CAMILA CECILIA MARTIN

**Influência do uso precoce de antibiótico no desenvolvimento da
microbiota intestinal, resposta imune e incidência de diarreias em
bezerras recém-nascidas**

São Paulo

2017

CAMILA CECILIA MARTIN

Influência do uso precoce de antibiótico no desenvolvimento da microbiota intestinal, resposta imune e incidência de diarreias em bezerras recém-nascidas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Viviani Gomes

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3530
FMVZ

Martin, Camila Cecília

Influência do uso precoce de antibiótico no desenvolvimento da microbiota intestinal, resposta imune e incidência de diarreias em bezerras recém-nascidas. / Camila Cecília Martin. -- 2017.

218 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2017.

Orientador: Profa. Dra. Viviani Gomes.

1. Tulatromicina. 2. Sanidade. 3. Perfil inflamatório. 4. Colonização bacteriana. 5. Imunidade inata. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INFLUÊNCIA DO USO PRECOCE DE ANTIBIÓTICO NO DESENVOLVIMENTO DA MICROBIOTA INTESTINAL, RESPOSTA IMUNE E INCIDÊNCIA DE DIARRÉIAS EM BEZERRAS RECÉM-NASCIDAS", protocolada sob o CEUA nº 2596070715, sob a responsabilidade de **Viviani Gomes e equipe; Camila Cecilia Martin** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/01/2017.

We certify that the proposal "INFLUENCE OF ANTIBIOTICS USE IN EARLY DEVELOPMENT OF GUT MICROBIOTA, IMMUNE RESPONSE AND INCIDENCE OF DIARRHEA IN NEWBORN CALVES ", utilizing 20 Bovines (20 females), protocol number CEUA 2596070715, under the responsibility of **Viviani Gomes and team; Camila Cecilia Martin** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 01/03/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2015** a **08/2017**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **20**

Linhagem: **HPB**

Peso: **a**

Resumo: O objetivo geral desta pesquisa é avaliar a influência do uso precoce de antibióticos na colonização microbiana do intestino, desenvolvimento da imunidade e susceptibilidade para as diarreias. Serão utilizadas 20 bezerras híbridas, da raça Holandesa, provenientes de fazenda leiteira de alta produção. As bezerras recém-nascidas (n=20) serão distribuídas em dois grupos compostos por 10 animais: grupo 1- receberão uma dose do antibiótico Florfenicol (20mg/Kg) ao nascimento e grupo 2- não receberão antibióticos. As avaliações e coletas das amostras de sangue e fezes serão realizadas nos seguintes momentos: imediatamente após nascimento e antes da mamada de colostro (M0); 1-3° (M1); 4-6° dia (M2); 7-9° (M3); 10-12° (M4); 13°-15° (M5); 20-25° dia (M6); e 25-30° dias pós-nascimento (M7). Serão realizadas as seguintes provas laboratoriais: avaliação da imunidade humoral através da detecção de anticorpos anti-Escherichia coli que serão mensurados por meio de teste imunoenzimático [in house]; avaliação da intensidade do processo inflamatório nos quadros de diarreias por meio da análise dos leucogramas e concentração da haptoglobina sérica. Para analisar a microbiota intestinal serão coletadas amostras fecais, para análise das bactérias aeróbicas e anaeróbicas. As variáveis avaliadas nesta pesquisa serão comparadas entre os grupos e momentos. Inicialmente, os parâmetros serão testados quanto a sua distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk, optando-se por testes estatísticos apropriados.

Local do experimento:

São Paulo, 29 de junho de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 03 de julho de 2017
CEUA N 2596070715

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Viviani Gomes
Área: Clínica Médica Veterinária
Viviani Gomes (orientador)

Título da proposta: "INFLUÊNCIA DO USO PRECOCE DE ANTIBIÓTICO NO DESENVOLVIMENTO DA MICROBIOTA INTESTINAL, RESPOSTA IMUNE E INCIDÊNCIA DE DIARREIAS EM BEZERRAS RECÉM-NASCIDAS".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Notificação (versão de 29/junho/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Prezada Profª. Denise Tabacchi Fantoni Presidente da CEUA Venho por meio desta solicitar a aprovação da alteração do número de animais (de 20 para 26) utilizados no projeto cadastrado na CEUA sob o n. 2596070715. Esta alteração foi necessária durante o andamento do estudo, devido à ocorrência de bezerras com diarreias tratadas com antibióticos. Este era um critério de exclusão experimental, já que o objetivo do trabalho é avaliar o uso de dose metafilática de tulatromicina sobre a colonização intestinal, imunidade e ocorrência de diarreias em bezerras. Atenciosamente, Viviani Gomes".

Comentário da CEUA: " O pesquisador solicita aumento do n de 20 para 26 justificando a solicitação.".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARTIN, Camila Cecilia

Título: Influência do uso precoce de antibiótico no desenvolvimento da microbiota intestinal, resposta imune e incidência de diarreias em bezerras recém-nascidas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Margarete e Jamur,
que deram asas aos meus sonhos e
que me ensinaram que o que aprendemos
é a única coisa verdadeiramente nossa.*

*A meus irmãos, Daniela e Tiago,
por estarem sempre ao meu lado
mesmo eu estando distante.*

*A minha querida bisã, Leonor (in memorian),
por ser um exemplo e inspiração.*

Sem vocês nenhuma conquista valeria à pena.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é admitir que em algum momento precisamos de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente... por isso meus sinceros agradecimentos: A Deus, ser supremo e justo, por me dar força nos momentos difíceis e pela paz e amor em todos os dias da minha vida.

Aos meus pais, Margarete Martin e Jamur Martin por todo amor, carinho, apoio e companheirismo que sempre tiveram, obrigada por toda a compreensão nos diversos momentos que não pude estar por perto, se hoje esse momento se tornou realidade é por causa dos esforços de vocês mesmo em meio a todas as dificuldades.

A minha irmã Daniela, pelos conselhos, incentivo, companheirismo, amizade verdadeira e palavras certas nos momentos certos. Ao meu irmão Tiago, por tornar minha vida mais doce e alegre. Obrigada por apoiarem minhas escolhas e sempre estarem ao meu lado, sou eternamente grata. Amo vocês.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Viviani Gomes que eu tive a sorte de conhecer ainda em Palotina e desde então vem me ajudando e orientando, desde os estágios extracurriculares até a orientação no mestrado. Obrigada por ter aberto tantas portas para mim, pelas inúmeras oportunidades, pela confiança e estímulo para sempre buscarmos o melhor resultado. Você é um exemplo de persistência e dedicação, e me mostra a cada dia que com força de vontade chegaremos lá. Muito obrigada!

Aos colegas de equipe: Camila Costa Baccili, Natalia Sobreira, Jean Ramos e Karen Nascimento, que vem me ajudando em tudo que é possível desde quando nos tornamos uma equipe e começamos a compartilhar os nossos dias. Muito obrigada por fazerem parte da minha vida, serem tão especiais, por toda a ajuda no período do experimento, conhecimentos compartilhados e pela amizade e carinho que deixa os dias de trabalho mais leves e felizes.

Ao meu querido amigo Rodrigo Malzoni, você sabe o quanto é especial na minha vida, obrigada pelos melhores conselhos, pelo apoio, carinho, prontidão em sempre me ajudar e estar sempre ao meu lado nos momentos fáceis e difíceis, o irmão que a vida me deu.

Ao professor Mario Julio Ávila Campos por ter aberto as portas do seu laboratório para mim e ter me recebido tão bem, por toda a orientação e ajuda nesse período e por ter contribuído tanto com o meu trabalho.

A toda a equipe do laboratório de anaeróbios do ICB, Liliana, Gabriela, Alejandra, Viviane, Filipe e Márcia, vocês me ajudaram muito nesse período final do meu mestrado, obrigada pelo carinho, amizade e prontidão em sempre ajudar.

Ao Prof. Dr. Paulo Brandão por ter realizado as análises de rotavírus e coronavírus contribuindo muito com o meu trabalho. A Profª Drª Alice Maria Melville Paiva Della Libera e toda sua equipe pelos materiais emprestados, auxílio, carinho e amizade! A Profª Drª Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes e Drª Nicolle Gilda Teixeira de Queiroz Hazarbassanov pelos conhecimentos transmitidos e toda a ajuda com o citômetro. Ao Sydnei e Rosangela do ICB por terem me auxiliado com as análises da produção celular de radicais livres.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica: Profª Drª Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, Prof. Dr. Fábio Celidonio Pogliani, Prof. Dr. Fernando José Benesi, Profª Drª Lílian Gregory, Profª Drª Maria Cláudia Araripe Sucupira e Profª Drª Viviani Gomes.

Ao Prof. Dr. Julio Augusto Naylor Lisboa por ter aceitado o convite para ser banca desta dissertação e contribuir com seus conhecimentos.

A Tais Pinheiro e Natália Decaris por toda a ajuda durante o período do meu experimento. Muito obrigada!

A Juliana França dos Reis Costa e Sylvia Marquart Fontes Novo que direta ou indiretamente me ajudaram muito nesta etapa, obrigada pela paciência e por sempre estarem tão disponíveis e dispostas a me ajudar, vocês são especiais!

Gostaria de agradecer a equipe da fazenda Agrindus em especial ao Carlos Rodrigues (Carlão) e Roberto Jank que abriram as portas para que o experimento pudesse ser realizado lá contribuindo muito com o meu trabalho e a todos os funcionários que me auxiliaram de forma inigualável e sempre com um sorriso no rosto. Essa foi uma etapa muito importante do meu mestrado e fico muito feliz e agradecida por vocês terem participado dela e me ajudado tanto, muito obrigada!

Aos residentes da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes (CBPR) de 2015 a 2017, muito obrigada! Todos vocês sempre me ajudaram prontamente em algum momento! Em especial aos residentes Elisa, Mailson, Joel, Isabelle, Pedro, Raquel, Karinne e Deisiane. Muito obrigada!

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação pela amizade, companheirismo e ajuda! Sucesso a todos!!! Agradecimento especial para Marcela que iniciou esta jornada comigo e juntas iremos concluí-la, é muito bom poder ter uma amiga como você para compartilhar todos esses momentos. A Natália que com o seu sorriso ilumina tudo por onde passa e transforma qualquer tristeza em alegria, você tem um lugar muito especial no meu coração. A Caroline Seino que tem um coração enorme e sempre está disposta a ajudar. Quero agradecer também a Rejane, Carolina Shecaira, Elisa, Juliana e Ronaldo que são pessoas maravilhosas e sempre me incentivaram muito.

A toda equipe dos Laboratórios da FMVZ/USP, Clara Mori, Maria Helena da Silva Pelissari, Cláudia Regina Stricagnolo e Edna Santana por toda a ajuda com minhas análises e processamento das amostras.

As minhas amigas companheiras e ex-companheiras de república, Natália da Mata Luchetti, Natália Santos, Júlia Beneti, Suzana Enumo e Giovanna Girardelli obrigada por me acolherem, pelos conselhos e pelas muitas vezes que se tornaram minha família durante essa fase aqui em São Paulo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNP-q pela concessão do auxílio de pesquisa (446410/2014-4) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado (2015/16981-6).

*"Mesmo desacreditado e ignorado por todos, não posso desistir,
pois para mim, vencer é nunca desistir."*

Albert Einstein

*“Deixe que a vida te faça árvore,
que suas raízes encontrem o fundo
da terra e dela sugue água e amor.
que seus galhos encontrem o céu etéreo
enquanto, com as folhas sinta o cheiro do ar.
Seja tronco sólido que nem o vento abala,
que seus frutos sejam sempre verdadeiros,
e que seus pólenes voem para longe
que é para alimentar vidas em lugares distantes.
Nasça, cresça e morra deixando sementes.”*

Renê Lima

RESUMO

MARTIN, C. C. **Influência do uso precoce de antibiótico no desenvolvimento da microbiota intestinal, resposta imune e incidência de diarreias em bezerras recém-nascidas.** [Influence of the early use of antibiotic on gut microbiota development, immune response and incidence of diarrhea in neonate heifers]. 2017. 218 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência do uso precoce de antimicrobianos na microbiota intestinal, resposta imune e ocorrência de diarreias em bezerras recém-nascidas. Foram selecionadas 26 bezerras Holandesas distribuídas de acordo com a aplicação (ATB+) ou não (ATB-) de tulatromicina (2,5 mg/Kg - SC) até 12h de vida. **Capítulo 1** – Este capítulo avaliou a influência do uso precoce de antimicrobiano na sanidade de bezerras holandesas recém-nascidas, por meio do exame clínico geral. As diarreias foram detectadas por sistema de escore e matéria seca (%) nas fezes, além do escore respiratório e palpação externa da região umbilical. O desempenho das bezerras foi determinado pela estimativa do ganho de peso. As bezerras ATB- apresentaram maior frequência de mucosas esbranquiçadas ($P=0,066$) e inflamações umbilicais no ATB- em D3-5 ($P=0,063$) e D13-15 ($P=0,066$). A frequência de escore fecal 2 e 3 foi semelhante entre os grupos, observando-se pico no D13-15. Os valores médios para matéria seca (%) foram menores no ATB+ no D7-9 ($P=0,063$) e D27-30 ($P=0,084$). O agente etiológico das diarreias foi o *Cryptosporidium* e/ou rotavírus. O ganho de peso diário (GPD) foi igual entre grupos, observando-se intensa redução no GPD em D13-15. **Capítulo 2** – O objetivo deste capítulo foi avaliar a influência do uso precoce de antimicrobianos na colonização bacteriana intestinal, por meio da detecção de material genético dos principais grupos bacterianos por meio do PCR em tempo real. Não foram observadas diferenças entre os grupos para bactérias totais e *C. perfringens*. As bezerras ATB- apresentaram maior quantidade de *Bifidobacterium*, nas fezes no D3-5 ($P=0,002$) e D7-9 ($P=0,018$). A população de *Lactobacillus* também apresentou tendência ($P=0,097$) para maior número de cópias de DNA no grupo ATB-. Ao contrário, a *Escherichia coli* apresentou tendência para maiores valores no grupo ATB+ no D20-23 ($P=0,052$) e D27-30 ($P=0,072$). **Capítulo 3** – O objetivo deste capítulo foi avaliar a influência do uso precoce de antimicrobianos no perfil inflamatório de bezerras holandesas recém-nascidas por meio de provas

hematológicas, imunológicas, bioquímicas e eletroforéticas. Observou-se tendência para menores valores de hemoglobina ($P=0,071$), CHCM ($P=0,057$) e ferro sérico ($P=0,051$) no D3-5 no ATB-. Neste momento, a frequência de anemias também foi maior no ATB- ($P=0,016$). O número de neutrófilos ($P=0,051$) e a produção espontânea de ERO's foi maior no ATB-, enquanto o número de linfócitos foi maior no ATB+ ($P=0,061$) no D7-9. Estes dados são condizentes com as análises imunes, no qual a proporção de populações de mononucleares 1 e 2 expressando o CD62L⁺ apresentou tendência para maior valor no ATB+ em D3-5 ($P=0,098$) e D7-9 ($P=0,083$). Após as diarreias (D13-15), os granulócitos ($P=0,043$) e mononucleares ($P=0,089$) das bezerras ATB+ apresentaram maior intensidade de fluorescência para expressão CD62L no D20-23. O grupo ATB+ também apresentou maiores teores de beta-globulina ($P=0,057$), gama-globulina ($P=0,069$) e haptoglobina ($P=0,032$) no D13-15. O uso precoce de tulatromicina influenciou na microbiota intestinal, imunidade inata e ocorrência de doenças no período neonatal.

Palavras-chave: Tulatromicina. Sanidade. Perfil inflamatório. Colonização bacteriana. Imunidade inata.

ABSTRACT

MARTIN, C. C. **Influence of the early use of antibiotic on gut microbiota development, immune response and incidence of diarrhea in neonate heifers** [Influência do uso precoce de antibiótico no desenvolvimento da microbiota intestinal, resposta imune e incidência de diarreias em bezerras recém-nascidas]. 2017. 218 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The general goal of this research was to evaluate the influence of early antimicrobial use in the gut microbiota, immune response and occurrence of diarrhea in neonate heifers. It was screened 26 neonate Holstein heifers distributed according to the application (ATB+) or not (ATB-) of tulathromycin (2.5mg/Kg - SC) from birth until 12 hours of life. **Chapter 1** – This chapter evaluated the influence of early use of antimicrobial in the health of neonate Holstein heifer by general clinical examination. Diarrheas were detected using score system and fecal dry matter (%), besides of respiratory score and external palpation of navel region. The performance of calves was evaluated by daily weight gain. Heifers ATB- had high frequency of paleness mucous ($P=0.066$) and umbilical inflammation in ATB- group on D3-5 ($P=0.063$) and D13-15 ($P=0.066$). The frequency of fecal score 2 and 3 was similar between groups, observing peak of diarrhea on D13-15. The mean values of fecal dry matter were low in ATB+ group on D7-9 ($P=0.063$) and D27-30 ($P=0.084$). The main etiologic agent of diarrheas was *Cryptosporidium* and/or rotavírus. The daily weight gain (DWG) was similar between groups, observing intense decrease of DWG on D13-15. **Chapter 2** – The aim of this chapter was to evaluate the influence of early use of antimicrobial in the microbial gut colonization by detection of genetic bacterial material using real time PCR. It was not found difference between groups for total bacteria and *C. perfringens*. The calves from ATB- group had high quantity of *Bifidobacterium* in the fecal material on D3-5 ($P=0.002$) and D7-9 ($P=0.018$). The *Lactobacillus* population had a tendency ($P=0.097$) to have high number of DNA copies in the ATB- group. On the other hand, *Escherichia coli* had tendency to high values in ATB+ group on D20-23 ($P=0.052$) and D27-30 ($P=0.072$). **Chapter 3** – The aim of this chapter was to evaluate the influence of early use of antimicrobial in the inflammatory profile of neonate Holstein heifers by hematological, immunological and biochemical tests, besides electrophoresis. It was possible to observe lower values of hemoglobin ($P=0.071$), CHCM ($P=0.057$) and serum iron ($P=0.051$) in ATB- group on

D3-5. In this moment, the frequency of anemia also was high in ATB- group ($P=0.016$). The number of neutrophils ($P=0.051$) and spontaneous ROS's was high in ATB- group, while the number of lymphocytes was high in ATB+ group ($P=0.061$) on D7-9. These data were according to immune analysis, where the proportion of mononuclear population 1 and 2 expressing CD62L⁺ had a tendency for high values in ATB+ group on D3-5 ($P=0.098$) and D7-9 ($P=0.083$). After diarrhea (D13-15), granulocytes ($P=0.043$) and mononuclear cells ($P=0.089$) showed high fluorescence intensity of CD62L in ATB+ heifers on D20-23. ATB+ group also had high rate of beta globulin ($P=0.057$), gamma globulin ($P=0.069$) and haptoglobin ($P=0.032$) on D13-15. The early use of tulathromycin had influence on gut microbiota, innate immunity and occurrence of disease in the neonatal period.

