ótimas e no intervalo de tempo em que o vitelo obterá uma melhor eficiência da transmissão das imunoglobulinas fundamentais para um adequado estado imunitário do vitelo.

## **2. Determinação da prevalência dos principais agentes causadores de diarreias neonatais e fatores de risco associados à administração de colostro**

### **2.1. Resumo**

A diarreia neonatal, além de ser uma das afeções mais comuns em vitelos até aos 3 meses, é uma doença multifatorial, que acarreta transtornos económicos e implicações relativas com o bem-estar animal nas explorações leiteiras. Este estudo foi efetuado com o objetivo de complementar o estudo anteriormente mencionado nesta dissertação, que se referia fundamentalmente à avaliação da transmissão de imunidade passiva em vitelos de leite. Pretendeu-se não só determinar a frequência de isolamentos dos principais agentes infecciosos presentes nas diarreias neonatais em vitelos, como também avaliar a influência da adequada transmissão de imunidade passiva na ocorrência de diarreias. A maior prevalência registada foi para o Rotavírus de 60,7%, sendo este o agente mais isolado, contrariamente ao Coronavírus ( $pa=3,6\%$  e  $n=1$ ). A tendência foi para ocorrerem mais infeções simples (64% e  $n=14$ ) do que infeções mistas (36% e

n=8). Dentro das infecções mistas, registou-se mais vezes casos de associação entre dois agentes (50%), sendo que a associação mais comum verificada foi o Rotavírus com a *E. coli*. Adicionalmente, concluiu-se que o “momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro fornecida” e a “forma de administração de colostro” influenciaram o nível de proteínas plasmáticas no decorrer da primeira semana de vida dos vitelos ( $p < 0.001$  e  $p \leq 0,01$ , respetivamente). Torna-se então fundamental informar e incentivar os produtores, para que seja feito um encolostramento de forma adequada.

## 2.2. Introdução

Uma inadequada administração de colostro ou absorção deficiente por parte de animais recém-nascidos está relacionado com o aparecimento de septicémias, enterites (diarreias) e pneumonias, sendo que atualmente os principais agentes infecciosos envolvidos em diarreias neonatais podem ser bactérias (*Escherichia coli*), vírus (Rotavírus, Coronavírus) e parasitas (*Cryptosporidium parvum*) (Naylor, 2009; Foster & Smith, 2009).

Colostro define-se como a secreção densa, resultante da primeira ordenha logo após o parto (Wattiaux, 2001). Para além de nutrientes contém leucócitos maternos, fatores de crescimento, hormonas, citoquinas, fatores antimicrobianos não-específicos e Imunoglobulinas (Ig), sendo que a IgG1 (80%) é o isótipo predominante no colostro, encontram-se ainda presentes IgG2 (5% a 10%), IgA (5 a 7%) e IgM (5%) (Butler, 1973). A concentração e o volume de Imunoglobulinas no colostro são influenciados por diversos fatores, tais como: vacinação e nutrição no decorrer do período seco, tempo de duração do período seco, número de lactação e raça da vaca (Quigley, 1998, Godden, 2008).

A identificação de agentes etiológicos, envolvidos nas diarreias neonatais nas explorações leiteiras, pode ajudar a perceber se as diarreias são consequência de fatores relativos do manejo nas explorações, visto que uma adequada transferência de anticorpos maternos no colostro e realização de vacinação no período seco podem excluir a hipótese de manejo incorreto. Contudo, é necessário realizar sempre uma correta administração de colostro, visto que os vitelos adquirem uma adequada TIP através da ingestão e absorção das imunoglobulinas presentes na sua composição (Godden, 2008).

Para os animais de aptidão leiteira está aconselhada a ingestão de pelo menos 100 g de imunoglobulinas por vitelo a cada toma, sendo a administração de colostro

realizada em duas tomas. A primeira deverá ser efetuada com a maior brevidade possível, até às seis horas de vida, numa quantidade mínima de 2 litros e a segunda até as 12 horas de vida, com a mesma quantidade da primeira (Quigley, 1997).

### **2.3. Objetivos**

Os objetivos deste estudo foram:

1. Determinar a frequência de identificação dos principais agentes infecciosos responsáveis por diarreia neonatal em 15 explorações de bovinos de leite situadas na região Litoral norte de Portugal.

2. Avaliar a influência da adequada transmissão de imunidade passiva na ocorrência de diarreias.

3. Avaliar o efeito do momento da realização da ordenha do colostro, forma de administração do colostro, a quantidade e o momento de administração de colostro, existência ou ausência de banco de colostro e a forma de armazenamento do colostro na eficácia da transmissão de imunidade passiva.

### **2.4. Materiais e métodos**

#### **2.4.1 Estudo de campo**

Foram realizadas colheitas de fezes em vitelos com diarreia (n=28), que não tinham sido tratados com qualquer fármaco e com início de sintomatologia clínica há menos de 48 horas. Os animais tinham entre 1 e 30 dias e eram provenientes de 15 explorações diferentes situadas na região Litoral norte de Portugal (n=15).

Imediatamente a seguir à colheita das fezes, foi utilizado um teste comercial de imunocromatografia de fluxo (Tetrastrips® - BioX Diagnostics) que permitem a identificação dos principais agentes infecciosos de diarreias neonatais (Rotavírus, Coronavírus, *Escheria coli* e *Cryptosporidium parvum*) (Imagem 7). Os dados relativos à sensibilidade e especificidade serão referidos no capítulo de diagnóstico laboratorial.

Além disso, foram realizadas colheitas de amostras de sangue venoso (n=49) a animais da exploração que não apresentavam sintomatologia clínica de diarreia, com o objetivo de medir as proteínas séricas totais. Este critério foi tido em conta porque a diarreia faz-se acompanhar de desidratação, contribuindo assim para um aumento do valor real das PT séricas.



Imagem 7 - Teste TETRASTRIPS BIO K 156

#### 2.4.2. Questionário

Utilizando a informação proveniente do questionário epidemiológico (ver Anexo II) realizado no estudo anterior, obtiveram-se dados sobre os procedimentos normais de manejo do colostro nas explorações leiteiras em questão, tais como o momento da realização da ordenha do colostro, a forma de administração do colostro, a quantidade e o momento de administração de colostro, existência ou ausência de banco de colostro e a forma de armazenamento do colostro.

#### 2.4.3. Colheita e processamento das amostras

As colheitas de fezes foram realizadas em diferentes vitelos nas 15 explorações, através de estimulação rectal, sendo recolhida uma pequena amostra das mesmas com a ajuda de uma colher pertencente ao *kit* de diagnóstico utilizado. De acordo com as instruções do teste, era recolhida uma colher cheia, procedendo-se de seguida à diluição no soluto tampão do *kit* (Imagem 9). A amostra era posteriormente acondicionada e homogeneizada através de movimentos circulares do recipiente do *kit* (Imagem 8).



**Imagem 9 - Colheita de amostra de fezes, consoante as indicações do fabricante para colheita (BioX Diagnostics, 2015)**



**Imagem 8 – Acondicionamento correto, consoante as indicações do fabricante para processamento das amostras (BioX Diagnostics, 2015)**

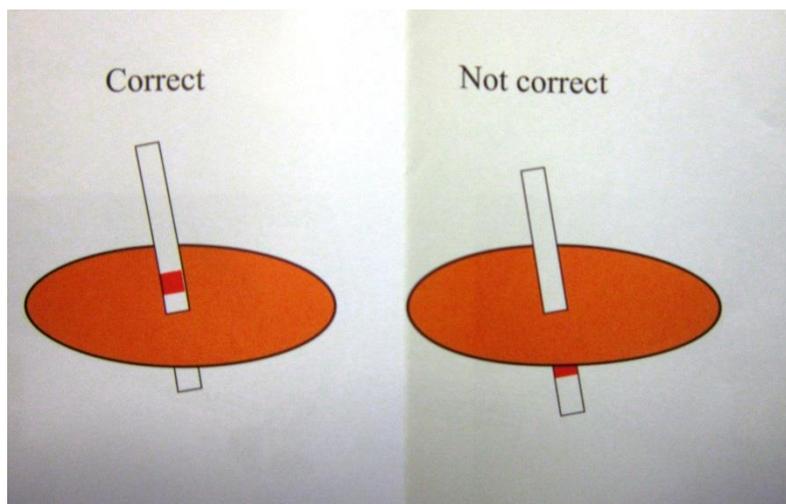
#### 2.4.4. Diagnóstico laboratorial

Para identificação dos agentes etiológicos envolvidos nos animais detetados com diarreia, foi usado um teste de imunocromatografia de fluxo (TETRASTRIPS BIO K 156), do Laboratório BioX Diagnostics. A sensibilidade e especificidade deste teste estão descritas na Tabela 6.