Key-words: Tulatromicin. Sanity. Inflammatory profile. Bacterial colonization. Innate immunity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desregulação imunológica associada a disbiose da microbiota. (A) Microbiota saudável contendo uma composição balanceada com várias classes de bactérias. (B) Disbiose decorrente da alteração na composição da microbiota resultando na redução do número de bactérias simbióticas e um aumento na população de patobióticas resultando na inflamação.	33
Figura 2 - Prevalência dos principais filos bacterianos compondo o microbioma fecal de bezerros holandeses nas primeiras sete semanas de vida.....	41
Figura 3 - Mecanismos imunes envolvidos no processo de tolerância imunológica às bactérias que colonizam o intestino do hospedeiro.	47
Figura 4 - Nascimento em baias de parição localizadas na maternidade. Fêmea em trabalho de parto (a); contato vaca e bezerra imediatamente após o parto (b) – São Paulo – 2016.....	63
Figura 5 - Vaca sendo preparada para a 1ª ordenha na baia maternidade com ordenhadeira mecânica tipo balde ao pé logo após o parto - São Paulo - 2016	63
Figura 6 - Bezerras em baias de transição dentro da maternidade. Baias de transição (a); colostragem utilizando mamadeira (b) – São Paulo – 2016	64
Figura 7 - Exame clínico geral das bezerras. Avaliação da frequência cardíaca e respiratória (a); coloração das mucosas (b); temperatura corpórea (c) e pesagem utilizando fita de peso (d) - São Paulo – 2016	66
Figura 8 - Bezerreiro onde as bezerras eram alojadas após os três dias de vida (a); gaiolas individuais suspensas de metal e madeira com cama de feno (b); bezerra alimentada por meio de balde (c) – São Paulo 2016	67
Figura 9 - Aplicação por via subcutânea de tulatromicina (2,5 mg/Kg) na região torácica caudal a escápula do lado direito – São Paulo - 2016	68
Figura 10 - Escores de fezes adotados para detecção da diarreia em bezerras no primeiro mês de vida – São Paulo – 2016.....	70

Figura 11 - Amostras de fezes em estufa a 103°C para determinação da porcentagem de matéria seca nas fezes de bezerras do grupo ATB- e ATB+ - São Paulo - 2016.....	73
Figura 12- Detecção de <i>Cryptosporidium</i> (setas) pela técnica de flutuação em solução saturada de sacarose- São Paulo - 2016.....	74
Figura 13- Correlação de <i>Spearman</i> entre o refratômetro BRIX e colostro <i>balls</i> - São Paulo - 2016.....	80
Figura 14- Valores médios e desvio padrão para a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TEMP), das bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016..	84
Figura 15 - Frequência (%) da coloração da mucosa ocular das bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016 ...	86
Figura 16 - Frequência (%) de doenças em bezerras (diarreia e inflamações umbilicais) nas bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016.....	89
Figura 17 - Valores médios e desvios-padrão para porcentagem de matéria seca nas fezes de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016.....	90
Figura 18 - Peso corporal (Kg) e ganho de peso médio diário (GPMD) de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo - 2016.....	92
Figura 19 - Frequência (%) de <i>Cryptosporidium</i> e rotavírus nas fezes de bezerras Holandesas com diarreia do grupo ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo - 2016.....	93
Figura 20 - Demonstração da coleta de amostras. Coleta de fezes direto da ampola retal utilizando luva estéril (a) – São Paulo - 2016.....	119
Figura 21 - Análise para quantificação do DNA extraído por espectrofotometria - São Paulo - 2016.....	121
Figura 22 - Curva padrão para bactérias totais - 16S rRNA (<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922).....	122
Figura 23 - Curva padrão para <i>Bifidobacterium</i> (<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC1696).....	123
Figura 24 - Curva padrão para <i>Lactobacillus</i> (<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC4356).....	123

Figura 25 - Curva padrão para <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922) .	123
Figura 26 - Curva padrão para <i>Clostridium perfringens</i> (<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124)	123
Figura 27 - Valores médios do número de cópias de DNA de <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Clostridium perfringens</i> nas fezes de bezerras Holandesas do grupo ATB- no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016	128
Figura 28 - Valores médios do número de cópias de DNA de <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Clostridium perfringens</i> nas fezes de bezerras Holandesas do grupo ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016	128
Figura 29 - Valores médios do número de cópias de DNA de bactérias totais (16S rRNA), <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Clostridium perfringens</i> nas fezes de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016.....	132
Figura 30 - Placa de 96 poços demonstrando as reações obtidas na prova da haptoglobina - São Paulo - 2016	158
Figura 31 – Distribuição das populações de leucócitos sanguíneos de acordo com o seu tamanho (FSC- FowardScatter) e granulosidade (SSC- SideScatter) – São Paulo – 2016	161
Figura 32 - Compensação das fluorescências FL2 vs. FL4 utilizando-se o anticorpo monoclonal <i>mouse anti-bovine</i> CH138 – São Paulo – 2016...	162
Figura 33 - Compensação das fluorescências FL2 vs. FL4 utilizando-se o anticorpo monoclonal <i>mouse anti-bovine</i> CD62L – São Paulo – 2016...	162
Figura 34- Ensaio para a determinação da proporção de granulócitos CH138 ⁺ expressando o receptor CD62L ⁺ – São Paulo – 2016.....	163
Figura 35 – Proporção de células da população mononuclear 1 expressando da L-selectina (CD62L ⁺) – São Paulo – 2016.....	163
Figura 36 – População células da população mononuclear 2 expressando o receptor L-selectina (CD62L ⁺) presente nos linfócitos – São Paulo – 2016	164
Figura 37 - Avaliação da viabilidade celular pela prova de exclusão de Azul de Trypan - São Paulo - 2016	165

Figura 38 - Valores médios para hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume corpuscular médio (VCM) (fl), para hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL) em bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo - 2016 .	170
Figura 39 – Frequência de bezerras Holandesas anêmicas dos grupos ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016	172
Figura 40 - Valores médios de ferro ($\mu\text{M/L}$) no soro de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016	174
Figura 41 - Valores médios dos valores de leucócitos totais ($10^3/\mu\text{L}$), valores relativos (%) e absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) de neutrófilos e linfócitos de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016	177
Figura 42 - Valores médios e desvios-padrão dos teores séricos de proteína total (g/dL), albumina (g/dL), alfa-globulina (g/dL), beta-globulina (g/dL) e gama-globulina (g/dL) de bezerras ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016	181
Figura 43 - Valores médios de haptoglobina (mg/dL) no soro de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016.	183
Figura 44 - Proporções de granulócitos CH138+expressando o receptor CD62-L e médias geométricas da intensidade da fluorescência em bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016.	187
Figura 45 – Proporções de células mononuclear 1 (monócitos) e 2 (linfócitos) expressando o receptor CD62-L e médias geométricas da intensidade da fluorescência em bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016.....	188
Figura 46 - Produção de espécies reativas de oxigênio pelos granulócitos mediante liberação espontânea e após estimulação com PMA em bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016	190

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores relativos e absolutos referente a inserção das bezerras nos grupos experimentais ATB- e ATB+ – São Paulo - 2016	78
Tabela 2 – Mediana, intervalo quartiliano (IQR), valores mínimos e máximos de imunoglobulinas fornecidas na primeira e segunda mamada para as bezerras do grupo ATB- e ATB+ avaliados pelo colostro <i>balls</i> e índice Brix – São Paulo - 2016.....	79
Tabela 3 – Mediana, intervalo quartiliano (IQR), valores mínimos e máximos do volume de colostro (L) fornecido na primeira e na segunda mamada e volume total de colostro administrado para as bezerras do grupo ATB- e ATB+ – São Paulo – 2016.....	81
Tabela 4 – Valores relativos e absolutos referentes ao método de armazenamento do colostro fornecido na primeira e na segunda mamada para as bezerras do grupo ATB- e ATB+ – São Paulo - 2016....	81
Tabela 5 - Valores médios e desvios-padrão para os valores de sólidos totais no soro mensurado utilizando o refratômetro BRIX e proteína total mensurada pelo refratômetro de proteínas em bezerras ATB- e ATB+no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016.....	82
Tabela 6- Valores médios e desvios-padrão para frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TEMP) das bezerras Holandesas ATB- e ATB+no primeiro mês de vida - São Paulo- 2016	83
Tabela 7- Valores relativos (absolutos) para mucosas (M) e linfonodos (L) observados nas bezerras dos grupos ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016.....	85
Tabela 8 - Valores relativos (absolutos) para os casos de diarreia diagnosticadas pelo escore fecal e matéria seca, inflamação umbilical e doença respiratória bovina (DRB) manifestados pelas bezerras dos grupos ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016.....	88
Tabela 9 - Valores médios e desvios-padrão para porcentagem de matéria seca nas fezes de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016	90

Tabela 10 - Valores médios e desvios-padrão para o peso e ganho de peso médio diário (GPMD) das bezerras ATB- e ATB+no primeiro mês de vida - São Paulo- 2016.....	91
Tabela 11 - Valores relativos e absolutos para <i>Cryptosporidium</i> (Cripto) e rotavírus (Rota) nas fezes diarréicas de bezerras dos grupos ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016	93
Tabela 12 - Valores médios do número de cópias de DNA das bactérias totais (16S rRNA), <i>Bifidobacterium</i> , <i>Latobacillus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Clostridium perfringens</i> nas fezes de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016.....	131
Tabela 13 - Valores médios e desvios-padrão para as variáveis hemácias (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Hto), volume corpuscular médio (VCM) (fl), para hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL)em bezerras ATB- e ATB+no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016.....	169
Tabela 14 – Valores relativos (absolutos) da interpretação individual dos eritrogramas de bezerras Holandesas recém-nascidas ATB- e ATB+, de acordo com os valores estabelecidos para bezerras por faixa etária por BRUN-HANSEN; KAMPEN; LUND (2006) - São Paulo – 2016	172
Tabela 15 - Valores médios de ferro ($\mu\text{M/L}$) no soro de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016	173
Tabela 16 - Valores médios e desvios-padrão dos valores de leucócitos totais ($10^3/\mu\text{L}$), valores relativos (%) e absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) de neutrófilos e linfócitos de bezerras ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016	176
Tabela 17 - Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) e relativos (%) das medianas, valores mínimos e máximos das variáveis monócitos, eosinófilos e basófilos no sangue de bezerras Holandesas ATB- e ATB+no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016	178
Tabela 18 - Valores médios e desvios-padrão dos teores séricos de proteína total (g/dL), albumina (g/dL), alfa-globulina (g/dL), beta-globulina (g/dL) e gama-globulina (g/dL) de bezerras ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016	180

Tabela 19 - Valores médios e desvios-padrão para os valores de haptoglobina (mg/dL) em bezerras ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016	182
Tabela 20 - Médias e desvios-padrão para as proporções de granulócitos CH138+, células mononuclear 1 (monócitos) e 2 (linfócitos) expressando o receptor CD62-L em bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016.....	186
Tabela 21 - Produção de espécies reativas de oxigênio pelos granulócitos mediante liberação espontânea (CEL) ou estimulados (CEL+PMA) em bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016	190

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Intervalos de referência para as funções vitais em bezerras no primeiro mês de vida	66
Quadro 2 - Escores de fezes adotado para detecção da diarreia em bezerras no primeiro mês de vida	69
Quadro 3 - Escores de broncopneumonia adotados para detecção da doença em bezerras no primeiro mês de vida	70
Quadro 4 - Primers utilizados para a detecção do gene codificador da proteína de nucleocapsídeo N de coronavírus bovino e suas regiões nucleotídicas de hibridação no gene N da amostra Mebus(U00735), primers utilizados para a detecção de gene codificador da proteína viral VP1 de rotavírus do grupo A e regiões nucleotídicas de hibridação em relação ao segmento genômico 1 da amostra KJ44 (DQ494405.1), temperaturas de fusão (T _m) e respectivos amplicons (em pares de bases)e regiões nucleotídicas de hibridação em relação à seqüência de número de acesso GenBank NC_006853, temperaturas de fusão (T _m) e respectivo amplicon (em pares de bases).....	75
Quadro 5 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados na quantificação de DNA de bactérias presentes nas fezes de bezerros por qPCR (SybrGreen).....	125
Quadro 6 – Layout da placa usada para a realização dos ensaios para a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) pelos fagócitos do sangue - São Paulo - 2016	166
Quadro 7 - Avaliação da viabilidade, número de células vivas, número de células mortas, produção espontânea e estimulada com PMA de espécies reativas de oxigênio no sangue de bovinos até 30 minutos após a coleta, 24 horas de armazenamento em geladeira (4°C) e 24 horas de armazenamento em isopor (18°C).....	216

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
mL	Militros
UFC	Unidade formadora de colônias
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
PCR-SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
MALT	Tecido linfóide associado à mucosa
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptors</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LAM	Lipoarabinomanna
IL	Interleucina
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T regulatórias
TGF	<i>Transforming Growth Fator</i>
IgA	Imunoglobulina A
DC	Células dendríticas
MLN	Linfonodos mesentéricos
IFN	<i>Interferon</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
mg	Miligramas
Kg	kilogramas
g	Gramas
µg	Micrograma
NaCl	Cloreto de sódio
FDA	<i>Food and Drug Adminstration</i>
IgG	Imunoglobulina G
FC	Frequência Cardíaca

FR	Frequência Respiratória
TPC	Tempo de Preenchimento Capilar
TEMP	Temperatura
bpm	Batimentos por minuto
mpm	Movimentos por minuto
dL	Decilitro
G	Força G
x	Vezes
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction</i>
min	Minutos
BCoV1	Coronavírus bovino tipo 1
BCoV2	Coronavírus bovino tipo 2
BCoV3	Coronavírus bovino tipo 3
ROT1	Rotavírus bovino tipo 1
ROT2	Rotavírus bovino tipo 2
ROT3	Rotavírus bovino tipo 3
U	Unidades
µL	Microlitro
mM	Milimol
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
µM	Micromol
seg	Segundos
TM	Temperaturas de fusão
IQR	Intervalo quartiliano
L	Litros
M(s)	Momentos
M	Mucosas
L	Linfonodos
DRB	Doença respiratória bovina
GPMD	Ganho de peso médio diário
FTIP	Falha na transferência de imunidade passiva
ng	Nanograma
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>

ERO'S	Espécies Reativas de Oxigênio
He	Hemácias
Hb	Hemoglobina
Hto	Hematócrito
VCM	Volume Corpuscular Médio
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
Leu	Leucócitos totais
nm	Nanometro
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
IgM	Imunoglobulina M
APC	<i>Allophycocyanin</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
DHR-123	<i>Dihydrorhodamine-123</i>
mM	Milimolar
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
CO₂	Dióxido de carbono
fl	Fentolitro
pg	Picograma
Neu	Neutrófilos
Linf	Linfócitos
SOD	Superoxido dismutase

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior que
=	Igual
±	Mais ou menos
\$	Dólares
n°	Número
≥	Maior ou igual que
°C	Graus Celsius
≤	Menor ou igual que
®	Marca Registrada
-	Menos
+	Mais
*	Diferença estatística
†	Tendência
<	Menor que
h	Horas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	30
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	32
2.1	COLONIZAÇÃO BACTERIANA INTESTINAL	32
2.2	INTERAÇÃO DAS BACTÉRIAS INTESTINAIS COM O SISTEMA IMUNE	42
2.3	O USO PRECOCE DE ANTIMICROBIANOS E SUAS IMPLICAÇÕES NA COLONIZAÇÃO MICROBIANA INTESTINAL E SAÚDE DOS RECÉM-NASCIDOS.....	49
 CAPÍTULO 1 - INFLUÊNCIA DO USO PRECOCE DE ANTIMICROBIANO NA SANIDADE DE BEZERRAS HOLANDESAS NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA.....		
3	INTRODUÇÃO	59
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	62
4.1	MANEJO E SELEÇÃO DAS BEZERRAS RECÉM-NASCIDAS	62
4.3	MOMENTOS DE AVALIAÇÃO.....	68
4.4	AVALIAÇÃO CLÍNICA PERIÓDICA.....	69
4.5	COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	71
4.6	ANÁLISES LABORATORIAIS	72
4.6.1	Proteína total e sólidos totais.....	72
4.6.2	Determinação da matéria seca das fezes	72
4.6.3	Detecção de <i>Cryptosporidium</i> pela técnica de flutuação em solução saturada de sacarose	73
4.6.4	Multiplex hemi-nested RT-PCR para detecção de Coronavírus e Rotavírus do grupo A.....	74
4.7	ESTATÍSTICA	76
5	RESULTADOS.....	78
5.1	INTERVALO ENTRE O NASCIMENTO E INCLUSÃO EXPERIMENTAL....	78
5.2	QUALIDADE E VOLUME DO COLOSTRO FORNECIDO.....	78
5.3	PROTEÍNA TOTAL.....	82
5.4	EXAME CLÍNICO GERAL.....	82

5.5	ESCORES DE DOENÇAS.....	86
5.6	PESO E GANHO DE PESO	91
5.7	ETIOLOGIA DAS DIARREIAS	92
6	DISCUSSÃO	94
6.1	QUALIDADE DO COLOSTRO E TRANSFERENCIA DE IMUNIDADE PASSIVA	94
6.2	EXAME CLÍNICO GERAL.....	96
6.3	ESCORES DE DOENÇAS E DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DAS DIARREIAS	98
7	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS.....	105

CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DO USO PRECOCE DE ANTIMICROBIANO NA COLONIZAÇÃO BACTERIANA INTESTINAL DE BEZERRAS HOLANDEASAS NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA

8	INTRODUÇÃO	112
9	MATERIAL E MÉTODOS.....	115
9.1	MANEJO E SELEÇÃO DAS BEZERRAS RECÉM-NASCIDAS	115
9.4	MOMENTOS DE AVALIAÇÃO.....	118
9.5	COLHEITA, PREPARO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	119
9.6	ANÁLISES LABORATORIAIS	120
9.6.1	Extração de DNA total das fezes.....	120
9.6.2	Determinação da concentração do DNA bacteriano	121
9.6.3	Construção da curva-padrão para os ensaios de RealTime - PCR	122
9.6.4	Análises quantitativas das amostras fecais: PCR quantitativo (SybrGreen).....	124
9.7	ESTATÍSTICA	125
10	RESULTADOS.....	127
10.1	DINAMICA DAS PRINCIPAIS BACTÉRIAS DAS FEZES DE BEZERRAS NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA	127
11	DISCUSSÃO	133
12	CONCLUSÃO	142
	REFERÊNCIAS.....	143

CAPÍTULO 3 - INFLUÊNCIA DO USO PRECOCE DE ANTIMICROBIANO NO	
PERFIL INFLAMATÓRIO DE BEZERRAS HOLANDEASAS NO	
	PRIMEIRO MÊS DE VIDA..... 148
13	INTRODUÇÃO 149
14	MATERIAL E MÉTODOS..... 151
14.1	MANEJO E SELEÇÃO DAS BEZERRAS RECÉM-NASCIDAS 151
14.4	MOMENTOS DE AVALIAÇÃO 154
14.5	COLHEITA, PREPARO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS..... 155
14.6	ANÁLISES LABORATORIAIS 156
14.6.1	Hemograma..... 156
14.6.2	Eletroforese das proteínas séricas 156
14.6.3	Haptoglobina..... 157
14.6.4	Ferro 158
14.6.5	Imunofenotipagem 158
14.6.6	Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) 164
14.7	ESTATÍSTICA 166
15	RESULTADOS..... 168
15.1	ERITROGRAMA..... 168
15.2	FERRO 173
15.3	LEUCOGRAMA 174
15.4	BIOQUÍMICA E ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS 179
15.5	HAPTOGLOBINA 182
15.6	SUBPOPULAÇÕES E ATIVAÇÃO DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES E MONONUCLEARES 183
15.7	PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO'S)..... 189
16	DISCUSSÃO 191
17	CONCLUSÃO 200
	REFERÊNCIAS..... 201
18	CONCLUSÃO GERAL 207
	REFERÊNCIAS..... 208
	APÊNDICE 215
	ANEXOS 217

1 INTRODUÇÃO GERAL

O início do processo de colonização bacteriana não é consensual, porém a detecção de material genético de bactérias no líquido amniótico, mecônio e cordão umbilical de recém-nascidos têm fomentado a possibilidade de transferência vertical de microorganismos ainda no período fetal. Apesar disto, é consensual a intensificação da colonização intestinal no período pós-natal pelo contato dos recém-nascidos com microrganismos pertencentes à microbiota vaginal, intestinal e mamária da mãe, além daqueles pertencentes ao meio ambiente ao qual o neonato está inserido (MARTIN et al., 2012). Sendo assim, a composição da microbiota intestinal é dependente da composição da microbiota materna, tipo de parto (vaginal e cesariana), local de nascimento, dieta e uso de antimicrobianos (MATAMOROS et al., 2013).

As pesquisas envolvendo o estudo da colonização da microbiota intestinal em bovinos são muito escassas, entretanto existe uma pesquisa que demonstrou a presença de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em porções do jejuno proximal, jejuno distal e íleo em seis bezerros machos descolostrados, sacrificados em até 30 minutos após o nascimento (MALMUTHUGE et al., 2015). Estes dados sugerem que estas bactérias podem ter sido transferidas no período fetal ou provavelmente pela passagem do feto pelo canal do parto, considerando-se que a vagina é colonizada principalmente por bactérias do filo *Firmicutes* (*Lactobacillus*), *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2015). Esta hipótese também é endossada pela similaridade entre a microbiota vaginal e fezes das bezerras já na fase de aleitamento, no qual os filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* também foram os mais freqüentemente observados (OIKONOMOU et al., 2013; KLEIN-JOBSTL et al., 2014; MALMUTHUGE et al., 2014). Independente da origem é desejável que a trajetória do microbioma intestinal siga em direção a diversidade e riqueza (JERNBERG et al., 2010).

Nos últimos anos, as pesquisas têm demonstrado os efeitos benéficos das bactérias simbióticas no metabolismo, desenvolvimento do sistema imune e saúde intestinal. A elevada prevalência de diarreias entre 7 e 14 dias de vida (55,5% a 77,8%) em bezerras de leite tem sugerido interferências não desejáveis na relação microbiota e hospedeiro (NOVO et al., 2017). Dentre os fatores exógenos que

interferem na homeostase da mucosa intestinal destacam-se os antimicrobianos, que têm sido empregados direta ou indiretamente de forma ostensiva na criação de bezerras por meio da administração de colostro e leite contendo resíduos decorrentes do tratamento das vacas no período seco ou lactação; pela adição de antimicrobianos no leite e ração como promotores de crescimento; e pela administração parenteral dos antimicrobianos em doses metafiláticas muitas vezes realizado imediatamente após o nascimento das bezerras (IVES et al., 2015; SMITH, 2015).

Diante do exposto, a hipótese geral desta pesquisa é que o uso de antimicrobianos altera a microbiota, resposta inflamatória e ocorrência de diarreias em bezerras recém-nascidas. Assim, o objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a influência do uso precoce de antimicrobianos na colonização bacteriana intestinal, imunidade inata e ocorrência de diarreia em bezerras Holandesas do nascimento aos 28 dias de vida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este tópico apresentará os principais aspectos relacionados a colonização bacteriana intestinal e desenvolvimento da resposta imune pós-natal, assim como a influência do uso precoce de antibiótico nesse processo.

2.1 COLONIZAÇÃO BACTERIANA INTESTINAL

Nas últimas décadas a investigação científica e clínica identificaram a comunidade microbiana intestinal como um "super organismo" essencial para a relação saúde e doença. O corpo humano é colonizado por milhões de bactérias comensais, sendo que 90% delas representadas por 10^{14} células distribuídas em 400 espécies residem no intestino (GABORIAU-ROUTHIAU et al., 2009; WANG et al., 2012; AZIZ et al., 2013; VAZIRI et al., 2015).

Os microrganismos que residem de forma estável no ambiente intestinal constituem a microbiota residente, também denominada microbiota endógena ou autóctone. As bactérias presentes no intestino podem fazer parte de três populações sendo elas a comensal, simbiótica e patobiótica. As bactérias comensais são residentes permanentes do intestino e não oferecem benefício ou detrimento ao hospedeiro; as simbióticas são conhecidas pelas suas funções na promoção da saúde; e as patobióticas também são residentes permanentes da microbiota, porém possuem potencial para produzir doença (HOOPER et al., 1998; KOBOZIEV et al., 2014).

As bactérias simbióticas trazem uma série de benefícios ao hospedeiro, especialmente relativos ao metabolismo energético do hospedeiro pela digestão de hidratos de carbono não digeríveis, além da produção de vitaminas B e K (GABORIAU-ROUTHIAU et al., 2009; WANG et al., 2012; AZIZ et al., 2013; VAZIRI et al., 2015). Estes microrganismos também exercem atividade antibacteriana e imunomoduladora, por meio de distintos mecanismos: competição por sítios de ligação; produção de ambiente fisiologicamente restrito (pH e pressão O_2); produção de substâncias antimicrobianas; formação da barreira intestinal pela produção de

mucina, reduzindo a permeabilidade do epitélio; desenvolvimento de tolerância imunológica aos microorganismos comensais/simbióticos e resposta imune aos patobióticos (FERNÁNDEZ et al., 2013).

Os efeitos benéficos da microbiota também estão sendo observados nos estudos com os bezerros. Oikonomou et al. (2013) mostraram a relação entre a prevalência de *Faecalibacterium* nas fezes de bezerros na 1ª semana de vida com o ganho de peso pré-desmame e a baixa incidência de diarreia. Animais com alta prevalência desta bactéria ganharam em torno de 20,3% mais peso do que animais com baixa quantidade destas bactérias.

Em humanos, o desequilíbrio da microbiota intestinal pode contribuir para o desenvolvimento de inúmeras doenças em humanos, tais como a doença inflamatória do intestino, alergias, diabetes mellitus tipo 1, cancro do cólon, artrite reumatóide juvenil e vários distúrbios auto-imunes (WANG et al., 2012; ARVONEN et al., 2015) (Figura 1).

Figura 1 – Desregulação imunológica associada a disbiose da microbiota. (A) Microbiota saudável contendo uma composição balanceada com várias classes de bactérias. (B) Disbiose decorrente da alteração na composição da microbiota resultando na redução do número de bactérias simbióticas e um aumento na população de patobióticas resultando na inflamação.

Fonte: adaptado de Koboziev et al. (2014) por Martin, C. C. (2017).

A compreensão da complexa relação hospedeiro-microbiota e como ela pode ser modulada é de extrema importância para a saúde humana e animal. As descobertas sobre o papel da microbiota na saúde do hospedeiro vêm sendo beneficiadas pelo avanço nas técnicas de biologia molecular.

Antigamente, a identificação bacteriana era realizada utilizando técnicas de cultura e provas bioquímicas. Este processo é bastante demorado e trabalhoso, muitas bactérias não são fáceis de crescer e isolar, principalmente as anaeróbias, algumas são ainda oprimidas pelo crescimento de outras dificultando muito esse processo. O período de cultura pode variar dependendo da bactéria e do material utilizado para o isolamento, fazendo com que o tempo de leitura e resultado sejam variados. Desta forma, os métodos de cultura podem apresentar um resultado insatisfatório para a identificação da população bacteriana intestinal, subestimando a quantidade e complexidade dos microrganismos presentes. Estima-se que apenas 10 a 30% das bactérias presentes no intestino foram isoladas e identificadas pelos métodos tradicionais de cultura (LUKAS et al., 2007; JERNBERG et al., 2010; ELKJAER et al., 2013).

As técnicas de biologia molecular permitem a identificação do DNA bacteriano, DNA ribossomal e seqüenciamento genético e vêm auxiliando na compreensão e caracterização mais completa do chamado microbioma (WANG et al., 2012; AZIZ et al., 2013; VAZIRI et al., 2015). O microbioma de um indivíduo é definido como a totalidade de microrganismos e seus elementos genéticos presentes em um ambiente particular, como o corpo humano ou animal, sendo que cada indivíduo possui um microbioma particular e único (KNUDSEN et al., 2014). Alguns pesquisadores consideram os termos microbiota e microbioma como sinônimos, apesar de outros autores considerarem como microbiota o grupo de microrganismos que vivem num determinado local do organismo como, por exemplo no intestino (URSELL et al., 2012).

Os métodos de biologia molecular têm muitas vantagens em comparação com a técnica de cultura bacteriana tradicional, uma vez que são capazes de detectar o DNA bacteriano não dependendo do potencial de crescimento da bactéria, indicando todas as bactérias presentes na amostra não apenas as que podem ser cultivadas (ELKJAER et al., 2013). No entanto para a realização desta técnica não é necessário o crescimento dessas bactérias pesquisadas e desta forma não

conseguimos distinguir a presença de bactérias viáveis e não viáveis (HILL; DRASAR, 1975; PANDA et al., 2014).

O sequenciamento genético permite a identificação dos filos bacterianos, sendo que os principais encontrados em bezerros são *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. Os principais gêneros do filo *Firmicutes* são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Leuconostoc*, *Sharpea*, *Enterococcus*, *Fecaliobacterium*, *Ruminococcus* e *Eubacterium*; do filo *Bacteroidetes* são *Bacteroides*, *Prevotella* e *Parabacteroides*; do filo *Proteobacteria* são *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Campylobacter*, *Citrobacter* e *Enterobacter*; e no filo *Actinobacteria* está o gênero *Bifidobacterium* (OIKONOMOU et al., 2013; KLEIN-JOBSTL et al., 2014; MALMUTHUGE et al., 2014).

Inicialmente acreditava-se que a colonização bacteriana intestinal tinha início somente após o nascimento com o contato do feto com o meio externo. Entretanto, estudos recentes utilizando as técnicas de biologia molecular, sugerem que a colonização intestinal começa em pequena escala durante o período fetal demonstrada pela presença de bactérias no mecônio e cordão umbilical (JIMÉNEZ et al., 2005; MARTIN et al., 2012; FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013; GOSALBES et al., 2013).

Funkhouser e Bordenstein (2013) e Gosalbes et al. (2013) sugeriram a teoria de que as bactérias do intestino materno chegam até a placenta após serem capturadas por células dendríticas presentes no tecido linfóide associado ao intestino e placas de *Peyer* e são transportadas até os linfonodos, atingindo a corrente sanguínea e circulação fetal.

Jiménez et al. (2005) estudaram a presença de bactérias comensais no sangue do cordão umbilical de 20 neonatos nascidos de mães saudáveis por cesariana eletiva através da cultura do sangue e posterior análise por PCR. Os autores realizaram também a inoculação de *Enterococcus faecium* marcado em ratas prenhes por via oral e posteriormente avaliaram a presença desta bactéria no líquido amniótico. Nesta pesquisa foi observada a presença de bactérias em nove das vinte (45%) amostras de sangue do cordão umbilical e as bactérias isoladas foram *Enterococcus faecium*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus sanguinis*. Em relação à presença de *Enterococcus faecium* foi observado uma quantidade de $2,6 \pm 0,8$ log UFC/mL dessas bactérias no líquido amniótico das ratas prenhes, e por meio do PCR foi confirmado que estas bactérias

eram a cepa marcada. Os autores sugeriram que estas bactérias foram transferidas da mãe para o feto durante a gestação.

Satokari et al. (2009) realizaram um trabalho na Finlândia para detectar a presença de DNA, por meio da técnica de PCR, de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* na placenta de mulheres coletada assepticamente logo após o parto natural (n=25) ou por cesariana (n=9). Os autores observaram que todas as placentas oriundas de parto vaginal e oito de cesariana continham DNA de *Bifidobacterium*, enquanto que vinte e três placentas de parto vaginal e oito de cesariana apresentavam DNA de *Lactobacillus*. Os autores tentaram cultivar essas amostras utilizando meios de cultura não seletivos e não conseguiram isolar *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Desta forma os autores sugerem que o feto pode estar exposto ao DNA bacteriano via placenta e que esta exposição pode contribuir para o desenvolvimento de funções imunes no útero.

Gosalbes et al. (2013) realizaram um trabalho na Espanha utilizando o pirosequenciamento com o objetivo de caracterizar a microbiota presente no mecônio de 20 bebês saudáveis nascidos a termo (>37 semanas), de parto normal, de mães também saudáveis sem complicações gestacionais. Os autores detectaram duas populações bacterianas distintas predominantes no mecônio, uma caracterizada por bactérias da família *Enterobacteriaceae* (58,69%), principalmente representadas pelos gêneros *Escherichia* e *Shigella* (24,68%), e outra com predomínio de bactérias do filo *Firmicutes*, principalmente bactérias das famílias *Leuconostocaceae*, *Enterococcaceae* e *Streptococcaceae*, com predomínio dos gêneros *Leuconostoc* (25,86%), *Enterococcus* (16,79%), *Lactococcus* (14,01%), *Staphylococcus* (6,75%) ou *Streptococcus* (6,34%), mostrando a presença de uma grande diversidade bacteriana no mecônio.

Costa (2016) realizou trabalho sobre a influência das células do colostro na colonização intestinal de bezerras por bactérias aeróbias utilizando técnicas de cultura e provas bioquímicas. A autora observou o crescimento de poucas bactérias no mecônio, isolando apenas seis diferentes tipos bacterianos sendo eles: *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp. e bactéria não fermentativa.

Malmuthuge et al. (2015) utilizando o PCR em tempo real observaram grande proporção de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em porções do jejuno proximal, jejuno distal e íleo de seis bezerros machos descolostrados, sacrificados em até 30

minutos após o nascimento. Em contrapartida, estes animais apresentaram baixo número total de bactérias e *Escherichia coli* em relação aos animais sacrificados após 6 e 12 horas da ingestão do colostro. Os autores sugerem que as bactérias anaeróbias já estavam presentes no intestino no momento do nascimento.

Logo após o nascimento, os bezerros são expostos a inúmeras bactérias e a colonização intestinal é intensa. A partir deste momento, muitos fatores influenciam no processo de colonização, dentre os principais estão a composição da microbiota materna, local e forma do nascimento, padrão da dieta, condições de higiene e o uso de antimicrobianos (JERNBERG et al., 2010; GOSALBES et al., 2013).

A microbiota vaginal de mulheres, ratos e macacos apresenta baixa diversidade de espécies observando-se predomínio de bactérias do gênero *Lactobacillus*. Alguns estudos tentaram identificar a microbiota vaginal de bovinos através da cultura bacteriana e relataram o predomínio de enterobactérias (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2015). Laguardia-Nascimento et al. (2015) observaram, em sua pesquisa com o metagenoma vaginal de novilhas e vacas Nelore prenhes e vazias, que os três filos bacterianos mais abundantes foram *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*.

Pesquisas realizadas por Oikonomou et al. (2013), Klein-Jobstl et al. (2014) e Malmuthuge et al. (2014) sobre a diversidade fecal de bezerros utilizando o microbioma mostraram um predomínio de bactérias do filo *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* no conteúdo intestinal e fezes desses animais com 1 a 7 semanas de vida, até o desmame e com 3 semanas de idade, respectivamente. Laguardia-Nascimento et al. (2015) sugeriram que as semelhanças entre as bactérias vaginais e intestinais podem ser explicadas pela proximidade anatômica da vagina com o ânus. A ampla abertura da vagina permite a entrada de fezes e colonização por microrganismos do trato digestivo, sendo que muitas doenças do trato reprodutivo são causadas por microrganismos encontrados nas fezes.

A microbiota do trato gastrointestinal dos neonatos apresenta uma menor diversidade bacteriana quando comparado com adultos, a progressiva colonização ao longo da vida do animal aumenta essa diversidade.

A microbiota do trato gastrointestinal dos neonatos apresenta uma menor diversidade bacteriana quando comparado com adultos, a progressiva colonização ao longo da vida do animal aumenta essa diversidade. As primeiras bactérias a colonizar o intestino de recém-nascidos são as anaeróbias facultativas como

Staphylococcus, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Enterobacteriaceae*. Estas bactérias criam um ambiente com quantidades reduzidas de oxigênio ideal para a colonização por bactérias anaeróbias obrigatórias. Durante as primeiras 12 semanas de vida dos bezerros leiteiros, a composição bacteriana fecal sofre diversas alterações, que incluem o aparecimento de novas espécies como *Ruminococcus flavefaciens* e espécies de *Fibrobacter* associada a diminuição do *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Estes dados sugerem que a dieta e o desenvolvimento do intestino podem alterar a composição bacteriana intestinal durante o início da vida (MALMUTHUGE et al., 2014).

Lukas et al. (2007) realizaram estudo para avaliar o desenvolvimento pós-natal da população bacteriana no trato gastrointestinal de dois bezerros holandeses no primeiro mês de vida utilizando o PCR-DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). As primeiras bactérias observadas no intestino destes bezerros foram a *Escherichia coli* e *Bifidobacterium*, seguidas pelo *Faecalibacterium* a partir do 3º dia de vida até os 30 dias de vida. Estes autores também observaram pequena quantidade de *Lactobacillus* ao redor do décimo dia de vida dos bezerros.

Uyeno et al. (2010) realizaram uma pesquisa no Japão para monitorar a sucessão das comunidades bacterianas nas fezes de quatro bezerras holandesas até as 12 semanas de idade, alimentadas com substituto de leite duas vezes ao dia, utilizando sondas específicas para grupos bacterianos de interesse. Os autores verificaram que as sondas utilizadas na pesquisa detectaram 61,3 a 94,3% do total de 16S rRNA extraído das fezes dos bezerro, sendo que os principais filos pesquisados foram *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fibrobacteres* e *Proteobactérias*. Com uma semana de vida as bactérias predominantes foram aquelas dos gêneros *Bacteroides-Prevotella* (40,0%) e *Faecalibacterium* (21,7%) e o grupo *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* (16,7%) e o cluster *Atopobium* (10,09%), entretanto, com o avançar da idade observou-se aumento da população de *Faecalibacterium* e diminuição do cluster *Atopobium*. No início da vida também foram detectadas as bactérias do grupo *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*. As populações de *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* e *Enterobacteriaceae* também diminuiram à medida que o animal envelhecia, e esses grupos não foram mais detectados nas amostras de fezes dos animais com 9 semanas de idade. O grupo *Bacteroides-Prevotella* foi o predominante na

comunidade fecal na quinta (60,6%) e sétima (57,09%) semana de vida dos bezerros.

Uma pesquisa realizada na Alemanha por Mayer et al. (2012) sobre o desenvolvimento da microbiota fecal de bezerros recém-nascidos (n=14) utilizando o PCR-SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) demonstrou que as primeiras bactérias colonizadoras do intestino foram *Citrobacter* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., e em menor proporção *Bacteroides fragilis* e *Enterococcus faecalis*. Após 24 horas de vida as bactérias do gênero *Leuconostoc* spp. e *Citrobacter* spp. desapareceram. Inicialmente as bactérias lácticas estavam em maior proporção, após o primeiro dia de vida estas foram substituídas por bactérias coliformes, especialmente por *Escherichia coli* que manteve-se dominante das 24 horas até próximo dos 7 dias de vida dos bezerros. Após este período a população de *E. coli* diminuiu e algumas espécies de *Bacteroides* (*B. fragilis* e *B. vulgatus*) aumentaram.

A dinâmica da colonização bacteriana intestinal em bezerros leiteiros (n=61) machos de 1 a 7 semanas de vida utilizando o pirosequenciamento também foi estudada por Oikonomou et al. (2013). Os principais filos bacterianos observados ao longo do estudo foram *Firmicutes* (63,84 – 81,90%), *Bacteroidetes* (8,36 – 23,93%), *Proteobacteria* (3,72 – 9,75%), *Fusobacteria* (0,76 – 5,67%) e *Actinobacteria* (1,02 – 2,35%). No período do experimento foi observado um aumento constante na diversidade microbiana intestinal dos animais estudados. Houve um aumento do filo *Firmicutes* até a quarta semana de vida, em seguida a proporção deste grupo de bactérias diminuiu; o filo *Bacteroidetes* apresentou um perfil diferente, com aumento após a quarta semana de vida. No início do período de aleitamento observou-se predomínio do *Lactobacillus* spp., observando-se diminuição desta população com a introdução da dieta sólida.

Klein-Jobstl et al. (2014) realizaram um estudo na Austria utilizando o pirosequenciamento para avaliar a diversidade microbiana fecal de bezerros (n=6) da raça Simental em seis diferentes momentos entre o nascimento e o desmame realizada ao redor da 11ª semana de vida. Foi observado nesta pesquisa que logo após o nascimento havia um predomínio de bactérias do filo *Proteobacteria*, seguido por *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, já na segunda semana de vida ocorreu um intenso decréscimo na população de *Proteobacteria* e um aumento na população de *Bacteroidetes* com predomínio deste filo até próximo ao desmame. Foi observada

maior abundância de *Lactobacillus* e *Faecalibacterium* no primeiro mês de vida com posterior diminuição dessas populações bacterianas.

A colonização bacteriana intestinal pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles destacam-se a colostragem e o aleitamento, devido ao potencial desses alimentos em carrear inúmeras bactérias para o intestino do recém-nascido (JERNBERG et al., 2010; GOSALBES et al., 2013; MALMUTHUGE et al., 2015).

Malmuthuge et al. (2015) realizaram trabalho sobre a influência do colostro pasteurizado e congelado na colonização bacteriana intestinal por bactérias totais, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Escherichia coli* em bezerros machos (n=38) do nascimento até 12 horas de vida, utilizando o PCR em tempo real. Os autores observaram que o colostro facilita a colonização bacteriana intestinal. Os animais que não receberam colostro apresentaram um baixo número total de bactérias no intestino após 6 e 12 horas de vida. Os animais que receberam colostro não pasteurizado apresentaram maior proporção de bactérias com potencial patogênico (*E. coli*) na mucosa e conteúdo intestinal, enquanto os animais que receberam colostro pasteurizado tiveram maior proporção de bactérias benéficas (*Bifidobacterium*). Os autores acreditam que o aumento da população de *Bifidobacterium* no intestino de bezerros que recebem colostro pasteurizado ocorreu pela maior disponibilidade de oligossacarídeos neste tipo de colostro devido à quebra dos açúcares no momento da pasteurização (alta temperatura). Os oligossacarídeos são a principal fonte de alimento para o *Bifidobacterium*. Os autores verificaram também que 70,6% das bactérias presentes no colostro não pasteurizado eram *Escherichia coli* e não foram detectados *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, desta forma os autores sugerem que o colostro não é a fonte destas bactérias.

Em geral, o perfil da colonização bacteriana intestinal de bezerros no primeiro mês de vida demonstrado em várias pesquisas é bastante semelhante. No entanto, não é possível desconsiderar as variações individuais de cada animal e principalmente as diferenças na colonização entre as fazendas onde esses animais estão alojados (MAYER et al., 2012). Edrington et al. (2012) também observaram em sua pesquisa, já citada anteriormente, que o desenvolvimento da microflora fecal de bezerros em duas fazendas leiteiras de alta produção eram semelhantes nas primeiras semanas de vida, e foram diminuindo com o aumento da idade dos

animais. Este estudo indica que as duas fazendas, apesar do manejo semelhante, apresentavam populações bacterianas distintas.

Mayer et al. (2012) realizaram trabalho para avaliar as diferenças no desenvolvimento da microbiota fecal em bezerros (n=18) de 1 semana a 6 meses de vida provenientes de 6 fazendas leiteiras localizadas na região sul da Alemanha, os autores observaram grandes diferenças na microbiota fecal dos bezerros em todos os momentos da pesquisa. As menores semelhanças foram encontradas entre 0 h e 12 h e após 14 e 42 dias de vida. A similaridade entre as populações bacterianas foi maior das 24 horas aos 7 dias de vida, diminuindo a partir da segunda semana e permanecendo estável até 42 dias de vida.

Em geral, a figura 2 expressa os principais filos bacterianos encontrados nas fezes de bezerros entre a primeira e a sétima semana de vida.

Figura 2 - Prevalência dos principais filos bacterianos compondo o microbioma fecal de bezerros holandeses nas primeiras sete semanas de vida

Fonte: adaptado de Oikonomou et al. (2013) por Martin, C. C. (2017).

2.2 INTERAÇÃO DAS BACTÉRIAS INTESTINAIS COM O SISTEMA IMUNE

Durante o período fetal, o bezerro se desenvolve em um ambiente protegido de antígenos exógenos. O timo, baço e gânglios começam a se desenvolver durante as primeiras 9 semanas de gestação, enquanto que o tecido linfóide associado à mucosa (MALT) se desenvolve um pouco mais tarde com os linfonodos mesentéricos, tecidos linfóides difusos, e placas de *Peyer*. A imunidade inata também desenvolve-se gradualmente ao longo da gestação, entretanto a capacidade funcional dos fagócitos encontra-se reduzida ao redor do nascimento por estímulos hormonais maternos. O sistema imune adaptativo também desenvolve um conjunto completo de linhagens de células T e populações de células B periféricas, que estão presentes em pequenas quantidades, uma vez que o feto ainda não sofreu estímulos de antígenos exógenos (CHASE et al., 2008; CORTESE, 2009; TASCHUK et al., 2012).