<b>Agentes</b>	<b>Especificidade (%)</b>	<b>Sensibilidade (%)</b>
Rotavírus	100	96
Coronavirus	97,4	63,6
<i>E. coli</i>	94,4	82,6
<i>Cryptosporidium</i>	95,5	94,1

**Tabela 6 - Especificações do teste (BioX Diagnostics, 2015)**

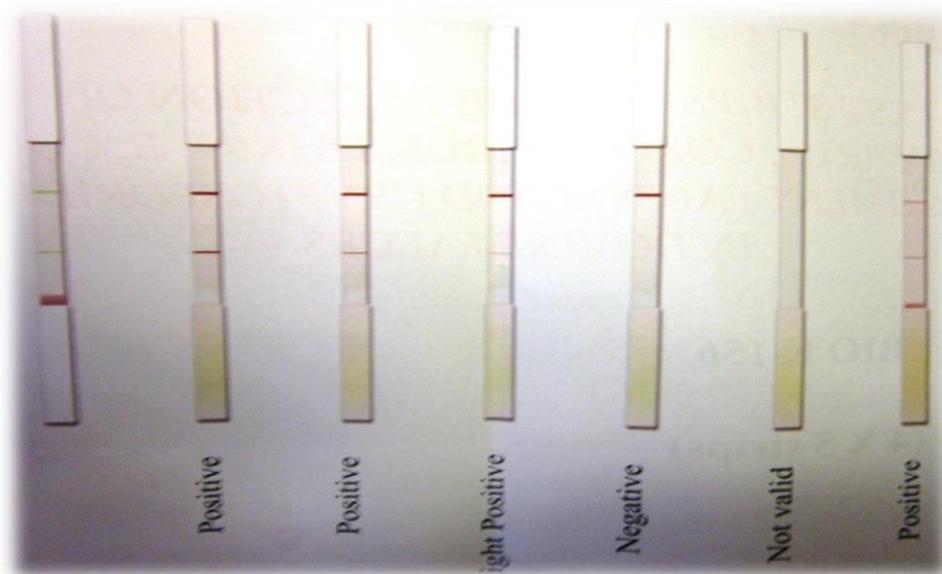
Este teste é usado para pesquisa de antigénios, sendo que cada *kit* possui 4 tiras, uma para cada agente a pesquisar (rotavírus, coronavírus, *E. coli* F5 e *Cryptosporidium* spp.) e um recipiente com um tampão de diluição. Após homogeneizar a solução tampão com as fezes recolhidas, introduziram-se as 4 tiras simultaneamente no recipiente do teste e com as setas voltadas para baixo e esperou-se pelo menos 10 minutos pela validação dos testes para se observar corretamente o resultado nas tiras (positivo ou negativo).



**Imagem 10 – Metodologia de introdução das tiras para diagnóstico (BioX Diagnostics, 2015)**

Para que o reagente funcionasse corretamente a linha vermelha da tira nunca foi submersa no tampão (Imagem 10). Para que isso não acontecesse, as quantidades de amostra colhidas (uma colher) foram respeitadas e evitou-se a excessiva homogeneização para não se formar espuma no interior do recipiente do teste.

A interpretação dos resultados foi realizada seguindo a chave disponibilizada pelo fabricante (Imagem 11).



**Imagem 11 - Chave fornecida pelo fabricante (BioX Diagnostics, 2015)**

Para validar o teste, é necessário que apareça sempre uma linha vermelha superior, denominada linha de controlo. Analisando a imagem 11, conclui-se que a presença de

duas linhas indica uma amostra positiva, por outro lado quando aparece apenas uma linha que a amostra é negativa, uma vez que só exibe a linha de controle.

#### **2.4.5. Definição das variáveis**

Foram definidos como vitelos com absorção de imunidade passiva adequada todos os vitelos com proteínas séricas superiores ou iguais a 5,5g/dL, Todos os vitelos com valores de proteínas séricas inferiores a 5,5g/dL foram definidos como tendo falha de transferência de imunidade passiva.

Como explorações consideradas como tendo administração adequada de colostro (exploração A) consideraram-se as explorações em que a primeira toma de 2 litros colostro era feita até às 6 horas de vida, sendo administrados mais dois litros até as 12 horas de vida. As explorações foram consideradas como tendo uma administração inadequada quando se administrava menos de 4 litros até às 12 horas (exploração B) ou até às 24 horas de vida (exploração C).

Na variável “momento da realização da ordenha do colostro” foram criados quatro grupos que correspondiam a tempos de realização de ordenha diferentes, sendo que o primeiro grupo (exploração A) correspondia a ordenhas de colostro realizadas antes das duas horas pós-parto, o segundo grupo (exploração B) destinava-se ordenhas efetuadas entre as duas e as seis horas pós-parto, o terceiro grupo (exploração C) correspondia a ordenhas praticadas entre as seis e as 12 horas pós-parto e por fim o quarto grupo (exploração D) destinava-se a ordenhas executadas após as 12 horas pós-parto.

Na variável “forma de administração do colostro” separaram-se as explorações consoante as diferentes formas como o colostro era administrado, tendo em conta se recorriam a alimentação de forma natural, mais precisamente direto do úbere da mãe (exploração A), se utilizavam um balde (exploração B), uma tetina (exploração C), uma sonda esofágica (exploração D) ou um biberão (exploração E).

Quanto à variável “existência ou ausência de banco de colostro”, separaram-se explorações que possuíam banco de colostro (exploração A) ou não (exploração B).

Por fim, na variável “forma de armazenamento do colostro” criaram-se grupos para as diferentes formas como as explorações inseridas no estudo armazenavam o colostro, sendo que poderiam refrigerar (exploração A), congelar (exploração B), ambas as formas (exploração C) ou não armazenar o colostro (exploração D).

#### **2.4.6. Ensaio estatístico**

Utilizando os dados resultantes do ensaio experimental, foi elaborada uma análise de frequências com recurso ao programa Microsoft Excel, sendo que os mesmos dados foram utilizados para uma posterior análise univariada através do modelo linear geral do programa R<sup>®</sup> (The R Foundation for Statistical Computing, 2013), de forma a determinar se o momento da realização da ordenha do colostro, a forma de administração do colostro, a quantidade e o momento de administração de colostro, existência ou ausência de banco de colostro e a forma de armazenamento do colostro poderiam ser fatores de risco para o aparecimento de diarreias neonatais.

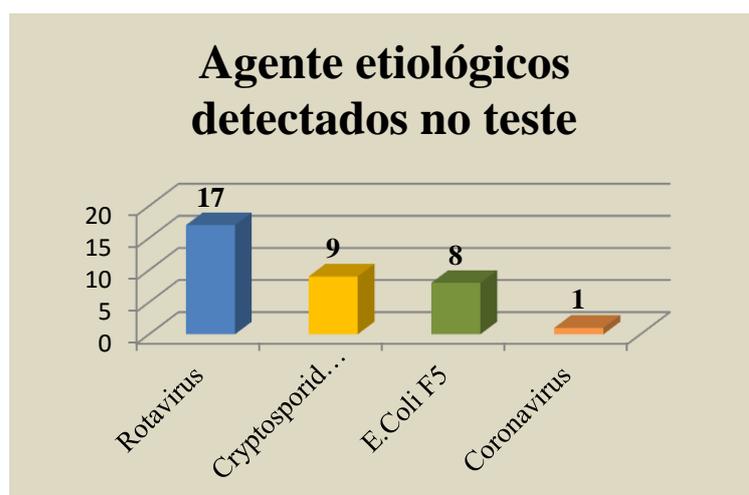
Posteriormente, procedeu-se à criação de tabelas de contingência, nas quais foi cruzado o nível de transferência de imunidade passiva ( $TIP < 5,5$  e  $TIP \geq 5,5$ ) com as variáveis que se pretendiam testar, anteriormente mencionadas. Para testar a significância da associação entre as variáveis, procedeu-se à utilização do teste exato de Fisher. No caso de se verificar associação estatisticamente significativa (observada pela significância do teste exato de Fisher) em tabelas de contingência entre variáveis com mais de duas categorias, procedeu-se à utilização de testes *post-hoc* para averiguar quais as categorias nas quais existe uma associação significativa. Os resultados foram considerados significativos para um intervalo de confiança de 95% e para um valor de  $p < 0,05$ .