Após o nascimento, os bezerros emergem do útero estéril para um ambiente repleto de microorganismos, que culmina com a intensificação do processo de colonização pós-natal. Devido a grande quantidade de microorganismos que colonizam o intestino, o sistema imunológico das mucosas deve estar apto para impedir o seu acesso a circulação sistêmica. Desta forma, o intestino dos mamíferos possui vários mecanismos imunes de proteção que atuam minimizando o contato dos microorganismos com o epitélio, além de detectar e destruir rapidamente aqueles microorganismos que penetram a barreira epitelial. Assim, as respostas às bactérias entéricas serão restritas ao intestino, minimizando as respostas imunológicas sistêmicas (KOBOZIEV et al., 2014).

O sistema imune das mucosas compreende vários tecidos organizados, tipos de células e macromoléculas especializadas na supervisão e coordenação das respostas imunes (TASCHUK et al., 2012). A barreira intestinal é composta primeiramente por muco e fatores antimicrobianos secretadas por diferentes células da mucosa local, como as células *Globet*, que secretam grande quantidade de muco e proteína glicosilada altamente resistente à digestão enzimática, além das células *Paneth* localizadas nas criptas intestinais que secretam defensinas e catelicidinas que permeabilizam a membrana das bactérias. Outras células epiteliais secretam potentes peptídeos microbianos como a lecitina, que são capazes de destruir

diretamente bactérias Gram-positivas (RESCIGNO et al., 2001; VERHASSELT, 2010; RESCIGNO, 2011; KOBOZIEV et al., 2014).

As defensinas são peptídeos antimicrobianos que tem um importante papel na defesa do trato gastrointestinal, pela sua capacidade de matar bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e vírus. Apenas a β -defensina é expressa no trato gastrointestinal dos bovinos a partir da 3ª semana de vida, sendo que a sua produção pelas células de *Paneth* é independente da colonização microbiana intestinal (MALMUTHUGE et al., 2012).

Um dos principais desafios do sistema imune é distinguir um grande número de agentes patogênicos a partir de um número limitado de receptores. Desta forma, há receptores que reconhecem uma grande variedade de padrões moleculares encontrados em microrganismos não eucariontes. As células apresentadoras de antígenos, como macrófagos, células dendríticas e os mastócitos, apresentam em sua superfície receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors* - PRR), moléculas que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (*Pathogen Associated Molecular Pattern* - PAMPs) compartilhados por um grande grupo de agentes infecciosos (KELLY; COUTTS, 2000; WERLING et al., 2006; WEN, et al., 2009).

Um importante grupo dos PRR são os receptores do tipo *toll* (*Toll-Like Receptors* - TLR). Estes receptores estão localizados nas superfícies celulares (TLR 1, 2, 4, 5, 6 e 10) ou em membranas endossômicas dentro das células (TLR 3, 7, 8 e 9), e reconhecem componentes bacterianos e virais, respectivamente. Uma grande variedade de componentes bacterianos são capazes de estimular a resposta imune inata, dentre eles estão o lipopolissacarídeo (LPS), peptideoglicano, ácidos lipoteicóicos, lipoarabinomanna (LAM) e DNA bacteriano. As bactérias Gram-positivas contêm parede celular composta por moléculas ativas, incluindo peptideoglicanas, ácidos lipoteicóicos e lipopeptídeos, enquanto as bactérias Gram-negativas são compostas por uma camada de peptideoglicanas recoberta por LPS (ADEREM; ULEVITCH, 2000; KELLY & COUTTS, 2000; WERLING et al., 2006; MALMUTHUGE et al., 2012).

Atualmente um total de 10 TLRs foram descritos em bovinos e cada um deles atua como receptor de uma ou mais moléculas microbianas específicas (MALMUTHUGE et al., 2012; ABDELFAH et al., 2015). O TLR4 foi o primeiro receptor de reconhecimento de padrões identificado. Este receptor está presente na

membrana celular e liga-se ao LPS encontrado na superfície de bactérias Gram-negativas. Já o TLR1, TLR2 e TLR6 estão envolvidos no reconhecimento de peptideoglicanos, lipoproteínas e um glicolípido, produtos presentes em bactérias Gram-positivas, micobactérias e leveduras. O TLR5 se liga a flagelina: principal proteína encontrada no flagelo de bactérias flageladas. O TLR9 é um receptor citoplasmático de ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano. Tanto o TLR7 e o TLR8 reconhecem o ácido ribonucleico (RNA) viral de fita simples, enquanto o TLR3 se liga ao RNA de fita dupla (ADEREM & ULEVITCH, 2000; WERLING et al., 2006; VENDRIG; FINK-GREMMELS, 2012; JACOBS; BRAUN, 2014).

Após a ligação de um TLR presente nas células a um PAMP microbiano, um sinal é enviado à célula e ocorre a ativação os genes que codificam as citocinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). As citocinas são formadas primeiramente como pró-moléculas que devem ser ativadas por uma enzima denominada caspase-1 (*CysteinyI-aspartat especific proteinases*), produzida após estimulação do complexo formado durante a ligação das moléculas microbianas com os TLRs. Diferentes TLRs desencadeiam a produção de diversas combinações de citocinas e diferentes PAMPs levam a geração de respostas distintas, mesmo por um único tipo celular (TIZARD, 2008).

Malmuthuge et al. (2012) estudaram a expressão gênica de TLRs nas células epiteliais do rúmen, jejuno, íleo, ceco e cólon de bezerros machos holandeses de 3 semanas (n=8) e 6 meses (n=8) de idade. Estes autores verificaram a existência de correlações positivas e negativas entre a população bacteriana total (16S rRNA) do intestino e a expressão dos TLRs. Os autores observaram que os TLRs 2, 6 e 9 apresentaram uma correlação negativa com a população bacteriana total, enquanto o TLR4 apresentou uma correlação positiva em bezerros de 3 semanas de idade. Os bezerros de 6 meses de idade apresentaram um perfil um pouco diferente, observado-se uma correlação positiva da população de bactérias total com a expressão dos TLRs 6 e 10 no cólon e no íleo, respectivamente. Em relação ao segmento intestinal, a população de bactérias total da mucosa apresentou correlação negativa com TLRs 1, 2 e 6 no cólon, rúmen e jejuno, respectivamente, enquanto a expressão do TLR6 teve uma correlação positiva com as bactérias da mucosa do íleo. Desta forma os autores afirmam que a expressão dos TLRs nas diferentes porções do intestino está relacionada com as bactérias encontradas nestas regiões, e que a idade dos animais também causa uma grande influencia na

expressão desses receptores uma vez que as populações bacterianas se alteram drasticamente com a faixa etária dos bezerros.

Durante a colonização intestinal é importante que o sistema imune diferencie as bactérias simbióticas e comensais dentre as patobióticas para que não ocorram respostas inflamatórias desnecessárias e sejam estabelecidos mecanismos de tolerância (MACPHERSON et al., 2005; SILVA et al., 2012).

As células dendríticas são responsáveis pelos mecanismos de tolerância aos microrganismos da microbiota. Evidências sugerem que as células dendríticas da Placa de Peyer do intestino delgado podem emitir pseudópodes que penetram por entre as células epiteliais, capturando continuamente microrganismos da microbiota residente via endocitose. Além disso, as células dendríticas presentes no intestino expressão baixos níveis de TLR2 e TLR4 em comparação as células dendríticas do sangue indicando sensibilidade diminuída às bactérias para evitar resposta imunes sistêmicas. Células denominadas células M, presentes entre o epitélio da mucosa, são especializadas e transportam microrganismos do lúmen por meio do processo de endocitose. Estes microrganismos são capturados pelas células dendríticas que encontram-se sob a membrana basal (FINK; FROKAER, 2008; TASCHUK et al., 2012; KOBOZIEV et al., 2014). A interação entre as células dendríticas e os microrganismos ocorre por meio dos receptores TLR e PAMP. Estas células migram para os linfonodos mesentéricos e Placa de Peyer para a apresentação do antígeno aos linfócitos TCD4⁺, que irão proliferar-se e diferenciar-se em células T regulatórias (Treg). Em seguida, estas células retornam para a lâmina própria intestinal e liberam as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β (*Transforming Growth Fator*) (VERHASSELT, 2010; RESCIGNO, 2011; KOBOZIEV et al., 2014).

Outro mecanismo utilizado pelo sistema imunológico para diminuir o contato entre as bactérias entéricas e as células epiteliais é a secreção de imunoglobulina A (IgA). As células dendríticas localizadas nas Placas de Peyer e na lâmina própria capturam continuamente bactérias presentes no lúmen via endocitose e as transportam para os linfonodos mesentéricos através dos vasos linfáticos que induz a ativação e diferenciação das células B *naive* em plasmócitos para produção de IgA específica para bactérias comensais. Estas células saem da Placa de Peyer e linfonodos mesentéricos e migram para a lâmina própria e secretam IgA no interstício intestinal, em seguida, os anticorpos serão transportados para a parte apical da célula por meio de mecanismos de endocitose mediada por receptores

específicos localizados nos enterócitos e serão secretados para o lúmen. A abundância das células plasmáticas secretoras de IgA intestinal dependem da presença de bactérias comensais no intestino. A IgA secretória limita a habilidade das bactérias comensais em penetrar a mucosa intestinal. Além disso, as bactérias transportadas para os linfonodos mesentéricos não conseguem alcançar a circulação sistêmica, não induzindo respostas imunes desnecessárias e inflamação em órgãos distantes (MACPHERSON; UHR, 2004; MACPHERSON; SLAKE, 2007; KOBOZIEV et al., 2014).

As células B e T ativadas podem passar para a circulação sistêmica e povoar lugares distantes da sua origem, isso permite que o restante da mucosa intestinal seja povoado por células que auxiliam no controle da penetração da mucosa por bactérias comensais (MACPHERSON et al., 2005) (Figura 3).

Figura 3 – Mecanismos imunes envolvidos no processo de tolerância imunológica às bactérias que colonizam o intestino do hospedeiro.

Fonte: adaptado de Macpherson et al. (2005) por Martin, C. C. (2017).

Legenda: DC: células dendríticas; MLN: linfonodos mesentéricos.

Inevitavelmente algumas bactérias patobióticas irão conseguir driblar todos os mecanismos já descritos e chegarão à lâmina própria onde serão fagocitadas e destruídas pelos macrófagos intestinais. Estas células têm características

diferenciadas dos macrófagos presentes na circulação, pois produzem baixas quantidades de citocinas inflamatórias limitando assim a inflamação, apesar da sua atividade antimicrobiana efetiva (KOBOZIEV et al., 2014).

Após a invasão do tecido intestinal, outras respostas imunes também podem ser desencadeadas. Com o reconhecimento dos antígenos pelas células apresentadoras de antígenos, esses são carregados para os linfonodos mesentéricos onde irão estimular células T auxiliares (CD4⁺), posteriormente diferenciadas nas linhagens Th1 e Th17. Essas células T ativadas retornam a lâmina própria e liberam citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ IL-17, IL-22, IL-21 e TNF- α , que ativam células apresentadoras de antígenos, especialmente macrófagos, resultando na geração adicional das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12, além das espécies reativas do oxigênio como o superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. Estes mediadores inflamatórios amplificam a atividade microbida de macrófagos e aumentam a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, VICAM-1 e E-selectina) na superfície das células endoteliais, facilitando o recrutamento adicional de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o tecido epitelial (MACPHERSON et al., 2005; VERHASSELT, 2010; KOBOZIEV et al., 2014).

A imunidade intestinal é regulada pela ação de células T regulatórias (Tregs) que possuem a função de suprimir ou limitar o desenvolvimento de lesão tecidual inflamatória após a invasão por microorganismos. Uma ampla quantidade de respostas é suprimida, principalmente as que dependem da produção de IL-10, TGF- β e a expressão da transcrição do fator Foxp3. Defeitos na função Treg associados à perda de expressão de Foxp3, IL-10 ou TGF- β estão associados a inflamação intestinal. A presença de certas populações microbianas dentro da microbiota comensal do intestino estimula o desenvolvimento de Tregs dentro do intestino e ao tecido linfóide associado à Placa de *Peyer* e linfonodos mesentéricos (KOBOZIEV et al., 2014; KOCH et al., 2016).

A modulação da resposta imune por *Lactobacillus* associado ou não à infecção por rotavírus foi estudada por Wen et al. (2009). Para tanto, foi avaliado o perfil de citocinas e a expressão dos receptores TLR2, TLR3 e TLR9 que reconhecem peptidoglicanos, RNA de fita dupla e CpG DNA, respectivamente. Foram utilizados suínos *germ free* distribuídos em quatro grupos: grupo 1 - inoculado com *Lactobacillus*; grupo 2 - inoculado com rotavírus; grupo 3 - inoculado com *Lactobacillus* e rotavírus; e grupo 4 controle não inoculado. Os três grupos

inoculados apresentaram frequências altas da expressão de TLR2 em células apresentadoras de antígenos do baço e sangue, entretanto o grupo 1 apresentou 6 a 21 vezes mais expressão de TLR2 quando comparado com o grupo 2 e o grupo controle, indicando o envolvimento do TLR2 no reconhecimento principalmente da colonização por *Lactobacillus* e em menor escala da infecção por rotavírus. O grupo 3 apresentou maior expressão de TLR3 e TLR9 em células apresentadoras de antígenos do baço quando comparado com o grupo 1, já no sangue a expressão de TLR9 foi alta em animais dos grupos 1 e 3. Os animais que receberam apenas rotavírus (G2) apresentaram baixa expressão do TLR9 no sangue. Em relação às citocinas séricas, a concentração de IFN- γ e IL-4 foi maior no grupo 3 em relação ao grupo 2 sugerindo um efeito adjuvante do *Lactobacillus* nas respostas de tipo Th1 e Th2, por outro lado as concentrações de IFN- α foram maiores no grupo 2 quando comparadas ao grupo 3. A resposta da IL-12 foi estimulada tanto pela infecção por rotavírus como pela colonização por *Lactobacillus*. As concentrações da IL-10 não diferiram significativamente entre os grupos, mas houve uma tendência para maiores concentrações no grupo 2. Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação aos níveis de IL-6 e TNF- α .

2.3 O USO PRECOCE DE ANTIMICROBIANOS E SUAS IMPLICAÇÕES NA COLONIZAÇÃO MICROBIANA INTESTINAL E SAÚDE DOS RECÉM-NASCIDOS

A comunidade bacteriana intestinal deve ser altamente diversificada, complexa e manter uma relação equilibrada com o hospedeiro. Desequilíbrios podem interromper a homeostase intestinal tornando os recém-nascidos susceptíveis às infecções intestinais por prejudicar o desenvolvimento da resposta imune de mucosa.

Muitos fatores influenciam a composição e estabelecimento da microbiota intestinal, dentre todas as influências exógenas, os agentes antimicrobianos são capazes de causar as mais rápidas e drásticas mudanças na microbiota. A terapia com antimicrobianos afeta não apenas os patógenos, mas também as bactérias simbióticas. A extensão do impacto do uso de antimicrobianos na microbiota depende de alguns fatores como o espectro de ação do antimicrobiano, tempo de

exposição, dose utilizada, via de administração e propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do medicamento (JERNBERG et al., 2010).

O uso de antimicrobianos na criação de bezerras pode ter objetivo terapêutico, profilático, metafilático ou como promotor de crescimento. O termo profilaxia e metafilaxia são semelhantes. A metafilaxia é definida como o tratamento de um grupo de animais logo após o surgimento das primeiras manifestações clínicas ou sinais inaparentes, já a profilaxia consiste no tratamento preventivo de um indivíduo ou grupo de animais contra uma determinada enfermidade antes do surgimento de qualquer manifestação clínica (REZENDE, 2010; IVES et al., 2015). Alguns estudos demonstram que 90% dos agentes antimicrobianos são usados na pecuária para promover a profilaxia ou crescimento (SHARMA et al., 2008). Em bezerras recém-nascidas observa-se o uso indiscriminado de antimicrobianos na metafilaxia das doenças entéricas e respiratórias nos primeiros dias de vida (IVES et al., 2015; SMITH, 2015).

Os agentes antimicrobianos são muitas vezes adicionados ao leite ou sucedâneo para metafilaxia de doenças em bezerras na fase de aleitamento (BERGE et al., 2009). Uma pesquisa em 113 propriedades leiteiras na Pensilvânia mostrou que 70% das bezerras eram aleitadas com substitutos do leite contendo oxitetraciclina e neomicina (RADISSON et al., 1956; BERGE et al., 2009). Além disso, o leite de vacas tratadas com antibióticos para mastite e outras doenças infecciosas no pós-parto leite vem sendo aproveitado para o aleitamento das bezerras (CHARDAVOYNE et al., 1979; LANGFORD et al., 2003).

Os parágrafos a seguir apresentarão o efeito dos antimicrobianos sobre a composição da microbiota intestinal dos recém-nascidos, e a sua influência na ocorrência das diarreias.

Gronlund et al. (2000) demonstraram a interferência do uso precoce de antibiótico (ampicilina) na composição da microbiota intestinal de bebês nascidos por cesariana do nascimento aos 6 meses de idade. Estes autores observaram que o tratamento de mães ao final do período gestacional com antibióticos influenciou no desenvolvimento da microbiota de bebês nascidos por cesariana, as taxas de colonização por *Bacteroides fragili*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* foram significativamente mais baixos durante o primeiro mês de vida em crianças nascidas de mães que receberam antibiótico. Nenhuma das crianças nascidas por cesariana apresentou colonização permanente com *Bacteroides fragili* antes dos 2 meses de

idade, enquanto que 52 a 79% das crianças nascidas de parto normal foram colonizadas com estas bactérias neste período. Aos 6 meses de idade, a taxa de colonização por *Bacteroides fragili* nos bebês nascidos por cesariana ainda era apenas a metade (36%) de que nos lactentes de parto normal (76%). Assim podemos observar que o efeito imuno-estimulante das bactérias intestinais fica prejudicado após o uso de antibiótico.

Antonopoulos et al. (2009) estudaram a influência do uso de antibióticos (amoxicilina - 3,0mg, metronidazol- 0,69mg e bismuto - 0,185mg) administrado por via oral na população bacteriana intestinal de ratos de 4 a 6 semanas de idade, utilizando a técnica do pirosequenciamento. Os principais filos bacterianos encontrados no trato gastrointestinal dos animais que não receberam antibióticos foram *Firmicutes* (74,4%) e *Bacteroidetes* (23,3%), e em pequena quantidade *Proteobacteria* (1,1%), enquanto os animais tratados com a associação de antibióticos apresentavam maior quantidade de bactérias do filo *Proteobacteria* (75,5%) e pequenas quantidades de *Firmicutes* (7,5%) e *Bacteroidetes* (16,8%). No grupo de animais que recebeu a associação de antibióticos foi observado após 2 semanas da interrupção do tratamento que os filos *Firmicutes* (70,1%) e *Bacteroidetes* (22,1%) voltaram à dominância e a população de *Proteobacteria* (6,0%) diminuiu.

Oultram et al. (2015) realizaram pesquisa sobre o efeito de antibióticos (florfenicol – 40mg/Kg por via subcutânea, tulatromicina - 2,5 mg/Kg por via intramuscular e oxitetraciclina – 20mg/Kg por via subcutânea) na diversidade microbiana fecal de bezerros neonatos nas primeiras 7 semanas de vida, utilizando o pirosequenciamento. Os autores detectaram diferença na população de bactérias do gênero *Lactobacillus* de animais tratados com antibióticos em relação a bezerros não tratados. A riqueza total das espécies também foi alterada, sendo que animais que receberam florfenicol e tulatromicina tiveram uma redução significativa na riqueza de espécies bacterianas presentes nas fezes.

Arvonen et al. (2015) realizaram um estudo retrospectivo na Finlândia utilizando fichas médicas para avaliar a influencia da exposição repetida a antibióticos no desenvolvimento de artrite reumatóide juvenil. Neste estudo foi possível observar que o desenvolvimento da doença está associado ao uso de antibióticos na infância, principalmente cefalosporinas e lincosamidas, desta forma o uso de antibióticos é um fator de risco para a doença. Os autores sugerem que isso

ocorre devido à disbiose intestinal causada pelos antibióticos. Pacientes com artrite reumatóide juvenil apresentam menor nível de expressão de TLR 2 e 4 na mucosa intestinal e baixa expressão de mediadores anti-inflamatórios na mucosa intestinal como FoxP3 e interleucina 10. O excesso de antígenos através da barreira intestinal pode levar a ativação das células T da mucosa pelas células dendríticas predispondo o indivíduo à artrite.

A diarreia em bezerros no período neonatal é uma doença complexa e multifatorial, os agentes infecciosos mais importantes envolvidos na etiologia da doença em todo o mundo são *Escherichia coli* enterotoxigênica, rotavírus, coronavírus e *Cryptosporidium parvum*. Foi relatada prevalência de diarreia em bezerros de 2,6 a 45,1%, 17,7 a 79,9%, 3,1 a 21,6% e 27,8 a 63,0% para *E. coli*, rotavírus, coronavírus e *C. parvum*, respectivamente. Muitas vezes é observada a presença simultânea de mais de um desses agentes causando um aumento das taxas de morbidade e mortalidade (SANTIN et al., 2004; SILVERLS et al., 2010; BARTELS et al., 2010; UHDE et al., 2014).