### **2.5. Resultados**

#### **2.5.1. Frequência dos agentes etiológicos**

Dos 28 testes comerciais de imunocromatografia de fluxo utilizados neste estudo experimental, 22 deles apresentaram resultado positivo para a presença dos agentes infecciosos em estudo.

Relativamente à prevalência dos 4 agentes etiológicos, esta foi estimada recorrendo ao programa EpiR, sendo determinada a prevalência aparente ( $pa$ ) e a prevalência real ( $pr$ ), observou-se que o Rotavírus foi o agente mais frequentemente detetado nas fezes ( $pa=60,7\%$  e  $n=17$ ), seguindo-se o *Cryptosporidium* ( $pa=32,1\%$  e  $n=9$ ) e a *Escherichia coli* ( $pa=28,6\%$  e  $n=8$ ). O agente menos frequentemente presente nas fezes foi o Coronavírus ( $pa=3,6\%$  e  $n=1$ ), sendo somente detetado numa amostra (Gráfico 8 e Tabela 7).



**Gráfico 8 – Frequência dos quatro agentes etiológicos pesquisados no teste (FR,% n=35)**

Como o meio de diagnóstico utilizado neste estudo não é um método de identificação de agentes etiológicos com 100% de especificidade (nem todos os animais positivos são de facto positivos) nem de sensibilidade (nem todos os negativos são de facto negativos), deverá ser feito um ajustamento aquando o cálculo da prevalência, tendo em conta os valores de sensibilidade e especificidade fornecidos pelo fabricante do teste, já anteriormente referenciados (Tabela 6).

Desse modo, estimou-se a prevalência real na população, com base nos resultados da testagem efetuada (Tabela 7). A prevalência aparente indica os resultados da aplicação do teste, sendo que a prevalência real é função dos resultados do exame de referência.

<b>Agentes</b>	<b>Prevalência aparente (%)</b>	<b>Prevalência real (%)</b>
Rotavírus	60,7	51,1
Coronavírus	3,6	60,3
<i>E. coli</i>	28,6	53,2
<i>Cryptosporidium</i>	32,1	50,3

**Tabela 7 - Prevalência aparente e Prevalência real do teste feito (FR,% n=22)**

Aproximadamente 64% dos resultados positivos (n=14) corresponderam a infecções simples. Nos restantes 8 testes realizados foram identificados mais que um agente em simultâneo (Gráfico 9).

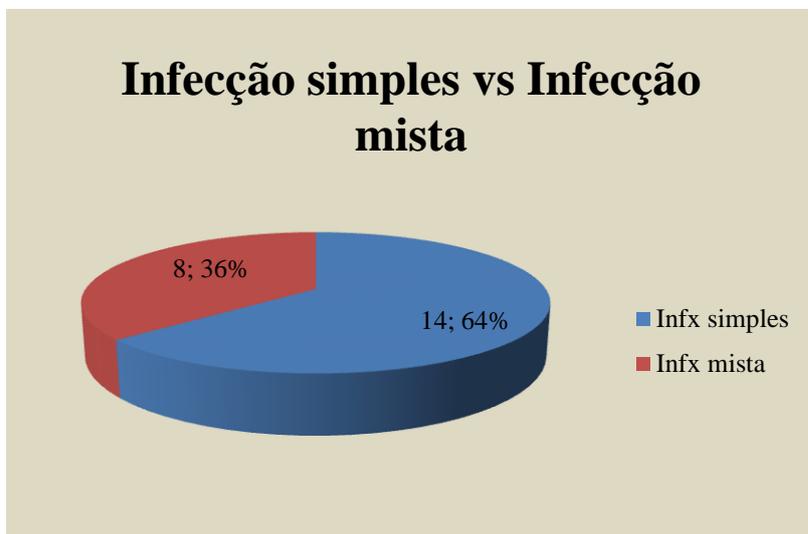


Gráfico 9 - Frequências relativas a infecção simples e infecção mista

Dentro das infecções mistas, verificou-se que 50 % deste tipo de infecções (n=4) deveram-se a associações entre dois agentes, sendo portanto mais comum serem identificados dois agentes em simultâneo do que serem identificados três (n=3) ou até os 4 ao mesmo tempo (n=1) (Gráfico 10).



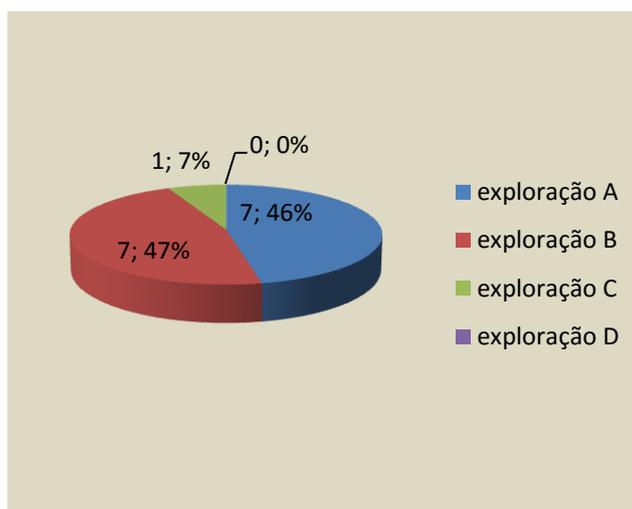
Gráfico 10 - Frequência de associação dos agentes nas infecções mistas

No que toca às associações mais comuns, concluiu-se que 50 % das infeções mistas resultaram da interação entre Rotavírus e *Escherichia coli* (n=4), seguindo-se a associação Rotavírus, *E.coli* e *Cryptosporidium* spp. com 37,5 % (n=3). Por último, somente se registou uma associação que envolvia os 4 agentes em simultâneo.

De realçar que o Coronavírus não foi identificado em infeção simples, sendo somente detetado numa infeção mista, a qual envolvia os 4 agentes em simultâneo.

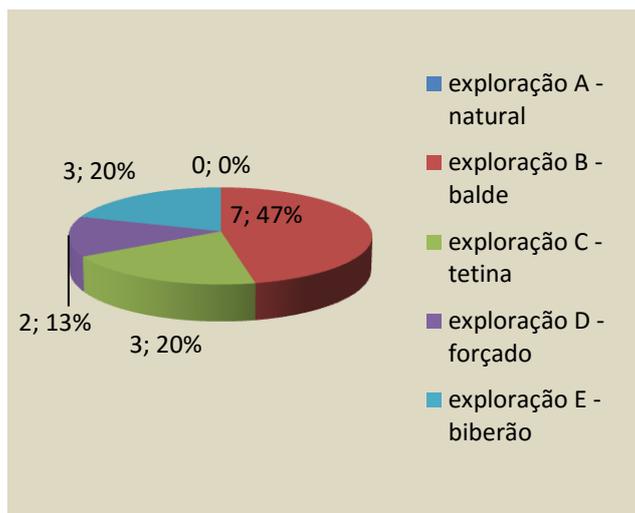
### 2.5.2. Colostro

Das 15 explorações inseridas neste estudo, registou-se que 46% realizava a ordenha do colostro nas primeiras duas horas após a vaca parir (exploração A), 47% efetuava entre as duas e as seis horas pós-parto (exploração B) e somente 7% entre as seis e as 12 horas após o parto (exploração C). Não foram efetuados registos para explorações que efetuavam ordenha do colostro além das 12 horas pós-parto (Gráfico 11).



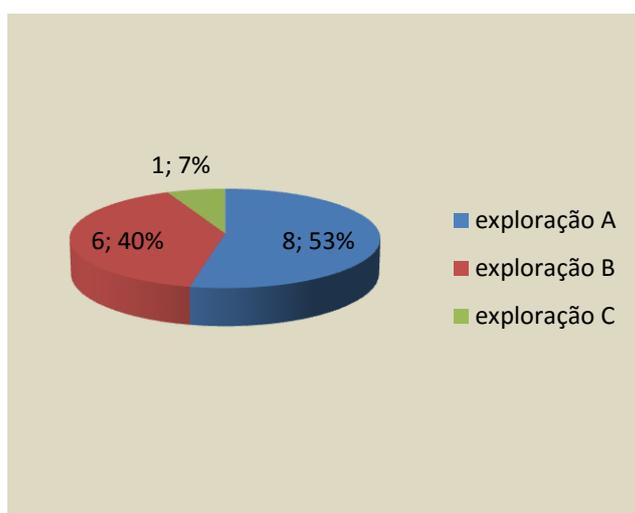
**Gráfico 11 - Distribuição das explorações por momento da realização da ordenha do colostro (FR, % n=15)**

Verificou-se que em nenhuma das explorações o vitelo ingere o colostro diretamente do ubere da mãe (exploração A), sendo que 47% das explorações administra o colostro com ajuda de um balde (exploração B), 20% utiliza tetina (exploração C), 13% recorre a sonda esofágica (exploração D) e 20% usa o biberão (exploração E) (Gráfico 12).



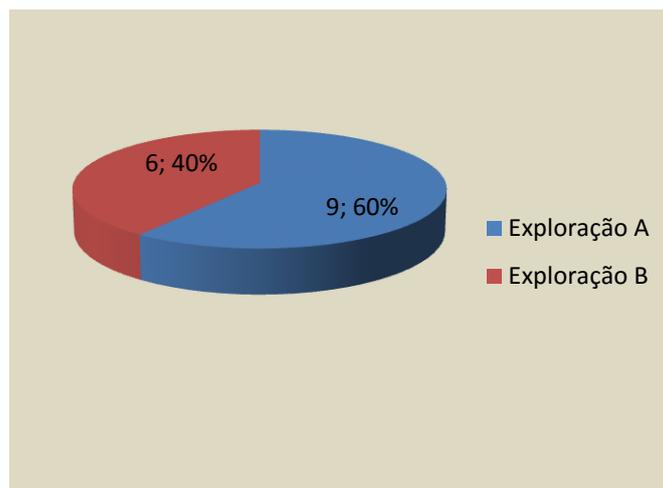
**Gráfico 12 - Distribuição das explorações pela forma de administração do colostro (Fr, % n= 15)**

No que se refere às 15 explorações inseridas neste estudo, observou-se que 53% delas administra uma primeira toma de dois litros de colostro até às seis horas de vida e uma segunda toma, também nas mesmas quantidades até às 12 horas de vida (exploração A). Em seguida, as explorações B que administram menos de quatro litros de colostro até às 12 horas de vida (45%) e por fim 7% das explorações administram uma escassa quantidade de colostro, inferior a quatro litros, até as 24 horas de vida do vitelo (exploração B) (Gráfico 13).



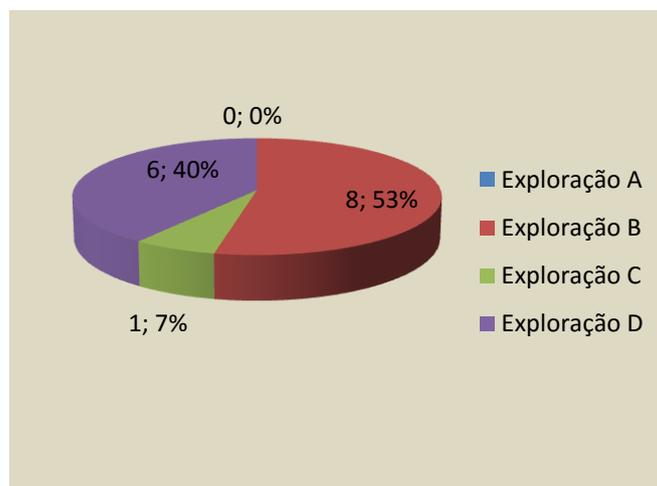
**Gráfico 13 - Distribuição das explorações pela quantidade e o momento de administração de colostro (FR, % n=15)**

Concluiu-se que 60% das explorações armazena o colostro (exploração A) e os restantes 40% não armazena (exploração B) (Gráfico 14).



**Gráfico 14 - Distribuição das explorações pela existência ou ausência de banco de colostro (Fr,% n= 15)**

Dentro das explorações que armazenam colostro, nenhuma delas só refrigera colostro (exploração A), 53% congela (exploração B) e 7% ora congela, ora refrigera (exploração C) (Gráfico 15).



**Gráfico 15 - Distribuição das explorações pela forma de armazenamento do colostro (FR, % n=15)**

A distribuição da amostra consoante as variáveis que se pretendiam avaliar na eficácia da transmissão da imunidade passiva, segue em seguida num quadro-resumo (Tabela 8).

		<b>TIP</b>		
			Falha (<5,5 g/dL)	Adequada (≥5,5 g/dL)
<b>Ordenha do colostro</b>	Exploração A	FA	8	10
		FR, %	44,40%	55,60%
	Exploração B	FA	18	11
		FR, %	62,10%	37,90%
	Exploração C	FA	2	0
		FR, %	100,00%	0,00%
<b>Quantidade e o momento de administração do colostro</b>	Exploração A	FA	11	18
		FR, %	40,60%	59,40%
	Exploração B	FA	12	3
		FR, %	80,00%	20,00%
	Exploração C	FA	5	0
		FR, %	91,70%	8,30%
<b>Forma de administração do colostro</b>	Exploração B	FA	12	2
		FR, %	85,70%	14,30%
	Exploração C	FA	4	9
		FR, %	30,80%	69,20%
	Exploração D	FA	2	6
		FR, %	25%	75%
Exploração E	FA	10	4	
	FR, %	71,40%	28,60%	
<b>Banco de Colostro</b>	Exploração A	FA	17	13
		FR, %	56,70%	43,30%
	Exploração B	FA	11	8
		FR, %	57,90%	42,10%
<b>Forma de armazenamento do colostro</b>	Exploração B	FA	8	10
		FR, %	44,40%	55,60%
	Exploração C	FA	9	3
		FR, %	75%	25%
	Exploração D	FA	11	8
		FR, %	57,90%	42,10%

**Tabela 8 - Quadro-resumo da distribuição das amostras pelas variáveis que se pretendiam avaliar na eficácia da transferência de imunidade passiva (TIP)**

Pela realização do teste exato de Fisher, não se verificaram diferenças significativas na eficácia da transmissão da imunidade passiva em função do momento da realização da ordenha do colostro ( $p=.234$ ), da existência ou ausência de banco de colostro ( $p>0,999$ ) e da forma de armazenamento do colostro ( $p=.269$ ). A quantidade e

momento de administração do colostro ( $p < 0,001$ ) e a forma de administração do colostro ( $p \leq 0,01$ ) influenciaram significativamente a eficácia da transferência de imunidade passiva (Tabela 9).

<b>Fatores de risco</b>	<b>p-value</b>
Momento da realização da ordenha do colostro	0,234
Forma de administração de colostro	0,004
Quantidade e momento de administração de colostro	0,001
Existência ou ausência de banco de colostro	$>0,999$
Forma de armazenamento do colostro	0,269

**Tabela 9- Influência dos fatores de risco com o nível de PT**

## 2.6. Discussão

Dos 4 agentes patogénicos causadores de diarreia que podiam ser detetados no teste rápido utilizado, o Rotavírus foi o agente mais isolado ( $pa=60,7\%$  e  $n=17$ ). Pelo contrário, o Coronavírus foi o agente menos isolado ( $pa=3,6\%$  e  $n=1$ ). Nesta parte do estudo, registaram-se mais infeções simples ( $64\%$  e  $n=14$ ) do que infeções mistas ( $36\%$  e  $n=8$ ). Dentro das infeções mistas, foi mais comum ocorrer associação entre dois agentes ( $50\%$ ), sendo que a associação mais comum verificada foi o Rotavírus com a *E.coli*.

A deteção de agentes, recorrendo ao tipo de teste utilizado neste estudo, apresenta limitações. Devido ao facto dos agentes poderem ter padrões de excreção específicos, a deteção com este teste poderá estar condicionada. Por exemplo, o *Cryptosporidium spp.* apresenta uma excreção intermitente, o que pode influenciar o resultado deste teste.

Da amostra em estudo, obtiveram-se 22 resultados positivos para os quatro agentes inseridos neste teste rápido, sendo que 6 apresentaram resultados negativos. Isto pode dever-se a outros agentes etiológicos envolvidos ou então falha do teste (falsos negativos).

Os imunoenaios cromatográficos de fluxo vertical cada vez mais se tornam o “gold standard” para este tipo de diagnósticos devido à sua simplicidade, rapidez, sensibilidade e especificidade (BioX Diagnostics, 2015). O protocolo utilizado foi o fornecido pelo fabricante do *kit*.

O tempo dentro da qual se executa a primeira ordenha pós-parto é um fator importante na transmissão de imunidade passiva, uma vez que a concentração de Ig no leite diminui mesmo que a vaca não seja ordenhada. O ideal seria que a ordenha fosse feita 1 a 2 horas após o parto, até no máximo nas 6 horas seguintes. Segundo Besser & Gay, até às 8 horas após o parto, a concentração deverá ser suficiente para garantir um nível adequado de transmissão de imunidade passiva (Besser & Gay, 1999).