O efeito das diarreias sobre o microbioma intestinal de bezerros entre 1 a 7 semanas de vida foi apresentado por Oikonomou et al. (2013). Estes autores demonstraram que existem diferenças entre as populações de bactérias em bezerros com e sem diarreia. Animais que apresentaram diarreia tinham uma diversidade bacteriana intestinal menor quando comparados aos animais que não apresentavam diarreia, a diarreia dos bezerros utilizados no estudo não foi tratada com antibióticos e, portanto a redução da diversidade bacteriana intestinal se deve provavelmente a presença da diarreia. O *Faecalibacterium* spp. apresentou uma correlação negativa com a presença de diarreia, bezerros que continham maior prevalência desta bactéria nas fezes durante a primeira semana de vida tiveram uma ocorrência significativamente menor de diarreia durante o período neonatal. Os autores observaram também que os animais que possuíam uma maior diversidade bacteriana intestinal apresentavam maior ganho de peso, dessa forma a diarreia tem um efeito negativo sobre o ganho de peso pela diminuição da diversidade bacteriana intestinal.

Donovan et al. (2002) avaliaram a influencia do antimicrobiano e probiótico no crescimento e saúde dos bezerros utilizando um grupo de bezerros holandeses (n=45) alimentados com leite suplementado com antibióticos (oxitetraciclina - 138 mg/kg e sulfato de neomicina - 276 mg/kg) e outro grupo alimentado com leite

contendo probióticos (Enteroguard - 129 mg/kg) do nascimento as 5 semanas de idade. Os autores observaram que não haviam diferenças entre os grupos na ocorrência e gravidade da diarreia, ganho de peso, eficiência alimentar e desempenho dos bezerros durante as 5 primeiras semanas de vida.

Heinrichs et al. (2003) avaliaram os efeitos da alimentação com substituto do leite contendo antibióticos (neomicina - 400 g/440 kg e oxitetraciclina - 200 g/440 kg) ou oligossacarídeos no crescimento e saúde de bezerras leiteiras até as 6 semanas de idade. Para a pesquisa foram utilizados setenta e duas bezerras holandeses distribuídas entre os dois grupos tratados e um grupo controle, os animais foram avaliados do nascimento até seis semanas de vida. Os autores observaram que os animais do grupo que recebeu leite com antibiótico e leite com oligossacarídeos tinham maior probabilidade de apresentar fezes normais, quando comparados com animais do grupo controle. Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à probabilidade dos animais desenvolverem diarreia intensa. Em relação ao consumo de alimentos, o grupo de bezerros que recebeu leite com oligossacarídeos apresentou maior ingestão de grãos na sexta semana do experimento, enquanto o grupo que recebeu leite contendo antibióticos consumiu a menor quantidade de grãos. Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação ao crescimento. Desta forma os autores concluem que as diferenças no escore de fezes e ingestão de grãos observados nos grupos que receberam antibiótico ou oligossacarídeos não foram suficientes para aumentar o crescimento dos bezerros durante as seis semanas do estudo.

Berge et al. (2009) utilizando bezerras leiteiras recém nascidas (n=358) até os 28 dias de idade oriundas de fazenda de alta produção mostraram que os bezerros alimentados com leite contendo sulfato de neomicina (0,054g) e tetraciclina (0,108g) apresentaram um maior número de dias com diarreia e tinham 28% mais risco de ter diarreia quando comparado com animais que receberam leite sem antibióticos. O autor relata que este achado pode ocorrer devido às alterações na população de bactérias entéricas comensais causadas pelo uso de antibióticos.

Pereira et al. (2016) realizaram um estudo na universidade de Cornell nos Estados Unidos para avaliar a ingestão de leite contendo baixas concentrações de antibióticos sobre a composição da microbiota fecal de bezerros machos (n=30) do nascimento até seis semanas de idade, os bezerros foram divididos em dois grupos onde o grupo controle recebeu leite cru sem a adição de antibióticos e o grupo

tratado recebeu leite contendo baixas concentrações de ampicilina (0,01 µg/ml), ceftiofur sódico (0,1 µg/ml), penicilina G (0,005 µg/ml) e cloridrato de oxitetraciclina (0,3 µg/ml) na tentativa de mimetizar o leite de descarte. Os autores observaram que os filos bacterianos mais comuns detectados em ambos os grupos foram *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobactérias*, *Verrucomicrobia* e *Tenericutes*. Não foram observadas diferenças significativas na abundância relativa dos filos e no índice de riqueza dos filos entre os grupos. Em relação aos gêneros bacterianos o único que foi significativamente diferente entre os grupos durante pelo menos uma semana foi a *Veillonella* spp. Os dados combinados das semanas 1 a 7 mostraram que a abundância relativa de *Clostridium* spp. e *Streptococcus* spp. foi significativamente reduzido nas amostras de fezes dos bezerros que receberam leite contendo antibióticos quando comparadas às amostras do grupo controle.

Edrington et al. (2012) estudaram o desenvolvimento da microflora fecal, utilizando-se o pirosequenciamento, em bezerros leiteiros alimentados com leite residual (leite de descarte) pasteurizado ou residual fresco entre a 1ª semana de vida e os 6 meses de idade. Inicialmente, a diversidade bacteriana era menor nos animais que receberam leite residual pasteurizado em comparação aos animais que receberam leite residual fresco. A partir da 2ª semana de vida aos 6 meses de idade, o grupo que recebeu leite residual pasteurizado apresentou maior diversidade bacteriana fecal. *Proteobacteria* foi o filo predominante nas 2 primeiras semanas de idade diminuindo com 4 semanas; bactérias dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* foram as mais prevalentes a partir da 4ª semana de idade independente do tipo de leite fornecido. *Salmonella* foi detectada em bezerros com 1 semana de vida que receberam leite residual fresco, 64% dos bezerros deste grupo apresentaram níveis detectáveis desta bactéria, enquanto nenhum animal alimentado com leite residual pasteurizado foi positivo para *Salmonella*.

Os efeitos da tulatromicina por via injetável na ocorrência de doenças e no crescimento de bezerras foram estudadas por Stanton et al. (2013). Os autores acompanharam durante 8 semanas 788 bezerras oriundas de 5 fazendas localizadas na região oeste do estado de Nova York, esses animais foram distribuídos em dois grupos de forma aleatória, um grupo recebeu uma dose de tulatromicina (1 mL – aproximadamente 2,5 mg/Kg) por via subcutânea entre 0 e 10 dias de vida, enquanto o outro grupo recebeu 1 mL de uma solução contendo propilenoglicol e soro fisiológico estéril (0,9% NaCl) neste mesmo período, os

animais foram monitorados duas vezes ao dia para a detecção de sinais de doença e o crescimento dos animais também foi avaliado. A diarreia foi detectada em 87% dos animais do grupo controle e em 80% dos animais tratados com tulatromicina, dessa forma os bezerros do grupo controle tiveram 1,8 vezes mais chances de apresentar diarreia. Os bezerros tratados com tulatromicina tiveram menor probabilidade de desenvolver otite média (unilateral ou bilateral) em relação aos bezerros do grupo controle. Em relação à incidência de doença respiratória não foram observadas diferenças entre os grupos. O ganho de peso do grupo de bezerros que receberam tulatromicina foi $0,02 \pm 0,01$ kg/dia maior em relação aos animais do grupo controle ($P=0,010$). Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à taxa de mortalidade.

Ramirez et al. (2015) estudou a eficácia da metafilaxia antimicrobiana em suínos utilizando 732 animais de quatro rebanhos. Os animais foram divididos em dois grupos, dentro desses grupos os animais foram divididos em quartis de acordo com o peso, um grupo recebeu uma dose intramuscular de tulatromicina (2,5 mg/Kg) entre os 110 e 121 dias de idade e o outro grupo não recebeu antibiótico, foi realizada a pesagem dos animais e o ganho de peso foi utilizado como medida de saúde e produtividade. Considerando o total de animais de cada grupo não foram observadas diferenças no ganho de peso entre os grupos. Em relação ao quartil de animais mais leves foi observado que os animais que receberam antibiótico tiveram um maior ganho de peso quando comparados com o grupo que não recebeu antibióticos, essa diferença entre os grupos no ganho de peso só foi observada no quartil de animais mais leves. Não foi possível verificar diferenças entre os grupos em relação aos índices de mortalidade. Apesar do melhor ganho de peso observado no quartil dos animais mais leves que receberam antibióticos o custo desse tratamento (trabalho para administração mais preço do medicamento) é elevado, de aproximadamente \$4,46 por animal, não compensando financeiramente a aplicação do antibiótico mesmo com o aumento do peso em um grupo de animais.

Além da influência dos antibióticos na imunidade e saúde de humanos e animais o seu mau uso vem sendo associado à seleção e propagação de bactérias resistentes. A resistência antimicrobiana vem sendo observada há décadas após a utilização indiscriminada de antibióticos e continua a ser uma grande preocupação com a saúde pública (KANEENE et al., 2008; SMITH, 2015).

Bactérias resistentes são freqüentemente isoladas a partir da microbiota intestinal de animais de produção. A resistência que essas bactérias carregam não é um problema por si só, mas a transferência dos elementos de resistência para patógenos zoonóticos tem sérias implicações para saúde humana e animal (KANEENE et al., 2008; SHARMA et al., 2008).

O uso do antimicrobiano não causa diretamente o desenvolvimento da resistência, mas leva a uma pressão seletiva que permite o desenvolvimento de bactérias resistentes ao antibiótico. Uma vez que a resistência se estabeleceu em bactérias não patogênicas estas podem transferir estes genes por meio de plasmídeos e integrons para organismos patogênicos. A transferência de genes que conferem ao patógeno vantagem seletiva em relação ao hospedeiro tem o potencial de serem rapidamente espalhados dentro da população bacteriana (KANEENE et al., 2008).

O aumento da pressão da comunidade e de consumidores para reduzir o uso de antimicrobiano na pecuária tem encorajado o desenvolvimento de sistemas de gestão que minimizam o uso de antimicrobianos. Tendo como base esses cuidados iniciou-se em muitos países programas para o uso responsável de antibióticos em animais (BERGE et al., 2009; BRIYNE et al., 2013).

Desde o final da década de 1990 a União Européia iniciou um programa de uso responsável de antibióticos com inúmeras estratégias, recomendações e diretrizes com o objetivo de controlar a utilização de antibióticos e reduzir a pressão seletiva de cepas resistentes, uma das medidas mais importantes foi à proibição da venda de substitutos do leite e outros alimentos contendo antibióticos (BERGE et al., 2009; BRIYNE et al., 2013). Nos EUA uma regulamentação federal, que começou em 2010, restringe a alimentação com substitutos do leite contendo antibióticos para um período de 7 a 14 dias, assim a alimentação com leite contendo antibióticos do nascimento ao desmame não é mais permitida, agora os substitutos do leite contendo medicamentos devem ser utilizados para o tratamento de infecções e não para a profilaxia. A Austrália e Nova Zelândia também possuem leis rigorosas em relação ao uso de alimentos contendo antimicrobianos para alimentação animal (SMITH, 2015).

A agência governamental americana (*Food and Drug Administration* - FDA) iniciou em 2012 um programa com o objetivo de prevenir a resistência a antimicrobianos em humanos, os quais são usados na alimentação animal. Parte

importante deste programa entrou em vigor a partir de 1º de janeiro de 2017. Com as novas regulamentações, a venda de medicamentos para uso na alimentação animal está limitada a prescrição do medicamento por médicos veterinários autorizados. Todos os produtos para melhoria da eficiência alimentar, bem como os promotores de crescimento, serão controlados. Além disso, os antimicrobianos clinicamente importantes em medicina humana passaram a ser autorizados apenas para o uso terapêutico (FDA, 2017).

**CAPÍTULO 1 - INFLUÊNCIA DO USO PRECOCE DE ANTIMICROBIANO NA
SANIDADE DE BEZERRAS HOLANDESAS NO PRIMEIRO MÊS
DE VIDA**

3 INTRODUÇÃO

O custo do ciclo de produção de bezerra à novilha com 22 a 24 meses é ao redor de U\$ 1124,06, perdendo apenas para os gastos com a alimentação das vacas em lactação. Todo este investimento, além da expressão do máximo potencial genético das fêmeas, pode ser diluído por erros de manejo nutricional e sanitário (GABLER; TOZER; HEINRICHS, 2000; HEINRICHS; HEINRICHS, 2011). O aumento da idade ao 1º parto está relacionada ao tratamento de bezerras doentes com antimicrobianos (HEINRICHS et al., 2005), além disso o número de dias de doença ou tratamentos antes dos 4 meses de vida apresentou efeito significativo na produção de leite na primeira lactação (HEINRICHS; HEINRICHS, 2011).

A adaptabilidade das bezerras recém-nascidas às condições ambientais pós-nascimento é crítica à sua sobrevivência, devido a imaturidade funcional e regulatória dos órgãos. As bezerras nascem hipogamaglobulinêmicas e possuem sistema imune adaptativo *nãive*, além de imunossuprimidas em função da interação entre os hormônios e citocinas presentes no ambiente materno-fetal. Apesar de apresentarem todos os componentes essenciais, a montagem da resposta imune pós-natal inicialmente é lenta e de baixa intensidade, devido à imaturidade funcional das células imunes. Assim, as bezerras são dependentes da proteção materna transferida pela mamada do colostro (BARRINGTON; PARRISH, 2001; CHASE et al., 2008). Estes fatores, associados a erros de manejo, predispõem à instalação dos agentes causadores de diarreias e broncopneumonias.

A morbidade por diarreia neonatal e broncopneumonias em bezerras é ao redor de 23% e 21,9%, respectivamente, entre o nascimento e desmame. A taxa de mortalidade observada na fase de aleitamento é de aproximadamente 3,5%, observando-se pico máximo de mortes ao redor dos 19 dias de vida. A falha na transferência de imunidade passiva (proteína total $\leq 5,7$ g/dL) está associada com a precocidade e aumento da incidência de broncopneumonias (WINDEYER et al., 2014).

Diante do exposto, a metafilaxia tem sido usada com o objetivo de melhorar a sanidade, além do aumentar o desempenho e diminuir a mortalidade das bezerras (IVES et al., 2015). A metafilaxia é definida como o tratamento de um grupo ou população de bovinos com a administração de antimicrobianos de longa

ação para tratar precocemente as doenças ainda na sua forma inaparente. Muitas vezes a escolha do tratamento metafilático é feita de forma generalizada devido a dificuldade dos produtores em identificar de maneira precoce todos os animais que apresentam doença (NICKELL; WHITE, 2010; IVES et al., 2015). Atualmente existem oito antimicrobianos injetáveis (danofloxacina, enrofloxacina, tulatromicina, ceftiofur, tilmicosina, florfenicol, tildipirosina e gamitromicina), além de quatro antimicrobianos orais (oxitetraciclina, tilmicosina, clortetraciclina e clortetraciclina associada com sulfadiazina) aprovados internacionalmente para o uso metafilático para a doença respiratória em bovinos (IVES et al., 2015).

Em relação às diarreias, os antimicrobianos têm sido ostensivamente usados para o tratamento ou prevenção das diarreias. Walker et al. (2012) realizaram um estudo nos Estados Unidos para avaliar as práticas de uso de antimicrobianos em fazendas leiteiras. Estes autores observaram que 83% dos animais haviam sido tratados com antimicrobianos para a diarreia, além disso, relataram que 50% das bezerras com diarreia haviam recebido mais de um tipo de antimicrobianos. Nesta pesquisa também foi detectado que 56% das propriedades utilizavam leite contendo antimicrobianos e 54% das propriedades utilizavam antimicrobianos para prevenir casos de diarreia ou doença respiratória. Apenas 65% das propriedades tinham diretrizes escritas sobre o uso de antimicrobianos para o tratamento das principais enfermidades. Os benefícios do uso dos antimicrobianos no leite para a prevenção das diarreias são muito controversos. Berge et al. (2009) demonstraram que o uso de leite suplementado com oxitetraciclina e neomicina aumentou o risco para o desenvolvimento de diarreias em 28%. Além disso, Donovan et al. (2002) e Heinrichs et al. (2009) não encontraram diferenças no desempenho de bezerras que receberam leite suplementado com oxitetraciclina e/ou neomicina.

A complexidade da etiologia das diarreias neonatais tem sido base para os questionamentos a respeito do custo e benefício em relação ao uso de antimicrobianos para a profilaxia (prevenção) e metafilaxia direcionados a essa doença. As diarreias são causadas por distintos grupos de microorganismos dentre os quais destacam-se a *Escherichia coli* enterotoxigênica (2,6 a 45,1%), rotavírus (17,7 a 79,9%), Coronavirus (3,1 a 21,6%) e *Cryptosporidium parvum* (27,8 a 63,0%) (MEGANCK et al., 2014). O benefício do uso terapêutico de antimicrobianos para casos de enterite por *Salmonella* ou *Escherichia coli* é claro, no entanto não existe

nenhum argumento para o seu uso em casos de Rotavirose, Coronavirose e Criptosporidiose (BERGE et al., 2009; SMITH, 2015).

O uso dos antimicrobianos provavelmente não afetam apenas as bactérias patobióticas, mas também as comensais e simbióticas que colonizam gradativamente o intestino no período pós-natal. Estudos recentes em humanos têm demonstrado que estas bactérias trazem uma série de benefícios ao hospedeiro, especialmente relativos ao metabolismo energético do hospedeiro pela digestão de hidratos de carbono não digeríveis, além da produção de vitaminas B e K (GABORIAU-ROUTHIAU et al., 2009; WANG et al., 2012; AZIZ et al., 2013; VAZIRI et al., 2015). Estes microrganismos também exercem atividade antibacteriana e imunomoduladora, por meio de distintos mecanismos: competição por sítios de ligação; produção de ambiente fisiologicamente restrito (pH e pressão O₂); produção de substâncias antimicrobianas; formação da barreira intestinal pela produção de mucina, reduzindo a permeabilidade do epitélio; desenvolvimento de tolerância imunológica aos microorganismos comensais/simbióticos e resposta imune aos patobióticos (FERNÁNDEZ et al., 2013). O equilíbrio da microbiota intestinal, assim como a sua diversidade, tem sido associada à saúde intestinal.

Diante do exposto, a hipótese desta pesquisa é de que o uso metafilático de antimicrobianos ao nascimento, ao invés de diminuir a ocorrência de doenças neonatais, pode aumentá-las devido a um desequilíbrio precoce da microbiota intestinal, tornando-as susceptíveis às infecções devido a modulação inadequada do sistema imune de mucosas. Assim, o objetivo desta pesquisa foi investigar a influência do uso precoce de antimicrobiano, por via parenteral, na ocorrência das doenças no período neonatal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, protocolo nº 2596070715.

4.1 MANEJO E SELEÇÃO DAS BEZERRAS RECÉM-NASCIDAS

Para a escolha da fazenda, a equipe de pesquisa realizou visitas em algumas propriedades da região para encontrar aquela que apresentasse o perfil desejado que incluía partos assistidos em baias de parição com adequada condição de higiene; colostragem adequada considerando-se a qualidade e volume de colostro; aleitamento com leite pasteurizado e sem antibióticos; bezerreiro com baias suspensas individuais com boa higiene. As bezerras desta pesquisa eram oriundas de fazenda comercial de alta produção, localizada no município de Descalvado – São Paulo. A fase de campo do estudo foi realizada entre maio e julho de 2016.

Durante a fase de campo, a equipe de pesquisa permanecia na fazenda de segunda à quinta-feira para acompanhamento dos partos ocorridos durante o dia, sendo os partos noturnos assistidos pelos colaboradores da fazenda. As vacas que estavam próximas a data prevista do parto ou que apresentavam sinais prodrômicos do parto eram transferidas do piquete pré-parto para baias maternidade com cama de areia onde permaneciam até o momento da parição (Figura 4).

Figura 4 - Nascimento em baias de parição localizadas na maternidade. Fêmea em trabalho de parto (a); contato vaca e bezerra imediatamente após o parto (b) – São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Após o parto, as vacas eram ordenhadas com ordenhadeira mecânica do tipo balde ao pé ainda nas baias de parição. Antes da ordenha os tetos eram limpos com solução clorada e secos com papel toalha individual (Figura 5). Todo o colostro coletado era avaliado quanto a sua qualidade imunológica pela avaliação indireta da concentração de imunoglobulinas por meio do colostro *balls* e refratômetro Brix.

Figura 5 -Vaca sendo preparada para a 1ª ordenha na baia maternidade com ordenhadeira mecânica tipo balde ao pé logo após o parto - São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Para avaliação do colostro através do colostro *balls*¹, o conjunto composto por 3 bolas verdes, 1 laranja e 2 vermelhas com diferentes densidades foram adicionadas em um recipiente contendo 2 litros de colostro, em seguida, realizou-se a leitura observando quais bolas flutuaram para a superfície: apenas bolas vermelhas e laranja= indicativo de colostro de má qualidade com densidade igual ou abaixo de 1035; bolas vermelhas, laranja e uma verde= colostro de boa qualidade com densidade ao redor de 1045; bolas vermelhas, laranja e duas verdes= colostro de ótima qualidade com densidade ao redor de 1060; e bolas vermelhas, laranja e três verdes= colostro de ótima qualidade com densidade ao redor de 1075. Somente colostro com densidade ≥ 1045 foi utilizado para a colostragem das bezerras conforme recomendações do fabricante.