Neste estudo, a análise do teste exato de Fisher revelou que não existe uma associação significativa entre o momento de realização da ordenha e a transmissão da imunidade passiva ( $p=.234$ ). Assim, o facto de a ordenha realizar-se em tempos diferentes, isto é, ordenhas de colostro realizadas antes das duas horas pós-parto, ordenhas efetuadas entre as duas e as seis horas pós-parto, ordenhas praticadas entre as seis e as 12 horas pós-parto e por fim ordenhas executadas após as 12 horas pós-parto, parece não alterar a qualidade do colostro, isto é, fazer variar o nível de Imunoglobulinas presentes e então condicionar a transferência de imunidade passiva. Assim sendo, a variável “momento da realização da ordenha do colostro” não influencia a eficácia da transferência da imunidade passiva definida pelo valor de PT ( $p>0,05$ ).

A administração de colostro através de balde além de não ser um método adequado, uma vez que está associado à ocorrência de falsos trajetos (Radostits *et al.*, 2007), também requer paciência por parte de quem administra e também pode originar desperdícios de colostro. Num estudo citado por Corke (2010) em que foram comparados os métodos de administração de colostro através de biberão e de entubação esofágica (forçado) concluiu-se que ambos os métodos atingiam taxas de 100% de eficácia na transferência de imunidade passiva quando eram administrados 3 litros. Quando eram administrados 1,5 litros atingiram-se taxas de 100% pelo método do biberão e de 41,7% através da entubação esofágica. Esta diminuição de eficácia através deste último método foi atribuída à não estimulação da goteira esofágica e ao conseqüente aprisionamento do colostro no retículo-rúmen, sendo por isso um efeito dependente do volume administrado. A tetina, talvez por ser um método que simula mais a forma natural dos vitelos se alimentarem quando estão perante as suas mães,

pode ser um método eficaz na transmissão de imunidade passiva, tal e qual como se concluiu neste estudo.

No que toca à forma de administração do colostro, através da análise do teste exato de Fisher, foi possível observar a existência de uma associação estatisticamente significativa entre a forma de administração de colostro e a transmissão de imunidade passiva ( $p \leq 0,01$ ). Visto que este efeito de significância é geral, procedeu-se de seguida a uma análise post-hoc de modo a averiguar quais as categorias que contribuem significativamente para o tipo de transmissão. Para este propósito, de forma a corrigir para as múltiplas comparações conduzidas (controlo para erro tipo I – a probabilidade da rejeição da hipótese nula aumenta com o número de comparações efetuado), foi efetuada uma correção de Bonferroni ao valor de p. Assim, o valor considerado para o número de comparações efetuado foi de  $p = 0,013$  ( $0,05/4$ ).

De modo a averiguar que formas de administração contribuíam significativamente para o tipo de imunização ( $PT < 5,5$  ou  $PT \geq 5,5$ ) foram estimados os resíduos ajustados estandardizados para cada célula. Cada um destes valores foi elevado ao quadrado, de modo a que seguissem uma distribuição aproximada à distribuição de qui-quadrado. Por último, foi verificada a significância (valor de p) para cada um destes valores e se esta se situava abaixo da significância ajustada para o número de comparações.

Verificou-se que as formas de administração “tetina” ( $p = 0,025$ ) e “forçado” ( $p = 0,046$ ) estavam associadas com uma correta transmissão de imunidade passiva. No entanto, estas associações perdem significância estatística, quando ajustada para comparações múltiplas (ambas estão acima do valor calculado de  $p = 0,013$ ). Por outro lado, a administração por balde apresentou uma associação significativa com a falha na transmissão de imunidade passiva ( $p = 0,011$ ), com este resultado a manter-se significativo após o ajuste para comparações múltiplas. A administração por biberão não apresentou significado estatístico ( $p = 0,194$ ) visto que nem sequer estava abaixo da significância não ajustada ( $p < 0,05$ ).

Tal como no estudo anterior, verificou-se que existe uma associação significativa entre o nível de transmissão passiva (PT) e a quantidade e momento de administração de colostro, o que cimenta a ideia de que as explorações deveriam realizar sempre o encolostramento de forma correta, de forma a prevenir futuros prejuízos económicos na recria ( $p \leq 0,001$ ).

A forma como o colostro é armazenado torna-se também num ponto crítico para aferir a transmissão de imunidade passiva, uma vez que condições de refrigeração

deficitárias podem contribuir para crescimento bacteriano e por em causa a saúde dos vitelos que ingerem esse colostro. No entanto, a forma como as explorações processam o colostro depois de ordenhado não mostrou influenciar significativamente a eficácia da transferência de imunidade passiva ( $p>0,05$ ), uma vez que a análise do teste exato de Fisher revelou que não existe uma associação significativa entre a existência ou ausência de banco de colostro e uma eficiente transferência de imunidade passiva ( $p>0,999$ ) e também entre a forma de armazenamento do colostro e a transmissão de imunidade passiva ( $p=.269$ ).

## 2.7. Conclusão

Dos quatro principais agentes envolvidos nas diarreias neonatais, neste estudo a maior prevalência registada foi para o Rotavírus nas fezes ( $pa= 60,7\%$ ) seguindo-se a do *Cryptosporidium*, da *Escherichia coli* ( $pa=28,6\%$ ) e do Coronavírus ( $pa= 3,6\%$ ), por ordem decrescente.

Das cinco variáveis objeto de estudo, quer o “momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro fornecida”, quer a “forma de administração de colostro” influenciaram o nível de proteínas plasmáticas no decorrer da primeira semana de vida ( $p<0,001$  e  $p\leq 0,01$ , respetivamente), sendo que o “momento da realização da ordenha do colostro”, a “existência ou ausência de banco de colostro” e a “forma de armazenamento do colostro” não influenciaram os valores de proteínas plasmáticas totais, de forma a serem considerados como variáveis influentes.

Cada vez mais, torna-se necessário incentivar e instruir os produtores a não descuidarem o maneo do colostro, para que no futuro não tenham prejuízos económicos na recria devido a realização incorreta de encolostramento.

## 3. Conclusão geral

Cada vez mais, o tema bem-estar animal tem sido debatido, com vista a que se melhorem as condições dos animais de espécies pecuárias, evitando perdas económicas exageradas para as explorações, das quais fazem parte. As condições de maneo existentes antes e após o parto são pontos críticos para que os vitelos iniciem o seu crescimento de forma normal, sem atrasos, sendo que outros fatores também podem influenciar negativamente a transferência de imunidade passiva.

Com base no estudos estatístico presente nesta dissertação, pode afirmar-se que o manejo do colostro efetuado nas explorações, mais precisamente o momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro fornecida, torna-se num fator crítico para a imunização passiva dos vitelos.

Por outro lado, a identificação de agentes etiológicos causadores de doença no período neonatal, pode ajudar não só na criação de planos prevenção e controlo dessas doenças, como também na implementação de práticas de manejo dos vitelos, com vista a redução de fatores de risco.

É necessário fazer ver aos produtores, que certas práticas de manejo e biossegurança existentes nas suas explorações não são de todo as mais corretas, sendo necessário identificá-las e corrigi-las, para que a curto e longo prazo não se verifique um efeito negativo nas performances produtivas dos animais.

## IV – Bibliografia

- Autio T, Pohjanvirta T, Holopainen R, Rikula U, Pentikainen J, Huovilaine A, Rusanen H, Soveri T, Sihvonen L & Pelkonen S (2007) Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Veterinary Microbiology*, 119:256-265.
- Bazeley K (2003) Investigation of diarrhoea in the neonatal calf. *Farm Animal Practice*, 25: 152-159.
- Besser TE & Gay, CC (1999) Failure of passive transfer in calves. *The Bovine Proceedings*. 32, pp.170-173.
- BioX Diagnostics (2015) TETRASTRIPS (Rota, Corona, *E. coli* F5, *Cryptosporidium*) BIO K 156. Acedido em Set. 20, 2015. Disponível em [http://www.biox.com/UDTData/13/UDTEnglishDatasheet/TetraStrips%20BIO%20K%20156%20\(E\)%20DS.pdf](http://www.biox.com/UDTData/13/UDTEnglishDatasheet/TetraStrips%20BIO%20K%20156%20(E)%20DS.pdf).
- Blowey RW, & Weaver AD (2003) *Color Atlas of Diseases and Disorders of Cattle*. Second edition. Mosby. EUA. ISBN, pp. 11-22.
- Boileau MJ & Kapil S (2010) Bovine coronavirus associated syndromes. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 26(1):123-46. doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.003.
- Butler JE (1973) Synthesis and distribution of immunoglobulins. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 163:795-798.
- Calloway CD, Tyler JW, Tessman RK, Hostetler D (2002) Comparison of refractometers and test endpoints in the measurement of serum protein concentration to assess passive transfer status in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 221:1605–1608.