A determinação do índice BRIX foi realizada utilizando-se refratômetro óptico BRIX² com escala entre 0 a 32%. Foi adotado o ponto de corte equivalente a 21% para distinguir colostro com baixa ou boa qualidade ($>50\text{mg/mL}$ de IgG) como descrito por Quigley et al. (2013).

Logo após o nascimento as bezerras eram separadas das vacas e transferidas para baias de transição, onde era realizada a cura o umbigo e colostragem utilizando mamadeira (Figura 6).

Figura 6 - Bezerras em baias de transição dentro da maternidade. Baias de transição (a); colostragem utilizando mamadeira (b) – São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

¹Ms colostro *balls*, Nutri Support®, 3705010

²Modelo 300001; SperScientific, Scottsdale, AZ

A colostragem das bezerras era realizada o mais rápido possível após o nascimento, sendo a primeira mamada fornecida no máximo às seis horas de vida. A segunda mamadeira de colostro era realizada geralmente com um intervalo de 6 horas da primeira mamada de acordo com a necessidade do bezerro. Era fornecido para as bezerras o volume mínimo equivalente a 10% do peso vivo, priorizando o colostro fresco, e na ausência deste utilizava-se colostro refrigerado previamente armazenado em geladeira entre 2 e 8°C por até 24 horas ou congelado. O colostro congelado ficava armazenado em sacos plásticos em freezer a -20°C, e quando havia a necessidade de ser utilizado era descongelado lentamente em banho-maria a 37°C.

Após o uso as mamadeiras e bicos eram lavadas com água quente e detergente para retirar toda a gordura, após o enxágue eram colocadas em um recipiente contendo aproximadamente 10 litros de água e 2 colheres de sopa de água sanitária. Antes do uso eram enxaguadas com água.

A cura do umbigo foi realizada logo após o nascimento pela imersão completa do cordão umbilical em recipiente contendo Umbicura (Pec®) por 1 minuto e meio, repetindo-se o processo após 12 horas. Repetiu-se este processo duas vezes ao dia até a mumificação completa do cordão umbilical que ocorria por volta dos 8 a 10 dias de vida das bezerras.

Bezerras híginas advindas de partos eutócicos foram triadas em até 12 horas pós-nascimento, por meio do exame clínico geral, segundo os procedimentos descritos por Feitosa (2014). Foram aferidas a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura corpórea (TEMP) e tempo de preenchimento capilar (TPC), sendo esses parâmetros interpretados de acordo com os intervalos de referência estabelecido por Silva et al. 2016 (Quadro 1). Além da avaliação da coloração da mucosa ocular, linfonodos, hidratação e peso corpóreo (Figura 7).

Quadro 1 - Intervalos de referência para as funções vitais em bezerras no primeiro mês de vida

Parâmetros	Intervalos de Referência				
	1 hora após nascimento	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
FC (bpm)	100,0-150,0	124,0±2,0	105,0±3,0	101,0±3,0	86,0±2,0
FR (mpm)	50,0-75,0	59,0±8,8	46,0±7,0	40,0±8,4	33,0±9,0
TEMP (°C)	39,0-39,5	38,6±0,3	39,0±1,0	39,0±0,4	39,0±0,3,0
TPC	1-2 segundos				

Fonte: (SILVA et al., 2016)

Legenda: bpm: batimentos por minuto; mpm: movimentos por minuto

Figura 7 - Exame clínico geral das bezerras. Avaliação da frequência cardíaca e respiratória (a); coloração das mucosas (b); temperatura corpórea (c) e pesagem utilizando fita de peso (d) - São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

As bezerras permaneceram nas baias de transição próximas a maternidade por aproximadamente três dias, recebendo apenas o colostro e leite de transição na mamadeira, era oferecido em torno de 3 litros de leite de transição por mamada proveniente de *pool* de leite de vacas que estavam 1 a 5 dias no pós-parto. Após este período, as bezerras eram transferidas para o bezerreiro onde permaneciam até o desmame. No bezerreiro as bezerras eram mantidas em baias individuais suspensas de metal e madeira com cama de feno e eram alimentadas por meio de balde, duas vezes ao dia, com um total de seis litros de leite proveniente das vacas pós-parto (1 a 5 dias). Era usado sucedâneo³ para completar o volume de leite diário, quando necessário, além de ração comercial e água *ad libitum* (Figura 8). Estes produtos não continham resíduos de antibióticos e promotores de crescimento. Era realizada a mochação de todas as bezerras do experimento entre 4 e 6 dias de vida utilizando pasta cáustica.

Figura 8 - Bezerreiro onde as bezerras eram alojadas após os três dias de vida (a); gaiolas individuais suspensas de metal e madeira com cama de feno (b); bezerra alimentada por meio de balde (c) – São Paulo 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

³Natimilk, Auster®

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram selecionadas vinte e seis bezerras híbridas, e estas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos compostos por 13 animais: Grupo 1- receberam uma dose do antibiótico tulatromicina (2,5 mg/Kg) por via subcutânea, na região torácica caudal a escápula do lado direito, até doze horas após o nascimento (ATB+); Grupo 2- receberam uma dose de solução fisiológica por via subcutânea até doze horas após o nascimento (ATB-) (Figura 9).

Figura 9 - Aplicação por via subcutânea de tulatromicina (2,5 mg/Kg) na região torácica caudal a escápula do lado direito – São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

4.3 MOMENTOS DE AVALIAÇÃO

As avaliações e colheitas das amostras de sangue e fezes foram realizadas nos seguintes momentos: até doze horas após o nascimento ($\leq 12h$); 3-5º dia de vida (D3-5); 7-9º dia de vida (D7-9); 13º-15º dia de vida (D13-15); 20-23º dia de vida (D20-23); e 27-30º dias pós-nascimento (D27-30).

4.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA PERIÓDICA

As bezerras foram avaliadas em todos os momentos por meio do exame clínico, avaliando-se as funções vitais, coloração das mucosas, avaliação dos linfonodos, hidratação e pesagem através de fita (FEITOSA, 2014). Foram utilizados também os escores de diarreia e broncopneumonia de acordo com o *Calf Heath Scoring Criteria* da *University of Wisconsin - Madison* (McGUIRK, 2008; POULSEN; McGUIRK, 2009).

O escore de fezes é classificado de 0 a 3 de acordo com a consistência fecal, sendo 0 – consistência normal, 1 – consistência pastosa e semi-formada, 2 – consistência aquosa com maior quantidade de água, com conteúdo fecal aderido no períneo e cauda, 3 – líquida, conteúdo fecal aderido no períneo e cauda. Bezerras com fezes de escore 0 ou 1 são consideradas sem diarreia, enquanto animais com fezes de escores 2 ou 3 apresentam diarreia (Quadro 2 e Figura 10).

Quadro 2 - Escores de fezes adotado para detecção da diarreia em bezerras no primeiro mês de vida

Parâmetros	Escores
Consistência normal: firme, coloração amarronzada, períneo e cauda limpos e secos	0
Pastosa, semi-formada	1
Pastosa com maior quantidade de água: permanece sobre a “cama”; conteúdo fecal aderido ao períneo e cauda	2
Líquida: aquosa, conteúdo fecal aderido ao períneo e cauda	3

Fonte: (McGUIRK, 2008).

Figura 10 - Escores de fezes adotados para detecção da diarreia em bezerras no primeiro mês de vida – São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

A avaliação da presença de broncopneumonia foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Poulsen e McGuirk (2009). Foram atribuídas pontuações de 0 a 3, de acordo com a intensidade, para a temperatura retal, presença de tosse, secreção nasal e ocular e posição das orelhas. Por fim, somou-se as pontuações para a obtenção de um valor final. As bezerras cuja soma dos escores foi ≥ 4 foram triadas para o diagnóstico de broncopneumonia (Quadro 3).

Quadro 3 - Escores de broncopneumonia adotados para detecção da doença em bezerras no primeiro mês de vida

Escores	Temperatura retal (°C)	Tosse	Secreção nasal	Secreção ocular	Posicionamento das orelhas
0		Ausente	Serosa	Serosa	Normal
1	38,3 - 38,8	Presente e única, quando estimulada	Pouca quantidade, unilateral	Pouca quantidade	Balançar das orelhas ou cabeça
2	38,9 - 39,3	Presente e repetida quando estimulada, ou ocasional quando espontânea	Excessiva, mucosa e bilateral	Moderada quantidade bilateral	Ligeiramente pendente, unilateral
3	$\geq 39,4$	Presente, repetida e espontânea	Abundante, mucopurulenta, bilateral	Intensa quantidade, bilateral	Pendentes intensamente, bilateral ou torção da cabeça

Fonte: (POULSEN; MCGUIRK, 2009).

Durante todas as avaliações a região umbilical externa foi avaliada por inspeção e palpação para a detecção de sinais inflamatórios como vermelhidão, presença de secreção purulenta, sensibilidade, aumento de volume umbilical, espessamento do cordão umbilical e tensão abdominal (FIGUEIREDO, 1999).

4.5 COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram obtidas amostras de soro das bezerras por meio de punção da veia jugular externa, utilizando sistema a vácuo, em tubos sem anticoagulante (10mL). No laboratório, as amostras foram centrifugados a 1057 x g durante 10 minutos para separação do soro. Após este processo o soro foi aliquotado em microtubos e armazenados em freezer a -40°C para posterior determinação da proteína total.

As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal com luvas de látex estéreis e acondicionadas em coletores universais estéreis. No laboratório as amostras de fezes foram aliquotadas em seis microtubos (1,5mL), no fluxo laminar na presença de bico de Bunsen. As amostras fecais foram armazenados em freezer a -80°C para posterior análise para rotavírus e coronavírus. Foram utilizadas 2 gramas de fezes para avaliar a presença de *Cryptosporidium* pela técnica de flutuação em solução saturada de sacarose. O restante foi congelado dentro dos copos coletores em freezer -20°C para posterior determinação da quantidade de matéria seca nas fezes.

Todas as amostras após a coleta foram mantidas refrigeradas até o processamento no laboratório.

4.6 ANÁLISES LABORATORIAIS

4.6.1 Proteína total e sólidos totais

A determinação da proteína total do soro sanguíneo foi realizada por dois métodos utilizando-se o refratômetro óptico de proteína⁴ com escala de 0 a 12 g/dL e o refratômetro óptico BRIX⁵ com escala entre 0 a 32%.

4.6.2 Determinação da matéria seca das fezes

Utilizou-se potes metálicos devidamente identificados para pesagem de cerca de 5 gramas de fezes em balança analítica de alta precisão. Após a pesagem as amostras foram transferidas para estufa a 103°C onde permaneceram por 24 horas (Figura 11). Após esse período as amostras foram retiradas da estufa e transferidas para o dessecador por 30 minutos para resfriar. As amostras já resfriadas foram pesadas e realizou-se os cálculos para determinação da porcentagem de matéria seca da amostra como descrito a seguir. Foram considerados casos de diarreia as fezes que continham porcentagem ≤15% de matéria seca (DIRKSEN et al., 2008).

$$\% \text{ Matéria seca} = \frac{\text{massa da amostra seca}}{\text{massa da amostra úmida}} \times 100$$

⁴RTP-12, Instrutherm

⁵Modelo 300001; SperScientific, Scottsdale, AZ

Figura 11 – Amostras de fezes em estufa a 103°C para determinação da porcentagem de matéria seca nas fezes de bezerras do grupo ATB- e ATB+ - São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

4.6.3 Detecção de *Cryptosporidium* pela técnica de flutuação em solução saturada de sacarose

A detecção de *Cryptosporidium* foi analisada nas fezes apenas dos animais que apresentavam escore fecal 2 ou 3. Para tanto, as fezes foram lavadas para retirar a gordura e facilitar a observação dos protozoários. Foram adicionados 1 a 2 gramas de fezes em um copo coletor com 8 a 9 mL de água destilada, com o auxílio de um bastão de vidro as fezes foram diluídas completamente. A solução foi peneirada e a fração líquida adicionada em um tubo plástico com capacidade para 15 mL, em seguida, 4 mL de éter foi acrescido ao tubo sendo posteriormente homogeneizado. As amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 796 x g. Após este processo, a camada de gordura e o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e as paredes do tubo plástico foram limpas com uma gaze. Foi adicionado ao "pellet" de fezes 9 mL de solução saturada de sacarose e esta foi homogeneizada e centrifugada por dez minutos a 264 x g. (OGASSAWARA; BENASSI, 1980). O sobrenadante foi retirado com uma alça de metal e colocado em uma lâmina de vidro, coberta por uma lamínula e observada em microscópio óptico

em aumento de 400X (Figura 12).

Figura 12- Detecção de *Cryptosporidium* (setas) pela técnica de flutuação em solução saturada de sacarose- São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

4.6.4 Multiplex hemi-nested RT-PCR para detecção de Coronavírus e Rotavírus do grupo A

As amostras com escore fecal 2 e 3 também foram triadas para a detecção de rotavírus e coronavírus por meio do sistema multiplex semi-nested RT-PCR, de acordo com a técnica descrita por Asano et al. (2010). As amostras fecais foram primeiramente preparadas como suspensões a 50% (fezes líquidas) ou a 20% (fezes pastosas) em água-DEPC (*Diethylpyrocarbonate*) e clarificadas a 5.000 x g/15min a 4°C, tomando-se o sobrenadante como amostra.

A extração do RNA total das suspensões de amostras fecais foi realizada com TRIzol Reagent™⁶, segundo as instruções do fabricante. As cepas Kakegawa (Akashi et al., 1980) e 8209 (Rodriguez et al., 2004) foram utilizadas como controles

⁶Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

positivos de BCoV e rotavírus, respectivamente, e a água-DEPC como controle negativo.

Para a detecção de BCoV, foi utilizado um conjunto de três primers dirigidos ao gene codificador da proteína de nucleocapsídeo N do BCoV. As reações de RT-PCR para a detecção de rotavírus foram realizadas com o uso de três primers dirigidos ao gene codificador da proteína viral VP1 (Quadro 4).

Quadro 4 - Primers utilizados para a detecção do gene codificador da proteína de nucleocapsídeo N de coronavírus bovino e suas regiões nucleotídicas de hibridação no gene *N* da amostra Mebus(U00735), primers utilizados para a detecção de gene codificador da proteína viral VP1 de rotavírus do grupo A e regiões nucleotídicas de hibridação em relação ao segmento genômico 1 da amostra KJ44 (DQ494405.1), temperaturas de fusão (T_m) e respectivos amplicons (em pares de bases) e regiões nucleotídicas de hibridação em relação à sequência de número de acesso GenBank NC_006853, temperaturas de fusão (T_m) e respectivo amplicon (em pares de bases)

Alvo	Primer	Seqüência (5'-3')	Região	T_m	Amplicon
Coronavírus	BCOV1 (senso)	AAGAGCTCAAYCCAAGCAAAGCTGY	123-146	60°C	463pb
	BCOV2 (anti-senso)	AGCAGACCTTCCTGAGCCTTCAAT	562-585	60°C	
	BCOV3 (anti-senso)	TCAATRTCGGTGCCATACTGGTCT	405-428	59,9°C	306pb (com BCOV1)
Rotavírus	ROT1 (senso)	CTCTGGCAAARCTGGTGTCA	737-753	59,7°C	492pb
	ROT2 (anti-senso)	CATTCGACGCTGATGACATY	1206-1225	59,7°C	
	ROT3 (anti-senso)	ARCAATCRACCAACCACTCCTGTA	938-961	59,8°C	228pb (com ROT1)

Fonte: (Asano et al., 2010).

Cada tubo contendo RNA foi levado a 95°C durante 5 minutos para desnaturação do RNA, sendo estes, a seguir, imersos em gelo e adicionados da combinação de reagentes para a transcrição reversa contendo 1x First Strand Buffer®, 1 mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1 µM de cada primer (BCOV1+BCOV2 para BCoV, ROT1+ROT2 para rotavírus) e 400 U de M-MLV Reverse Transcriptase® (Invitrogen®) para um volume final de 40 µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C/60 minutos.

Após a obtenção do DNA complementar, foi realizada a reação de PCR em termociclador. Para tanto, 2,5 µL do respectivo cDNA foram adicionados na combinação de reagentes para PCR contendo 1x PCR Buffer® (Invitrogen®), 0,2 mM

de cada dNTP, 0,25 μ M de cada par de primers (BCOV1+BCOV2 e BCOV1+BCOV3 para BCoV, ROT1+ROT2 e ROT1+ROT3 para), 1,5 mM MgCl₂ e 0,5 U de Platinum Taq DNA Polymerase® (Invitrogen®) para um volume final de 25 μ L completado com água-DEPC.

A seguir, os tubos foram levados ao termociclador para desnaturação inicial de 94°C/4min, seguida de 35 ciclos de 94°C/30seg (desnaturação), 55°C/30seg com gradiente de 5°C (hibridação) e 72°C/45seg (polimerização), seguindo-se após o ciclo, 72°C/5min para extensão final. Após a eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo e observado sob a luz ultra-violeta.

O hemi-nested PCR para BCoV e rotavírus foi realizado adicionando-se 2,5 μ L do produto da primeira amplificação à combinação de reagentes de PCR contendo 1x PCR Buffer® (Invitrogen®), 0,2 mM de cada dNTP, 0,25 μ M de cada primer (BCOV1+BCOV3 para BCoV, ROT1+ROT3 para rotavírus), 1,5 mM MgCl₂ e 0,5 U de Platinum Taq DNA Polymerase® (Invitrogen®) e água ultra-pura esterilizada (para um volume final de 25 μ L), levando-se ao termociclador para desnaturação inicial de 94°C/4min seguida de 25 ciclos de 94°C/30seg (desnaturação), 55°C/30seg com gradiente de 5°C (hibridação) e 72°C/45seg (polimerização), seguindo-se, após o ciclo, 72°C/5min para extensão final. Após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo e observado sob luz ultra-violeta.

4.7 ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS 19.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

As variáveis que apresentaram valores quantitativos foram avaliadas quanto à distribuição em relação à curva gaussiana pelo teste de Shapiro-Wilk. Alguns dados não apresentaram distribuição normal e foram submetidos a uma transformação por log₁₀, raiz quadrada ou inversa para verificar a possibilidade de realizar uma análise paramétrica.

Os dados paramétricos estão representados pelas medidas de média e

desvio padrão e foi utilizado o teste *T* de *Student* para amostras independentes na comparação dos valores obtidos no grupo ATB- e grupo ATB+ em cada momento. A análise no tempo (≤ 12 h ao D27-30) foi avaliada por cálculos de one-way ANOVA para medidas repetidas no tempo dentro do mesmo grupo com teste post hoc de Tukey. No caso onde ocorreram as transformações, o p apresentado nas tabelas diz respeito aos testes relacionados com os valores transformados, enquanto os valores descritos são reais. As variáveis não paramétricas foram representadas pela mediana, intervalo quartiliano, valores mínimos e máximos, a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney.

Os dados qualitativos (escores e presença de doenças) foram apresentados em valores absolutos e frequências, sendo a comparação entre os grupos realizada pelo teste de Qui-quadrado.

A correlação entre os testes para avaliar a qualidade do colostro no soro das bezerras nos dois grupos ATB- e ATB+ foi avaliada a partir da correlação de *Spearman* para dados não paramétricos.

As análises foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$ (*) e tendência quando p estava entre $>0,05$ e $< 0,1$ (†).

5 RESULTADOS

Este trabalho avaliou a influência da utilização precoce de antibiótico no perfil sanitário de bezerras Holandesas durante o primeiro mês de vida.

5.1 INTERVALO ENTRE O NASCIMENTO E INCLUSÃO EXPERIMENTAL

Devido à distância, entre a FMVZ-USP e a fazenda, optou-se por realizar a primeira coleta até 12 horas após o nascimento para facilitar a obtenção de todas as bezerras necessárias para realização do experimento. O tempo entre o nascimento e a coleta das amostras está descrito na tabela 1. A maioria das bezerras do grupo ATB- (76,9%) foram inseridas nesta pesquisa entre 6 e 12 horas pós-nascimento, enquanto que no grupo ATB+ as avaliações e aplicação do ATB foram um pouco mais precoces ($P=0,107$).

Tabela 1 – Valores relativos e absolutos referente a inserção das bezerras nos grupos experimentais ATB- e ATB+ – São Paulo - 2016

Momento da coleta	Grupos	
	ATB-	ATB+
Até 6 horas após o nascimento	23,1% (3/13)	53,8% (7/13)
De 6 a 12 horas após o nascimento	76,9% (10/13)	46,2% (6/13)
Significância	0,107	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p<0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p>0,05$ e $< 0,1$) pelo teste de Mann-Whitney.

5.2 QUALIDADE E VOLUME DO COLOSTRO FORNECIDO

A avaliação indireta da concentração de imunoglobulinas e sólidos totais do colostro administrado para as bezerras do grupo ATB- e ATB+ foi avaliada por meio

do colostro *balls* e índice Brix, respectivamente. O colostro fornecido na primeira mamada avaliado pelo colostro *balls* apresentou 1060 de densidade em ambos os grupos, observando-se amplitudes de variação entre 1045 a 1075 no grupo ATB-; e 1060 a 1075 para o grupo ATB+. O índice Brix apresentou mediana de 30% para ambos os grupos, observando-se amplitudes de variação entre 26 e 32% para o grupo ATB- e entre 28 e 32% para o grupo ATB+. O colostro fornecido na segunda mamada apresentou variação de 1045 a 1075 em ambos os grupos, e índice Brix de 25 a 32% para o ATB- e 26 a 32% para o ATB+.

A qualidade do colostro fornecido na 1ª e 2ª mamada para as bezerras ATB- e ATB+ foi igual, considerando-se o colostro *balls* e refratômetro Brix ($P \geq 0,169$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Mediana, intervalo quartiliano (IQR), valores mínimos e máximos de imunoglobulinas fornecidas na primeira e segunda mamada para as bezerras do grupo ATB- e ATB+ avaliados pelo colostro *balls* e índice Brix – São Paulo - 2016

balls e índice Brix – São Paulo – 2016						
Parâmetros	Primeira mamada		P	Segunda mamada		P
	Colostro balls			Colostro balls		
	ATB-	ATB+		ATB-	ATB+	
Mediana (IQR)	1060 (1060-1060)	1060 (1060-1060)	0,681	1060 (1048,75-1060)	1060 (1045-1060)	0,749
Mínimo	1045	1060		1045	1045	
Máximo	1075	1075		1075	1075	
Parâmetros	Índice Brix (%)		P	Índice Brix (%)		P
	ATB-	ATB+		ATB-	ATB+	
	ATB-	ATB+		ATB-	ATB+	
Mediana (IQR)	30 (27-30)	30 (30-31)	0,169	30 (27,5-30)	29 (28-30,5)	0,853
Mínimo	26	28		25	26	
Máximo	32	32		32	32	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste de Mann-Whitney.

Foi possível detectar alta correlação de *Spearman* ($r=0,721$) entre as técnicas de avaliação da qualidade do colostro pelo colostro *balls* e refratômetro BRIX considerando as amostras de colostro fornecido na primeira e segunda mamada ($P=0,000$) (Figura 13).

Figura 13- Correlação de *Spearman* entre o refratômetro BRIX e colostro *balls*- São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

O volume de colostro administrado na 1ª mamada variou de 1,5 a 3,5 L no grupo ATB- e de 1,25 a 4,0 L no grupo ATB+. Na segunda mamada as bezerras receberam quantidade menor de colostro variando de 0,25 a 3,25 L no ATB- e 0,75 a 2,0 L no grupo ATB+. Não foram observadas diferenças entre os grupos no volume de colostro fornecido as bezerras ATB- e ATB+ ($P \geq 0,144$) (Tabela 3).

Em relação ao volume total de colostro administrado para as bezerras observamos que ambos os grupos receberam quantidades semelhantes ($P=0,703$) de colostro, 4,00 L para o grupo ATB- e 4,125 L para o grupo ATB+ (Tabela 3).

Tabela 3 – Mediana, intervalo quartiliano (IQR), valores mínimos e máximos do volume de colostro (L) fornecido na primeira e na segunda mamada e volume total de colostro administrado para as bezerras do grupo ATB- e ATB+ – São Paulo – 2016

Parâmetros	Grupos	Mediana (IQR)	Mínimo	Máximo
Primeira mamada (L)	ATB-	2,0 (2,0-3,0)	1,5	3,5
	ATB+	2,5 (2,0-3,25)	1,25	4,0
	P	0,362		
Segunda mamada (L)	ATB-	2,0 (2,0-2,0)	0,25	3,25
	ATB+	1,75 (1,0-2,0)	0,75	2,0
	P	0,144		
Volume total de colostro (L)	ATB-	4,00 (3,75-4,87)	3,5	5,5
	ATB+	4,125 (3,81-5,00)	3,25	5,5
	P	0,703		

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste de Mann-Whitney.

A maioria das bezerras recebeu colostro fresco na primeira (ATB-=92,3% e ATB+=92,3%) e na segunda mamada (ATB-=66,67% e ATB+= 58,33%). O colostro refrigerado foi utilizado com menor frequência na primeira mamada (ATB-=7,7% e ATB+=7,7%) e foi utilizado em um maior número de bezerros na segunda mamada (ATB-=25,0% e ATB+=16,67%). Apenas na segunda mamada foi fornecido colostro congelado para alguns animais (ATB-=8,33% e ATB+=25,00%) não sendo possível observar diferença estatística entre os grupos ($P=0,531$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores relativos e absolutos referentes ao método de armazenamento do colostro fornecido na primeira e na segunda mamada para as bezerras do grupo ATB- e ATB+ – São Paulo - 2016

Parâmetros	Primeira mamada (%)		Segunda mamada (%)	
	ATB-	ATB+	ATB-	ATB+
Fresco	92,3 (12/13)	92,3 (12/13)	66,67 (8/12)	58,33 (7/12)
Refrigerado	7,7 (1/13)	7,7 (1/13)	25,00 (3/12)	16,67 (2/12)
Congelado	0,0 (0/13)	0,0 (0/13)	8,33 (1/12)	25,00 (3/12)
P	1,000		0,531	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste de Qui-quadrado.

5.3 PROTEÍNA TOTAL

Os valores médios e desvios padrão dos sólidos totais mensurados pelo refratômetro BRIX no soro das bezerras antes e após a mamada do colostro estão descritos na tabela 5.

Foi possível observar que logo após o nascimento ($\leq 12h$) os sólidos totais e proteína total estavam abaixo do valor de referência (8,4% para o refratômetro BRIX e 5,5 g/dl de proteína total) para ambos os grupos e no D3-5 observamos um aumento significativo, ficando dentro dos valores de referência. O grupo ATB+ apresentou menor valor de proteína total no $\leq 12h$ quando comparado com o grupo ATB- ($P=0,044$). Foram observadas diferenças estatísticas entre os momentos ($P=0,000$).

Tabela 5 - Valores médios e desvios-padrão para os valores de sólidos totais no soro mensurado utilizando o refratômetro BRIX e proteína total mensurada pelo refratômetro de proteínas em bezerras ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

Parâmetros	Grupos	$\leq 12h$	D3-5	P
Sólidos totais (%) (Refratômetro BRIX)	ATB -	8,2 $\pm$ 1,1 ^a	10,2 $\pm$ 0,9 ^b	0,000*
	ATB +	7,4 $\pm$ 0,8 ^a	10,1 $\pm$ 0,6 ^b	0,000*
	P	0,044*	0,721	
Proteína Total (g/dL) (Refratômetro de proteínas)	ATB -	5,6 $\pm$ 0,9 ^a	7,2 $\pm$ 0,7 ^b	0,000*
	ATB +	4,9 $\pm$ 0,6 ^a	7,1 $\pm$ 0,5 ^b	0,000*
	P	0,026*	0,641	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de student.

5.4 EXAME CLÍNICO GERAL

Os valores médios e desvio padrão para as funções vitais estão apresentados na tabela 6 e figura 14.

A frequência cardíaca foi maior no grupo ATB+ ($156,9 \pm 23,9$ bpm) em relação ao ATB- ($138,2 \pm 13,6$ bpm) na primeira avaliação realizada nas primeiras 12 horas de vida ($P=0,022$). Em geral, a análise no tempo detectou diminuição na frequência cardíaca do ≤ 12 h ao D13-15 no grupo ATB+ ($P=0,000$). Foi observada apenas tendência ($P=0,064$) para a diminuição da frequência cardíaca para o grupo ATB- no 1º mês de vida.

A frequência respiratória foi semelhante entre os grupos no 1º mês de vida ($P \geq 0,358$). A frequência respiratória no grupo ATB- teve um aumento do ≤ 12 h ao D3-5, após este período teve uma diminuição progressiva do D3-5 ao D20-23 e um aumento no D27-30 ($P=0,047$). No grupo ATB+ houve um aumento dos movimentos respiratórios do ≤ 12 h ao D7-9, com uma diminuição progressiva até o D27-30 ($P=0,048$).

A $T^{\circ}\text{C}$ das bezerras foi maior no grupo ATB- ($38,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$) em relação ao ATB+ ($38,0 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$) no 1º momento de avaliação (≤ 12 h de vida) ($P=0,002$). Em geral, a análise no tempo revelou aumento da $T^{\circ}\text{C}$ do ≤ 12 h ao D3-5 em ambos os grupos, observando-se diminuição dos valores no grupo ATB+ nos momentos subsequentes ($P=0,000$). A $T^{\circ}\text{C}$ foi mais oscilante a partir do D3-5 no grupo ATB-, observando-se aumento dos valores no D3-5 ao D13-15 com leve diminuição no D20-23 e D27-D30 ($P=0,000$).

Tabela 6- Valores médios e desvios-padrão para frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TEMP) das bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo- 2016

M(s)	FC (bpm)			FR (mpm)			TEMP ($^{\circ}\text{C}$)		
	ATB -	ATB +	P	ATB -	ATB +	P	ATB -	ATB +	P
≤ 12h	$138,2 \pm 13,6$	$156,9 \pm 23,9^a$	0,022*	$59 \pm 17,9$	$58,9 \pm 11,4$	0,990	$38,5 \pm 0,3^a$	$38,0 \pm 0,3^a$	0,002*
D3-5	$144,0 \pm 29,5$	$148,5 \pm 26,4^{ab}$	0,688	$72,1 \pm 9,9$	$73,4 \pm 11,6$	0,744	$39,2 \pm 0,4^b$	$39,2 \pm 0,3^b$	0,796
D7-9	$139,9 \pm 20,6$	$130,2 \pm 18,0^{bc}$	0,214	$70,9 \pm 15,5$	$76,5 \pm 18,3$	0,413	$39,1 \pm 0,4^{bc}$	$39,1 \pm 0,5^b$	0,963
D13-15	$125,5 \pm 21,8$	$117,7 \pm 16,6^c$	0,315	$67,7 \pm 14,8$	$73,2 \pm 22,4$	0,727	$39,1 \pm 0,3^{bc}$	$39,2 \pm 0,7^b$	0,507
D20-23	$125,7 \pm 14,6$	$125,1 \pm 14,7^c$	0,916	$58,6 \pm 11,6$	$64,5 \pm 19,3$	0,358	$38,7 \pm 0,3^{ac}$	$38,8 \pm 0,4^b$	1,000
D27-30	$128,2 \pm 11,2$	$132,8 \pm 16,3^{bc}$	0,400	$64,1 \pm 12,1$	$62,6 \pm 10,7$	0,734	$38,8 \pm 0,2^{ac}$	$38,9 \pm 0,5^b$	0,335
P	0,064†	0,000*		0,047*	0,048*		0,000*	0,000*	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student* ou diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA. Letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os momentos dentro de cada grupo pelo teste de Tukey.

Figura 14- Valores médios e desvio padrão para a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TEMP), das bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student*. bpm: batimentos cardíacos por minuto; mpm: movimentos respiratórios por minuto.

O número e frequência das demais variações obtidas por meio do exame clínico estão expressos na tabela 7 e figura 15.

Todas as bezerras de ambos os grupos estavam hidratadas (desidratação $\leq 5\%$) e apresentavam TPC $\leq 2,0$ em todos os momentos em que foram avaliadas.

As mucosas das bezerras de ambos os grupos experimentais estavam róseas na 1ª avaliação realizada entre o nascimento e 12 horas de vida ($\leq 12h$), porém apenas o grupo ATB- apresentou mucosas alteradas no D3-5 e D7-9, sendo possível detectar tendência para maior frequência de mucosas esbranquiçadas no ATB- em D7-9 (ATB- = 23,1%; ATB+ = 0,0%, $P = 0,066$). As bezerras ATB+ começaram

a apresentar mucosas alteradas a partir do D13-15, porém as frequências entre os grupos foram semelhantes a partir desse momento.

Foram avaliados os linfonodos mandibulares, parotídeos, cervicais superficiais e subilíacos, sendo os mesmos classificados de acordo com a presença ou ausência de aumento de volume. Foram encontradas alterações nos linfonodos em todos os momentos, exceto $\leq 12h$, em ambos os grupos, sendo que o linfonodo mais acometido foi o cervical superficial. Não foi possível detectar diferença entre os linfonodos considerando-se os grupos experimentais.

Tabela 7- Valores relativos (absolutos) para mucosas (M) e linfonodos (L) observados nas bezerras dos grupos ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

Variáveis	Parâmetros	$\leq 12h$		D3-5		D7-9		D13-15		D20-23		D27-30	
		ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +
M	Róseas	100 (13/13)	100 (13/13)	84,6 (11/13)	100 (13/13)	76,9 (10/13)	100 (13/13)	76,9 (10/13)	76,9 (10/13)	92,3 (12/13)	76,9 (10/13)	69,2 (9/13)	76,9 (10/13)
	Alteradas	0,0 (0/13)	0,0 (0/13)	15,4 (2/13)	0,0 (0/13)	23,1 (3/13)	0,0 (0/13)	23,1 (3/13)	23,1 (3/13)	7,7 (1/13)	23,1 (3/13)	30,8 (4/13)	23,1 (3/13)
	P	-		0,141		0,066 [†]		1,000		0,277		0,658	
L	Normais	100 (13/13)	100 (13/13)	61,5 (8/13)	46,2 (6/13)	23,1 (3/13)	23,1 (3/13)	38,5 (5/13)	23,1 (3/13)	61,5 (8/13)	69,2 (9/13)	46,2 (6/13)	76,9 (10/13)
	Alterados	0,0 (0/13)	0,0 (0/13)	38,5 (5/13)	52,8 (7/13)	76,9 (10/13)	76,9 (10/13)	61,5 (8/13)	76,9 (10/13)	38,5 (5/13)	30,8 (4/13)	53,8 (7/13)	23,1 (3/13)
	P	-		0,431		0,549		0,395		0,680		0,107	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste de Qui-quadrado. Mucosas alteradas: róseas claras ou pálidas; linfonodos alterados: aumento de volume.

Figura 15 - Frequência (%) da coloração da mucosa ocular das bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste de Qui-quadrado.

5.5 ESCORES DE DOENÇAS

As frequências e valores absolutos observados para diarreia avaliada por meio do escore fecal e porcentagem de matéria seca, inflamação umbilical e escore de broncopneumonia no 1º mês de vida das bezerras que receberam ou não antibiótico após o nascimento estão apresentadas na tabela 8 e figura 16.

Os valores médios e desvio para a porcentagem de matéria seca nas fezes das bezerras estão apresentados na tabela 9 e figura 17.

A dinâmica das diarreias baseada no escore fecal e matéria seca foram semelhantes entre os grupos experimentais, apesar da maior frequência de diarreias observadas no D7-9, D13-15 e D27-30 nas bezerras ATB+. As diarreias iniciaram-se logo após a mamada do colostro em $\leq 12h$, observando-se prevalência máxima entre D13-15 (Escore: ATB+=92,3%; ATB-=92,3%; Matéria seca: ATB+=84,6%; ATB-

=61,5%). Após este momento, as bezerras apresentaram uma diminuição na frequência de diarreias no D20-23 (Escore: ATB+=15,4%; ATB-=23,1%; Matéria seca: ATB+=23,1%; ATB-=23,1%) e D27-30 (Escore: ATB+=30,8%; ATB-=7,7%; Matéria seca: ATB+=30,8%; ATB-=23,1%).

A porcentagem (%) de matéria seca nas fezes foi maior nas bezerras ATB- ao nascimento ($P=0,046$). Além disso, detectou-se tendência para menor porcentagem de matéria seca nas fezes das bezerras ATB+ no D7-9 ($P=0,063$) e D27-30 ($P=0,084$).

Observou-se moderada correlação de *Spearman* ($r=0,633$) entre a detecção de diarreia pelo escore fecal e porcentagem de matéria seca ($P=0,000$).

Alterações umbilicais foram detectadas no D3-5 (ATB-= 38,5; ATB+= 7,7%, $P=0,063$), D7-9 (ATB-= 23,1; ATB+= 15,4%, $P=0,619$) e D13-15 (ATB-= 23,1; ATB+= 0,0%, $P=0,066$). Em geral, o grupo ATB- apresentou maior frequência de inflamações umbilicais.

Foram considerados casos de broncopneumonia quando a soma dos escores segundo a sintomatologia foi ≥ 4 (POULSEN; McGUIRK, 2009). Desta forma foram detectados treze casos de broncopneumonia ao longo do período estudado, sendo oito do grupo ATB- e cinco do grupo ATB+, o momento que apresentou maior frequência de broncopneumonia foi o D27-30 com 23,1% dos animais do grupo ATB- afetados e 7,7% dos animais do grupo ATB+. Não foi possível detectar diferença estatística entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados.

Tabela 8 - Valores relativos (absolutos) para os casos de diarreia diagnosticadas pelo escore fecal e matéria seca, inflamação umbilical e doença respiratória bovina (DRB) manifestados pelas bezerras dos grupos ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

Variáveis	Parâmetros	≤12h		D3-5		D7-9		D13-15		D20-23		D27-30	
		ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +
Diarreia (Escore fecal)	Ausente	84,6 (11/13)	92,3 (12/13)	84,6 (11/13)	84,6 (11/13)	84,6 (11/13)	69,2 (9/13)	7,7 (1/13)	7,7 (1/13)	76,9 (10/13)	84,6 (11/13)	92,3 (12/13)	69,2 (9/13)
	Presente	15,4 (2/13)	7,7 (1/13)	15,4 (2/13)	15,4 (2/13)	15,4 (2/13)	30,8 (4/13)	92,3 (12/13)	92,3 (12/13)	23,1 (3/13)	15,4 (2/13)	7,7 (1/13)	30,8 (4/13)
	P	0,377		1		0,352		1		0,619		0,135	
Diarreia (Matéria seca)	Ausente	100 (13/13)	92,3 (12/13)	92,3 (12/13)	100 (13/13)	100 (13/13)	84,6 (11/13)	38,5% (5/13)	15,4 (2/13)	76,9% (10/13)	76,9% (10/13)	76,9% (10/13)	69,2 (9/13)
	Presente	0,0% (0/13)	7,7% (1/13)	7,7% (1/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	15,4% (2/13)	61,5% (8/13)	84,6% (11/13)	23,1% (3/13)	23,1% (3/13)	23,1% (3/13)	30,8% (4/13)
	P	0,308		0,308		0,141		0,185		1		0,658	
Inflamação Umbilical	Normais	100 (13/13)	100 (13/13)	61,5 (8/13)	92,3 (12/13)	76,9 (10/13)	84,6 (11/13)	76,9 (10/13)	100 (13/13)	100 (13/13)	100 (13/13)	100 (13/13)	100 (13/13)
	Alterado	0,0 (0/13)	0,0 (0/13)	38,5 (5/13)	7,7 (1/13)	23,1 (3/13)	15,4 (2/13)	23,1 (3/13)	0,0 (0/13)	0,0 (0/13)	0,0 (0/13)	0,0 (0/13)	0,0 (0/13)
	P	-		0,063 [†]		0,619		0,066 [†]		-		-	
DRB	Normal	100 (13/13)	100 (13/13)	92,3 (12/13)	84,6 (11/13)	84,6 (11/13)	100 (13/13)	100 (13/13)	92,3 (12/13)	84,6 (11/13)	92,3 (12/13)	76,9 (10/13)	92,3 (12/13)
	Alterado	0 (0/13)	0 (0/13)	7,7 (1/13)	15,4 (2/13)	15,4 (2/13)	0 (0/13)	0 (0/13)	7,7 (1/13)	15,4 (2/13)	7,7 (1/13)	23,1 (3/13)	7,7 (1/13)
	P	-		0,539		0,141		0,308		0,539		0,277	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste de Qui-quadrado.

Figura 16 - Frequência (%) de doenças em bezerras (diarreia e inflamações umbilicais) nas bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste de Qui-quadrado.

Tabela 9 - Valores médios e desvios-padrão para porcentagem de matéria seca nas fezes de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

M(s)	Matéria seca		
	ATB -	ATB +	P
≤12h	40,81±6,15 ^a	33,42±9,07 ^{ab}	0,046*
D3-5	31,91±7,27 ^b	35,68±9,65 ^a	0,292
D7-9	30,45±6,44 ^b	24,67±8,07 ^{bc}	0,063†
D13-15	14,93±6,73 ^c	11,75±5,19 ^d	0,191
D20-23	19,96±4,34 ^c	20,25±3,39 ^{cd}	0,867
D27-30	20,41±3,78 ^c	16,58±6,68 ^{cd}	0,084†
P	0,000*	0,000*	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student* ou diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA. Letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os momentos dentro de cada grupo pelo teste de Tukey.

Figura 17 - Valores médios e desvios-padrão para porcentagem de matéria seca nas fezes de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student*.

5.6 PESO E GANHO DE PESO

Durante todos os momentos deste estudo foi realizada a pesagem das bezerras através de fita de peso própria para bezerros, os valores médios para o peso e ganho de peso estão apresentados na tabela 10 e figura 18.

O peso das bezerras ATB+ foi maior na $\leq 12h$ ao D13-15 ($P \leq 0,091$), porém o ganho de peso diário foi semelhante entre os grupos experimentais ($P \geq 0,241$). Observou-se acentuada redução no ganho de peso no D13-15 nos grupos ATB+ e ATB-, momento onde foi observada maior frequência de diarreias nas bezerras.