- Chen HD & Frankel G (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 29:83–98.
- Chen SC, Tan LB, Huang LM, Chen KT (2012) Rotavirus infection and the current status of rotavirus vaccines. *Journal of the Formosan Medical Association*. 111(4):183-93. doi: 10.1016/j.jfma.2011.09.024.
- Cho YI, Han JI, Wang C, Cooper V, Schwartz K, Engelken T, Yoon KJ (2013) Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Veterinary Microbiology*. 166(3-4):375-85. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.07.001.
- Constable PD (2009) Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatments. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 25(1):101-20, vi. doi: 10.1016/j.cvfa.2008.10.012.
- Corke, MJ (2010) The use of colostrum and colostrum supplements in neonatal calves. *Cattle Practice*, volume 18, part 3, pp.216-218.
- Cortese VS (2009) Neonatal Immunology. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Volume 25, Issue 1, pp.221-227.
- Cortese VS (2009) Neonatal imunology, *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice*;25(1):221-7.
- De la Fuente R, Luzón M, Ruiz-Santa-Quiteria JA, García A, Cid D, Orden JA, García S, Sanz R, Gómez-Bautista M (1999), *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Veterinary Parasitology*, 80: 179-185.
- Estes MK, Greenberg HB (2007) Rotavirus. In: Knipe DM, Holey PM. *Fields Virology*. 6th Edition volume II. Lippincot Williams & Wilkins. pp 1347-1401.
- Fonseca IMSP (2000) Contribuição para o estudo da criptosporidiose animal em Portugal: caracterização genética de isolados de *Cryptosporidium parvum* de origem

- bovina. Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ (2000), Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30: 1305-1322.
- Fayer R (2004), *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126 (1-2): 37–56.
- Fayer R & Xiao L (2007) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Second Edition. CRC Press. pp 13.
- Fecteau G, Fairbrother JM, Higgins R, Van Metre DC, Paré J, Smith BP, Holmberg CA, Jang S (2001) Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from the blood of bacteremic neonatal calves. *Veterinary Microbiology*, 78: 241-249.
- Foster DM & Smith GW (2009) Pathophysiology of diarrhea in calves. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 25(1):13-36, xi. doi: 10.1016/j.cvfa.2008.10.013.
- Godden S (2008) Colostrum Management for Dairy Calves, *Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice*. 24:19–39.
- Hunt E (1999) Neonatal Disease and Disease Management. In: Howard & Smith, *Current Veterinary Therapy 4: Food Animal Practice*, pp. 51-62.
- Igwebuike UM (2006) “Trophoblast cells of ruminant placentas - A mini review” *Animal Reproduction Science*. 93, pp.185-198.
- Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health (2013), Virulence Factors of enterotoxigenic *E.coli*. Acedido em Jun. 5, 2013. Disponível em <http://ocw.jhsph.edu/index.cfm/go/imageLib:il.search.imageDetails/resourceID/439518CF-0215-70E1-90802B07B89E688D/searchString/escherichia%20coli/>

- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2:123–140.
- Kolenda R, Burdukiewicz M, Schierack P (2015) A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 5: 23. doi: 10.3389/fcimb.2015.00023.
- Korsman SNJ, van Zyl GU, Nutt L, Andersson MI, Preiser W (2014) *Virologia*. 1ª Edição. Rio de Janeiro.
- Mainil J (2013) *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 152: 2– 12.
- Maunsell F, & Donovan GA (2008) Biosecurity and risk management for dairy replacements. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 24(1):155-90. doi: 10.1016/j.cvfa.2007.10.007.
- McGuirk SM (2003) Solving Calf Morbidity and Mortality Problems. American Association of Bovine Practitioners. Preconvention Seminar 7: Dairy Herd Problem Investigation Strategies 36<sup>th</sup> Annual Conference.
- McGuirk SM & Collins M (2004) Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20:593-603.
- McGuirk SM (2008) Disease management of dairy calves and heifers. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 24(1):139-53. doi: 10.1016/j.cvfa.2007.10.003.
- Mee JF (2004) Managing the dairy cow at calving time. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 20: 521-546.

- Mee JF (2008) Newborn dairy calf management. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 24: 1-17.
- Millet JK, Whittaker GR (2014) Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research*. 202:120-34. doi: 10.1016/j.virusres.2014.11.021.
- Mora LM, Bautista & Vázquez FA (2002) *Parasitología Veterinaria: Parasitosis del aparato digestivo. Criptosporidiosis*. Cordero del Campillo M, Vazquez FA, Fernandez AR, Acedo MC, Rodriguez SH, Cozar, IN, Baños PD, Romero, HQ, Varela HC. Madrid: eMcGRAW-HILL Interamericana. pp. 213-221.
- Morrill KM, Conrad E, Polo J, Lago A, Campbell J, Quigley J, Tyler H (2012) Estimate of colostral immunoglobulin G concentration using refractometry or with caprylic acid fractionation. *Journal of Dairy Science*. 95(7):3987-96.
- Muktar Y, Mamo G, Tesfaye B, Belina D (2015) A review on major bacterial causes of calf diarrhea and its diagnostic method. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*. Vol.7(5). pp. 173-185, DOI: 10.5897/JVMAH2014. 0351.
- Nagy B & Fekete PZ (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*. 295: 443–454.
- Nagy B, Tóth I & Fekete PZ (2005) *Microbial Ecology in Growing Animals*. ed. Holzapfel WH, Naughton PJ. Elsevier. ISBN, pp. 157-190.
- Naylor J (2009) Neonatal Calf Diarrhea. *Food Animal Practice* fifth edition. pp. 70-77.
- O’Handley RM, Cockwill C, McAllister TA (1999) Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 214(3):391–6.
- Ortiz-Pelaez A, Pritchard DG, Pfeiffer DU, Jones E, Honeyman P, Mawdsley JJ (2008) Calf mortality as a welfare indicator on British cattle farms. 176: 177-81.

- Pritchett LC, Besser TE & Gay CC (1991) Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 74:2336–2341. Também citado por em: Youngquist RS., Therlfall WR (2007) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Second Edition. Saunders Elsevier. pp. 336-338.
- Quigley JD (1997) Calf Note #02 – Colostrum Feeding – How Much is Enough?, Acedido a Junho, 15, 2013, disponível: <http://www.calfnotes.com>.
- Quigley JD & Drewry, JJ (1998) Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre- and post-calving. *Journal of Dairy Science*. 81:2779-2790.
- Quigley, J. (1998). Calf Note #39 – Using a refractometer. Acedido a Setembro, 20, 2015, disponível em: <http://www.calfnotes.com/pdffiles/CN039.pdf>.
- Quigley, J (2000) Calf Note #62 – Calf Age, Total Protein and FPT in Calves. Acedido a Setembro, 20, 2015, disponível em: <http://www.calfnotes.com/pdffiles/CN062.pdf>.
- Quigley JD (2007) Passive Immunity in Newborn Calves. *WCDS Adv Dairy Tech.*; 19: 247-265.
- Raboisson D, Delor F, Cahuzac E, Gendre C, Sans P, Allaire G (2013) Perinatal, neonatal, and rearing period mortality of dairy calves and replacement heifers in France, *Journal of Dairy Science*. 96:1–12.
- Radostits OM, Gay CC., Hinchcliff KW, Constable PD (2007) *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edition. Philadelphia. Elsevier. pp. 127-171.
- Roy JHB (1990) *The Calf*. Volume 1. Management of Health. Butterworths, Boston, MA. Também citado por: Quigley J (2007) Passive Immunity in Newborn Calves. *WCDS Adv Dairy Tech*. 19: 247-265.

- Sahl JW, Morris CR, & Rasko DA (2013) *Escherichia Coli - Pathotypes and Principles of Pathogenesis*. Second Edition. ed. Donnenberg M. Academic Press. Boston. pp. 21-43.
- Scott PR, Hall GA, Jones PW, Morgan JH (2004) *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. Second edition. ed. Andrews AH, R.W. Blowey RW, Boyd H, Eddy RG, Wiley-Blackwell. ISBN, pp. 185-214.
- Selim SA, Cullor JS, Oelsner IE (1995) Passive immunotherapy in neonatal calves-I. Safety and potency of a J5 *Escherichia coli* hyperimmune plasma in neonatal calves. Elsevier Science Ltd. Vol. 13, No. 15: 1449-1453.
- Singh DD, Kumar M, Choudhary PK, Singh HN (2009) Neonatal Calf Mortality. *Intas Polivet*, Vol.10 (II): 165-169.
- Svensson C, Lundborg K, Emanuelson U, Olsson SO (2003) Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Preventive Veterinary Medicine*. 58: 179-197.
- Svensson C, Linder A, Olsson SO (2006) Mortality in Swedish Dairy Calves and Replacement Heifers, *Journal of Dairy Science*. 89: 4769-4777.
- The R Foundation for Statistical Computing (2013) *An introduction to R, versão 3.0.2*, Vienna, Austria.
- Tizard IR (2000) *Introducción a la Inmunología Veterinaria*, 8ª edición. Elsevier. España. pp. 223-238.
- Trotz-Williams LA, Wayne Martin S, Leslie KE, Duffield T, Nydam DV, Peregrine AS (2007) Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*. 82(1-2):12-28.
- Tyler JW, Steevens BJ, Hostetler DE (1999) Colostral immunoglobulin concentrations in Holstein and Guernsey cows. *American Journal Veterinary Research*. 60:1136–

1139. También citado por: Youngquist RS (2007) Therlfall, W.R., Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Second Edition. Saunders Elsevier. pp. 336-338.
- Tzipori S & Ward H (2002) Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*. 4 (10): 1047–58.
- Van Metre DC, Tennant BC, Whitlock RH (2008) Rebhun's Diseases of Dairy Cattle. ed Divers TJ & Pek SF. Saunders Elsevier. EUA. ISBN. Pp. 202-294
- Velasquez DE, Parashar UD, Jiang B (2014) Strain diversity plays no major role in the varying efficacy of rotavirus vaccines: an overview. *Infection, Genetics and Evolution*. 28:561-71. doi: 10.1016/j.meegid.2014.10.008.
- Virtala AM, Mechor GD, Gröhn YT, Erb HN (1996) Morbidity from nonrespiratory diseases and mortality in dairy heifers during the first three months of life. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 208(12): 2043-6.
- Wang W, Lin XD, Guo WP, Zhou RH, Wang MR, Wang CQ, Ge S, Mei SH, Li MH, Shi M, Holmes EC, Zhang YZ (2015) Discovery, diversity and evolution of novel coronaviruses sampled from rodents in China. *Virology*. 474:19-27. doi: 10.1016/j.virol.2014.10.017.
- Wattiaux MA (2001) Diarrea neonatal. *Guía Técnica Básica de lechería*. Universidad de Wisconsin-Madison. pp. 121-124.
- Wattiaux MA (2001) Importancia de alimentar com colostro. *Guía Técnica Básica de lechería*. Universidad de Wisconsin-Madison. pp.109-112.
- Wyatt CR, Riggs MW, Fayer R (2010) Cryptosporidiosis in neonatal calves. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 26(1):89-103. doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.001.
- Xiao L & Herd RP (1994) Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Veterinary Parasitology*. 1994;55(3):257–62.

- Xiao L, Sulaiman I, Fayer R & Lal AA (1998) Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* . 93(5):687-692.
- Xiao L, Limor J, Sulaiman IM, Arrowood MJ & Lal AA (1999) Differentiation of *Cryptosporidium* species, strains and isolates. *American Society of Medicine and Hygiene*. 61(3).
- Yang D, Leibowitz JL (2015) The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. *Virus Research*. 206:120-33. doi: 10.1016/j.virusres.2015.02.025.
- Youngquist RS, Therlfall WR (2007) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Second Edition. Saunders Elsevier. pp. 336-338.

# **V. Anexos**

## Anexo I - Casuística e atividades do estágio curricular realizado nos SVA

<b>Casos clínicos</b>	<b>Nº de ocorrências em vacas</b>
<b>Sistema digestivo</b>	
Indigestão e atonia ruminal	18
Corpo estranho no rúmen	3
Timpanismo ruminal em vaca	1
Deslocamento de abomaso à esquerda	90
Deslocamento de abomaso à direita	7
Úlcera abomasal	1
Dilatação cecal	3
Diarreia em vaca	20
Vólvulo da vesícula biliar	2
Abcessos intra-abdominais	1
Aderências abdominais	1
Hipocalcemia	10
Cetose	37
Pneumoperitoneu	1
Peritonite	3
<b>Sistema metabólico</b>	
Hipocalcemia	47
Cetose	75
Polioencefalomalácia	1
<b>Sistema respiratório e cardíaco</b>	
Reticulopericardite traumática	7
Broncopneumonia	35
Broncopneumonia vitelos	6
<b>Sistema reprodutor e obstétrico</b>	
Torção Uterina	7
Ruptura uterina	1
Prolapso uterino	1
Prolapso vaginal	1
Laceração vaginal pós-parto	1
Perfuração rectal	1
Metrite puerperal	46
Retenção de Membranas Fetais	5
Abortos	3
Partos	15
Distócias	9

Fetotomia	1
Salpingite	1
Palpação transretal para DG/EG	1125
Controlo reprodutivo	56
<b>Glândula mamária</b>	
Edema teto	1
Mastites clínicas	19
Abcesso	1
<b>Sistema oftalmológico</b>	
Queratoconjuntivite seca por Moraxella	2
<b>Sistema locomotor</b>	
Artrite	3
Trauma na seção torácica da medula	1
Trauma na seção lombar da medula	2
Fratura na seção sagrada da coluna vertebral	1
Abcesso no tarso	1
Fratura carpal em vitelo	1
Subluxação patelar	1
Ferida perfurante na porção lateral do rádio	1
Drenagem de hematoma na coxa direita	1
Ferida perfurante na face interna coxa esquerda	1
Podologia - correção de cascos	42
Úlcera da sola	1
Úlcera da muralha	1
Úlcera da pinça	1
Úlcera na superfície do talão	1
Fístula da sola-talão	1
Abcesso na sola	1
Dermatite interdigital	1
Doença da linha branca	1
Laminite	2
Tiloma (hiperplasia interdigital)	1
Papiloma interdigital	1
Aplicação de tacos ortopédicos	10
<b>Profilaxia</b>	
Colheita de sangue - pesquisa IBRV, BRSV e PI3V	25
Vacinação contra IBRV, BVDV, BRSV e PI3V	126
Colheita de sangue - sanidade animal	236
Desparasitação	180
Tuberculinização	159
Colheita de sangue - pesquisa de Paratuberculose	2

<b>Outros procedimentos</b>	
Eutanásia	5
Gestão económica de explorações	2
Colheita de alimentação para análise nutricional	1
Necrópsia	2
Prova de estábulo - qualidade de leite	2

<b>Clínica cirúrgica</b>	<b>Nº de ocorrências</b>
<b>Sistema digestivo</b>	
Omentopexia com acesso paralombar direito (DAE)	72
Omentopexia com acesso paralombar direito (DAD)	7
Laparotomia exploratória	5
Total	84
<b>Sistema reprodutivo</b>	
Cesareana	5

<b>Casos clínicos</b>	<b>Nº de ocorrências em vitelos</b>
<b>Sistema digestivo</b>	
Peritonite	1
Timpanismo	1
Abomasite	1
Indigestão	2
Diarreia neonatal	4
<b>Outros procedimentos</b>	
Herniorrafia umbilical	1



# Anexo III - Poster Científico premiado nas XV Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria, 2013



XV Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria  
**Concurso de Posters Científicos Para Estudantes de Medicina Veterinária**



24, 25 e 26 de Maio de 2013, Ílhavo

## Avaliação da transferência da imunidade passiva em vitelos de leite



Seidi, J.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Estagiário de Medicina Veterinária, Universidade de Évora,  
 Herdade da Mitra – Valverde, 7000-083 Évora



### 1. Introdução

Os mecanismos de defesa de um vitelo, aquando do nascimento, não estão ainda completamente funcionais, uma vez que o seu sistema imunitário apesar de estar desenvolvido, só atinge a maturidade por volta dos 6 meses de idade (4). Além disso, uma vez que o tipo de placenta (sindesmocorial) presente nos ruminantes impede a transmissão de imunoglobulinas e de células de linfa branca, os vitelos nascem agamaglobulinémicos (3,8).

Deste modo, torna-se fundamental para o vitelo, nas primeiras horas de vida, ingerir colostro de boa qualidade, em quantidade adequada e no intervalo de tempo em que a absorção das imunoglobulinas se encontra nos níveis adequados: Transferência de imunidade passiva (2,3). A aferição da transferência da imunidade passiva pode ser realizada através da determinação das proteínas plasmáticas totais no soro sanguíneo, estando estas fortemente correlacionadas com o nível de gamaglobulinas séricas (7).

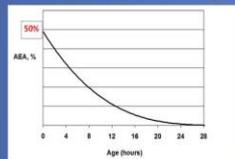


Gráfico 1 - Evolução da eficiência aparente de absorção de IgG (AEA) com o decorrer do tempo após o nascimento do vitelo [adaptado de Quigley et al, (6)]

### 2. Objetivos

Com este estudo pretendeu-se avaliar o estado imunitário de vitelos analisados e verificar se ocorreu ou não transmissão de imunidade passiva adequada. Recorrendo à análise dos dados estatísticos obtidos, pretendeu-se avaliar também o efeito de variáveis que possam influenciar o nível de transmissão de imunidade passiva, tais como: o sexo dos vitelos, a paridade das mães e o momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro fornecida.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Estudo de campo

Em 34 explorações leiteiras da região de Entre Douro e Minho (n=33) e Aveiro (n=1), foram colhidas amostras de sangue venoso (n=105), efectuadas somente em visitas de clínica ambulatória e avengas reprodutivas. Além disso, realizou-se um questionário epidemiológico aos responsáveis das explorações com o objetivo de registar os procedimentos normais de manejo, que se realizam normalmente após o nascimento dos vitelos.



#### 3.2. Colheita e processamento das amostras

As amostras de sangue foram colhidas da veia jugular recorrendo a tubos de vácuo sem anticoagulante, entre as primeiras 24 horas e 7 dias de vida. Após formação do coágulo sanguíneo, os tubos de sangue foram centrifugados a 3000g/min durante 15 minutos até 24h após a sua colheita.

Relativamente à determinação das proteínas plasmáticas totais no soro, esta foi realizada com recurso a um refractómetro clínico manual, Zuzi Modelo 50303122 (Série ECO) com compensação automática de temperatura (10-30° C), à temperatura ambiente (±20° C) (1,5).

#### 3.3. Ensaio Estatístico

Com os dados resultantes do ensaio experimental, foi elaborada uma análise de frequências com recurso ao programa Microsoft Excel, sendo que os mesmos dados foram utilizados para uma posterior análise univariada através do modelo linear geral do programa R, de forma a determinar se o sexo dos vitelos, a paridade das mães e o momento em conjugação com a quantidade de colostro administrado poderiam ser considerados fatores de risco associados à transmissão de imunidade passiva, recorrendo para tal ao teste de Fisher.

### 6. Bibliografia

- 1) Callaway, C.D., Tyler, J.W., Trossman, R.K., Hostetler, D. Comparison of refractometers and test endpoints in the measurement of serum protein concentration to assess passive transfer status in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2002;221:1605-1608
- 2) Corfesa, V.S. Neonatal immunology. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*. 2009 Mar;20(1):251-7.
- 3) Goodwin, S. Colostrum Management for Dairy Calves. *Veterinary Clinics of North America Food Animal* 24 2008:19-39
- 4) Hunt, E. "Neonatal Disease and Disease Management". In: Howard & Smith, Current Veterinary Therapy 4. Food Animal Practice. 1999:51-62.
- 5) Merritt, K.H., Conrad, E., Peltier, J., Leno, A., Campbell, S., Quigley, J., Tyler, H. Estimate of colostral immunoglobulin G concentration using a refractometry or with caprylic acid fractionation. *J Dairy Sci*. 2012 Jul; 94(7):1987-96
- 6) Quigley, J. Passive Immunity in Newborn Calves. *WCS Adv Dairy Tech*. 2007; 18: 247-265.
- 7) Radostina, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constantino, P.D. *Veterinary Medecine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edition. Philadelphia: Elsevier; 2007:127-171.
- 8) Tizard, I. R. *Introducción a la inmunología Veterinaria*. 8ª edición. Elsevier España 2000: 223-238.

### 4. Resultados obtidos

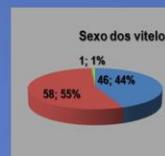


Gráfico 2 - Repartição das amostras por sexo



Gráfico 3 - Repartição das amostras por paridade das mães

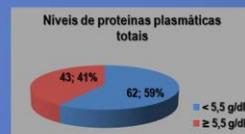


Gráfico 4 - Repartição das amostras por níveis de proteínas plasmáticas totais



Gráfico 5 - Dados relativos ao momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro administrada

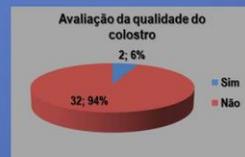


Gráfico 6 - Explorações que fazem avaliação da qualidade do colostro

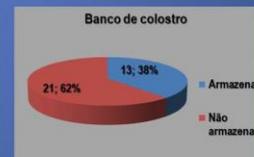


Gráfico 7 - Explorações que possuem banco de colostro

Na análise de risco efectuada para determinar as variáveis relacionadas com a transmissão de imunidade passiva, constatou-se que a significância estatística de "sexo dos vitelos" e "paridade das mães" foi de P=0.13 e de P=0.15, respectivamente. Por outro lado, para o momento de administração, em conjugação com a quantidade de colostro fornecida, obteve-se uma significância estatística de P=0,001.

### 5. Conclusão

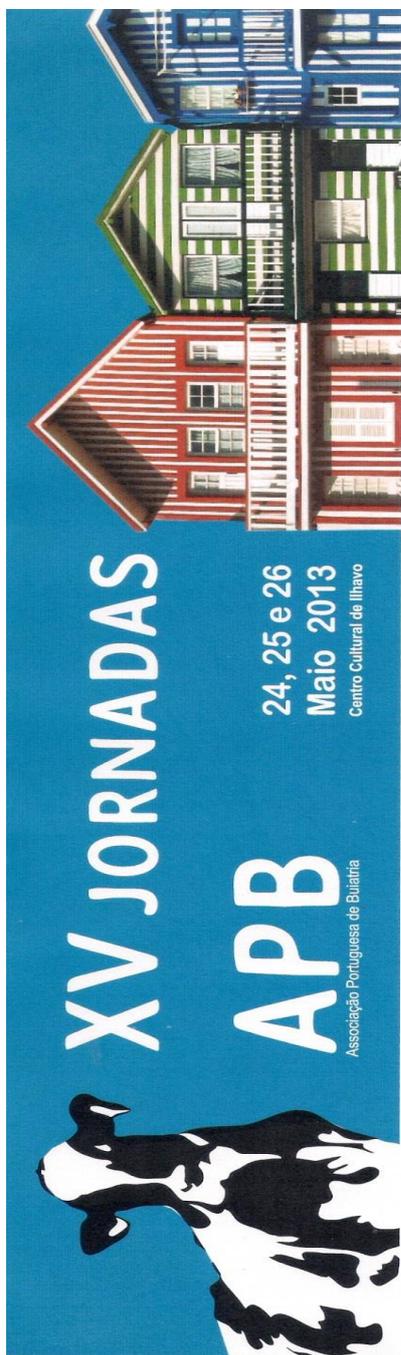
Este estudo demonstrou que somente 41% (n=43) dos vitelos analisados se encontravam com adequados níveis de IgG, acima dos 5,5 g/dL, apesar de 50% (n=17) das explorações visitadas referirem que administram quantidades de colostro adequadas e atempadamente na fase pós-nascimento.

Das três variáveis objecto de estudo, somente o momento de administração em conjugação com a quantidade de colostro fornecida influenciou o nível de proteínas plasmáticas no decorrer da primeira semana de vida (P<0,001). Por outro lado, o sexo dos vitelos e a paridade das mães não influenciaram os valores de proteínas plasmáticas totais de forma a serem considerados como variáveis de influência (P>0,05).

### 7. Agradecimentos

O autor agradece aos Serviços Veterinários Associados e respectivos clínicos, pela realização de estágio curricular, em particular ao Dr. Carlos Cabral e Dr. Luis Pinho, pela possibilidade de efectuar este estudo e pela orientação dada ao longo do trabalho. Também agradece ao Dr. Manuel Paulo Silva pela realização de uma parte do estágio curricular, período que também permitiu realizar colheitas nas explorações dos seus clientes e, por fim, às explorações inseridas no estudo, pela colaboração na concretização do mesmo.

Anexo IV - Certificado do prémio destinado ao Poster Científico apresentado nas  
XV Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria, 2013



# CERTIFICADO

Certifica-se que,

**JAIME SEIDI**

Ganhou o 1º Prémio do Concurso de Posters para Estudantes de Medicina Veterinária, nas XV JORNADAS DA ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE BUIATRIA, que decorreram entre 24 e 26 de Maio de 2013, no Centro Cultural de Ílhavo.

Ílhavo, 26 de Maio de 2013



[www.apbuiatria.pt](http://www.apbuiatria.pt)

Prof. Doutor João Cannas da Silva  
Presidente da Associação Portuguesa de Buiatria