Tabela 10 - Valores médios e desvios-padrão para o peso e ganho de peso médio diário (GPMD) das bezerras ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo- 2016

M(s)	PESO (Kg)			GPMD (Kg)		
	ATB -	ATB +	P	ATB -	ATB +	P
$\leq 12h$	39,3 $\pm$ 3,9 ^a	42,9 $\pm$ 6,3 ^a	0,091†	0,0 $\pm$ 0,0 ^a	0,0 $\pm$ 0,0 ^a	-
D3-5	44,1 $\pm$ 5,2 ^{ab}	48,5 $\pm$ 6,6 ^{ac}	0,072†	1,1 $\pm$ 0,5 ^b	1,4 $\pm$ 0,6 ^b	0,254
D7-9	48,6 $\pm$ 4,9 ^{bc}	52,8 $\pm$ 5,9 ^{bc}	0,064†	1,2 $\pm$ 0,6 ^b	1,1 $\pm$ 0,9 ^{bc}	0,658
D13-15	50,6 $\pm$ 5,2 ^c	56,8 $\pm$ 4,4 ^{bd}	0,022*	0,3 $\pm$ 0,5 ^a	0,4 $\pm$ 0,2 ^{ac}	0,494
D20-23	57,8 $\pm$ 5,5 ^d	60,9 $\pm$ 5,0 ^{de}	0,139	1,0 $\pm$ 0,6 ^b	0,7 $\pm$ 0,4 ^c	0,241
D27-30	64,6 $\pm$ 5,8 ^e	67,6 $\pm$ 7,4 ^e	0,25	1,0 $\pm$ 0,5 ^b	1,0 $\pm$ 0,5 ^{bc}	0,956
P	0,000*	0,000*		0,000*	0,000*	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student* ou diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA. Letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os momentos dentro de cada grupo pelo teste de Tukey.

Figura 18 - Peso corporal (Kg) e ganho de peso médio diário (GPMD) de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento. * Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student*.

5.7 ETIOLOGIA DAS DIARREIAS

A detecção de *Cryptosporidium*, rotavírus e coronavírus foram realizadas para a definição do agente etiológico nas fezes das bezerras que apresentavam diarreias caracterizadas por escore fecal 2 e 3. Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 11 e figura 19.

A dinâmica da infecção por *Cryptosporidium* spp. foi semelhante entre os grupos experimentais do D3-5 ao D27-30. No $\leq 12h$ observou-se 2 bezerras com diarreia no ATB- e 1 bezerra com diarreia no ATB+, no entanto esta manifestação clínica não era causada por *Cryptosporidium* spp. Nos momentos subsequentes (D3-5 ao D20-23), todas as bezerras ATB+ e ATB- com diarreia apresentaram exame fecal positivo para *Cryptosporidium* (100%). No D27-30 observou-se frequências de 100% (1/1) e 75% (3/4) para *Cryptosporidium* nos grupos ATB- e ATB+, respectivamente.

A frequência de rotavírus foi semelhante entre os grupos ATB- e ATB+ ($P \geq 0,171$). Exames positivos para o rotavírus foram detectados em D7-9 (ATB- =50%, ATB+ =25%), D13-15 (ATB- =16,7%, ATB+ =16,7%), D20-23 (ATB- =0%,

ATB+=50%) e D27-30 (ATB-=50%, ATB+=75%). Coronavírus não foram detectados nas fezes escore 2 e 3 das bezerras de ambos os grupos.

Tabela 11 - Valores relativos e absolutos para *Cryptosporidium* (Cripto) e rotavírus (Rota) nas fezes diarreicas de bezerras dos grupos ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

Agente	Resultado	≤12h		D3-5		D7-9		D13-15		D20-23		D27-30	
		ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +
Cripto	Presente	0,0% (0/2)	0,0% (0/1)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (4/4)	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (3/3)	100% (2/2)	100% (1/1)	75% (3/4)
	Ausente	100% (2/2)	100% (1/1)	0,0% (0/2)	0,0% (0/2)	0,0% (0/2)	0,0% (0/4)	0,0% (0/12)	0,0% (0/12)	0,0% (0/3)	0,0% (0/2)	0,0% (0/1)	25% (1/4)
	P	.		.		.		.		.		0,576	
Rota	Presente	0,0% (0/2)	0,0% (0/1)	0,0% (0/2)	0,0% (0/2)	50% (1/2)	25% (1/4)	16,7% (2/12)	16,7% (2/12)	0,0% (0/3)	50% (1/2)	50% (1/2)	75% (3/4)
	Ausente	100% (2/2)	100% (1/1)	100% (2/2)	100% (2/2)	50% (1/2)	75% (3/4)	83,3% (10/12)	83,3% (10/12)	100% (3/3)	50% (1/2)	50% (1/2)	25% (1/4)
	P	.		.		0,540		1,000		0,352		0,171	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste de Qui-quadrado.

Figura 19 - Frequência (%) de *Cryptosporidium* e rotavírus nas fezes de bezerras Holandesas com diarreia do grupo ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento. * Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste de Qui-quadrado.

6 DISCUSSÃO

A atual preocupação com o uso de antimicrobianos para prevenção e metafilaxia de doenças em bezerros neonatos tem incentivado a comunidade científica a buscar explicações sobre o seu real efeito no desenvolvimento desses animais e suas implicações na saúde e bem-estar animal (BERGE et al., 2009; SMITH, 2015). Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para avaliar o uso parenteral de antimicrobianos de longa ação na metafilaxia da doença respiratória em bovinos confinados, mas pouco se fala sobre o seu efeito em bezerras recém-nascidas, especialmente sobre o seu impacto na saúde intestinal.

6.1 QUALIDADE DO COLOSTRO E TRANSFERENCIA DE IMUNIDADE PASSIVA

A criação de bezerras é o futuro do sistema de produção, pois substituirão matrizes descartadas e contribuirão para os ganhos econômicos da fazenda, nesta fase da criação existem desafios sanitários que exigem o controle de doenças e adoção de medidas preventivas para diminuir as taxas de mortalidade ($\leq 5\%$) e morbidade ($\leq 10\%$) no período de aleitamento (DCHA, 2013). A susceptibilidade das bezerras recém-nascidas muitas vezes está associada com a imaturidade funcional e regulatória do sistema imune adaptativo nos primeiros meses de vida (BARRINGTON; PARISH, 2001; CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Desta forma, a adequada transferência de imunidade passiva em ambos os grupos experimentais foi fundamental para minimizar o impacto deste fator no perfil sanitário das bezerras que receberam ou não tulatromicina na dose metafilática ao nascimento.

O principal fator envolvido com a falha na transferência de imunidade passiva (FTIP) em bezerros recém-nascidos é a qualidade do colostro fornecido (GODDEN, 2008). Assim, a avaliação quantitativa ou qualitativa dos teores de IgG no colostro é muito importante e foi usada nesta pesquisa como método de triagem para minimizar a ocorrência da FTIP (BAMN, 1995).

A qualidade do colostro fornecido para as bezerras desse experimento na primeira e segunda mamada foi determinada utilizando dois métodos, o colostro

balls e o refratômetro Brix que avaliam de forma indireta a concentração de imunoglobulinas presentes no colostro. Todas as bezerras receberam colostro com densidade ≥ 1045 para o colostro *balls* e 23% para o refratômetro Brix, na 1ª e 2ª mamada, conforme as recomendações da literatura atual (BARTIER; WINDEYER; DOEPEL, 2015).

A eficiência da transferência de Igs através do epitélio intestinal é ótima nas primeiras quatro horas pós-nascimento, observando-se declínio progressivo na eficiência de absorção a partir das seis horas de vida com finalização do transporte de Igs às 18h de vida (BESSER et al., 1985; MICHANEK; VENTORP; WESTROM; 1989; GODDEN, 2008). Todas as bezerras do experimento receberam o colostro logo após o nascimento (até 6 horas) e a segunda mamada era realizada entre 6 e 12 horas de vida dependendo do tempo de fornecimento da primeira mamada, garantimos assim o fornecimento de todo o volume necessário ainda dentro do faixa de tempo de absorção.

Outro fator importante para garantir a correta transferência de imunidade passiva é o volume de colostro administrado, que deve ser superior a 10% do peso vivo (BESSER; SZENCI; GAY, 1990). A média de peso ao nascimento das bezerras foi de 39,3 Kg para o grupo ATB- e 42,9 Kg para o grupo ATB+, e a mediana do volume total de colostro fornecido no grupo ATB- foi 4,0 litros e 4,125 litros para o grupo ATB+, comprovando a ingestão do volume correto para ambos os grupos.

O monitoramento da transferência de imunidade passiva após o processo de colostragem foi realizada pela mensuração dos sólidos totais pelo refratômetro BRIX ou proteína total pelo refratômetro de proteínas, sendo possível observar adequada transferência de imunidade passiva. Todas as bezerras desta pesquisa apresentaram teores de sólidos séricos acima do ponto de corte desejável equivalente a 8,4% (DEELEN et al., 2014).

A ausência de diferenças estatísticas entre os valores obtidos para a concentração de imunoglobulinas do colostro, volume de colostro administrado e a diferença observada nos valores de proteína total até 12 horas após o nascimento e o D3-5 para o grupo ATB- e ATB+ permitiu a confirmação da padronização da qualidade do colostro fornecido e da transferência de imunidade passiva para os dois grupos experimentais.

6.2 EXAME CLÍNICO GERAL

As bezerras selecionadas para este experimento foram acompanhadas durante 28 dias de vida por meio de exame clínico geral seguindo os procedimentos descritos por Feitosa (2014).

Para facilitar a obtenção do número total de bezerras necessário para realizar o experimento optamos por incluir em nossa pesquisa animais nascidos em até 12 horas após a chegada da equipe na fazenda. Apesar da distribuição aleatória dos animais entre os grupos, a maioria das bezerras ATB- (76,9%) foi incluída na pesquisa entre 6 e 12 horas pós-nascimento, enquanto que àquelas pertencentes ao grupo ATB+ foram inseridas no estudo mais precocemente (≤ 6 horas de vida). Isto justifica os menores valores para a FC e TEMP no grupo ATB-, devido a maior adaptabilidade ao meio extra-uterino em decorrência do maior intervalo entre o nascimento e 1ª avaliação. A revisão proposta por Mee (2008) indica que a frequência cardíaca de bezerros recém-nascidos nas primeiras horas de vida é entre 100 a 150 bpm com diminuição nas horas subseqüentes, desta forma os animais do grupo ATB+ que foram avaliados mais próximos ao momento do parto apresentaram maiores valores, enquanto os animais avaliados entre as 6 e 12 horas após o parto estavam mais adaptados e apresentavam menor frequência cardíaca.

Em relação aos momentos, o grupo ATB+ apresentou diminuição na frequência cardíaca do ≤ 12 h ao D13-15, com posterior aumento nos momentos subseqüentes, enquanto o grupo ATB- apresentou um breve aumento na frequência cardíaca do ≤ 12 h ao D3-5, com posterior decréscimo até o D20-23, e aumento no D27-30. O perfil da FC ao longo do primeiro mês de vida dos animais avaliados neste estudo é semelhante ao encontrado por Novo et al. (2017), que também estudaram bezerras holandeses do nascimento aos 30 dias de vida e observaram decréscimo nos valores até 14 e 21 dias e aumento nos momentos subseqüentes.

A frequência respiratória apresentou perfil semelhante entre os grupos no 1º mês de vida. Os valores médios observados no primeiro momento de avaliação estavam dentro do intervalo de 50 a 75 mpm sugerido por Varga et al. (1999) e Mee (2008). A frequência respiratória apresentou um comportamento crescente na primeira semana de vida com redução progressiva até o D27-30, corroborando com os achados de Silva et al. (2016). Estas variações no tempo refletem a variabilidade

homeostática fisiológica durante o período neonatal, bem como o desenvolvimento incompleto das funções anatômicas e funcionais dos neonatos.

A partir do D-5 até o final do experimento os valores médios para frequência respiratória e frequência cardíaca estavam acima dos descritos pela literatura. Alguns fatores extrínsecos e intrínsecos podem contribuir para essas alterações, como à hora do dia, ingestão de alimentos e de água, temperatura ambiente, umidade do ar, densidade animal, sombreamento, capacidade de adaptação do animal ao ambiente, idade, raça e sexo (PIRES et al., 1998; FERREIRA et al., 2006). Devido à distância da fazenda chegávamos para realizar o exame clínico e colheita das amostras próximo das 9 horas da manhã, perto do horário de aleitamento das bezerras, fato que as mantinha muito agitadas. Outro fator importante é a intensa radiação solar devido ao posicionamento do bezerreiro. Estes fatores contribuíram para a elevação dos valores médios de frequência cardíaca e respiratória.

A temperatura retal das bezerras foi maior no grupo ATB- em relação ao ATB+ no 1º momento de avaliação. Em geral, a análise no tempo revelou aumento da T°C do ≤ 12 h ao D3-5 em ambos os grupos, observando-se diminuição dos valores nos momentos subsequentes. O perfil de variação da temperatura ao longo do tempo está de acordo com os achados de Silva et al. (2016). Após o nascimento os bezerros precisam ativar mecanismos termogênicos para controle da temperatura, esta regulação depende do ambiente em que este animal está alojado e da ingestão de colostro. A produção de calor aumenta a temperatura corporal que se estabiliza dentro de 48 e 72 horas (LEONEL, 2009).

As mucosas das bezerras de ambos os grupos experimentais estavam róseas no primeiro momento de avaliação, porém apenas o grupo ATB- apresentou mucosas esbranquiçadas no D3-5 e D7-9. Estes achados podem ser associados à anemia do processo inflamatório decorrente das inflamações umbilicais que foram detectadas com maior frequência neste grupo. Ganz (2005) afirmaram que este tipo de anemia pode ser um efeito colateral da resposta de defesa do hospedeiro para o controle da multiplicação bacteriana, considerando-se que o ferro é fundamental ao seu metabolismo.

Não foram detectadas bezerras desidratadas durante o período do estudo. Provavelmente este fato se deve ao cuidado intensivo realizado pelos funcionários da fazenda que administravam fluido por via oral para as bezerras que apresentavam diarreia.

6.3 ESCORES DE DOENÇAS E DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DAS DIARREIAS

Para avaliar a presença de diarreia e broncopneumonia utilizou-se os escores propostos por McGuirk (2008) e Poulsen e McGuirk (2009), respectivamente. A presença de diarreia também foi avaliada pela porcentagem de matéria seca nas fezes. As fezes de todos os animais que apresentaram diarreia (escore 2 e 3) foram submetidas a exames para a detecção de *Cryptosporidium*, rotavírus e coronavírus. A região umbilical também foi avaliada para detecção das onfalopatias, além da avaliação do desempenho das bezerras utilizando-se fitas específicas para peso.

As inflamações umbilicais foram detectadas precocemente entre D3-5 até D13-15. Em todo este período, a doença foi mais frequente nas bezerras ATB-.

As afecções relacionadas às estruturas que constituem o cordão umbilical estão entre os principais fatores de comprometimento do desenvolvimento dos neonatos na 1ª semana de vida. O cordão umbilical pode representar uma importante porta de entrada para microrganismos que habitam a pele do neonato, que incluem *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp. e *Actinomyces (Corynebacterium) pyogenes* (RENCIFO et al., 2006). Estas bactérias podem migrar de forma ascendente pelos vasos umbilicais até chegar à circulação sistêmica levando a bacteremia, septicemia e morte em neonatos (RODRIGUES et al., 2010; SEINO et al., 2016).

As diferenças observadas entre os grupos em relação à frequência de alterações umbilicais provavelmente são decorrentes da proteção conferida pelo antimicrobiano fornecido nas primeiras 12 horas de vida, o que impediu a instalação e proliferação de bactérias nas estruturas umbilicais, culminando em um menor número de animais com inflamações umbilicais no grupo ATB+. A tulatromicina atua inibindo a síntese protéica essencial para o metabolismo das bactérias, sua ação é maior contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Clostridium* spp., algumas espécies de micoplasmas, além de bactérias gram-negativas como *Pasteurella* spp. e *Campylobacter* spp., especialmente durante o seu período de ação ao redor de 10 dias (STANTON et al., 2013; IVES et al., 2015).

Alguns fatores podem estar relacionados ao aumento da prevalência de alterações umbilicais em propriedades leiteiras, como a falha na transferência de imunidade passiva, falta de higiene nas instalações, negligência nos primeiros

cuidados, soluções antissépticas contaminadas, produtos inadequados e ou mal aplicados após o nascimento (RODRIGUES et al., 2010). A análise crítica do manejo observado na propriedade aponta apenas para o questionamento a respeito do produto usado na antissepsia da região umbilical.

A desinfecção umbilical era realizada nos animais deste experimento logo após o nascimento com solução antisséptica comercial à base de iodofórmio, fenol, ácido pícrico e diclorvós (Umbicura - Pec®), repetindo-se o processo duas vezes ao dia até a mumificação completa do cordão umbilical, que ocorria por volta dos 8 a 10 dias de vida das bezerras. Apesar dos agentes tópicos mais utilizados serem à base de iodo e clorexidina (MEE, 2008), poucos estudos avaliaram a eficácia dos antissépticos na prevenção de inflamações umbilicais em bezerros. Waltner-Toews, Martin e Meek (1986) compararam o uso de clorexidina, iodo e a ausência de antissépticos na prevenção de alterações umbilicais, observando que a mortalidade de bezerros foi significativamente menor com o uso da clorexidina. Não encontramos nenhum estudo sobre a eficácia do antisséptico utilizado nesta pesquisa para prevenção das infecções umbilicais.

A principal doença que acometeu as bezerras deste experimento no período neonatal foi a diarreia. Através da avaliação dos escores pode-se observar que as diarreias iniciaram-se logo após a mamada do colostro em ≤ 12 h, com pico máximo no D13-15, e diminuição da frequência nos momentos posteriores. A frequência de diarreias por meio da porcentagem de matéria seca nas fezes ($\leq 15\%$) foi semelhante aquela estimada pelo sistema de escore, entretanto os valores médios do teor de matéria seca apresentaram tendência para menor porcentagem nas fezes das bezerras ATB+ nos momentos D7-9 e D27-30.

A suplementação de antimicrobianos (oxitetraciclina e neomicina) no leite é a principal via usada para a prevenção das diarreias e aumento do ganho de peso das bezerras. Em geral, as pesquisas encontraram efeito nulo ou insatisfatório utilizando-se antimicrobiano oral, o que concorda com a ausência de resultados positivos observados nesta pesquisa para o uso parenteral de tulatromicina na dose metafilática com o objetivo de diminuir a prevalência de diarreias.

Apenas a pesquisa realizada por Stanton et al. (2013) avaliou os efeitos da tulatromicina por via parenteral na ocorrência de doenças e no crescimento de bezerras. A frequência de diarreia nos animais do grupo tratado foi de 80%, enquanto os animais do grupo controle tiveram 87% de frequência de diarreia,

correspondendo a 1,8 vezes mais chances de apresentar diarreia. O ganho de peso do grupo de bezerros que receberam tulatromicina foi $0,02 \pm 0,01$ kg/dia maior em relação aos animais do grupo controle. Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à taxa de mortalidade. Os resultados da nossa pesquisa discordam completamente dos dados da retro-referida pesquisa, pois a frequência de diarreias entre os grupos tratados e não tratados foi igual associada ao efeito nulo no ganho de peso das bezerras. Além disso, os valores médios observados para a matéria seca apontam que os animais ATB+ apresentaram maior intensidade de diarreia.

Em humanos, a diarreia associada ao uso de antimicrobianos é bastante conhecida. A diarreia pode afetar 5 a 39% dos pacientes em tratamento com antimicrobianos dependendo do princípio ativo utilizado (MACFARLAND, 1999; YOUNG; SCHMIDT, 2004). Bartlett (2002) relataram em sua revisão que as diarreias ocorrem em aproximadamente 5 a 10% de pacientes tratados com ampicilina, 10 a 25% dos tratados com amoxicilina-clavulanato, 15 a 20% daqueles que recebem cefixima e 2 a 5% dos tratados com outras cefalosporinas, fluoroquinolonas e azitromicina, claritromicina, eritromicina e tetraciclina.

Alguns mecanismos têm sido postulados na associação entre as diarreias e o uso de antimicrobianos, como: crescimento de patógenos oportunistas, alterações das funções metabólicas da microbiota, colonização por bactérias resistentes e incapacidade da microbiota resistir ao crescimento excessivo de microorganismos patogênicos (MACFARLAND, 1999; YOUNG; SCHMIDT, 2004). Em humanos tem sido demonstrado que o crescimento excessivo de *Clostridium difficile* vem sendo associado aos casos de diarreia pelo uso de antimicrobianos (MACFARLAND, 1999; BARTLETT, 2002; YOUNG; SCHMIDT, 2004).

Alterações na composição e quantidade de bactérias, mesmo na ausência de crescimento excessivo de microorganismos patogênicos, podem gerar alterações no metabolismo colônico levando a diarreia. Young e Schmidt (2004) descrevem que bactérias colônicas, especialmente certos anaeróbios, metabolizam os carboidratos oriundos da dieta e os utilizam como fonte de energia produzindo ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta, sendo esse último absorvido pelo cólon. A perda destas bactérias devido ao tratamento com antimicrobianos pode levar ao acúmulo desses carboidratos que não são absorvidos no cólon, levando a uma diarreia osmótica. Além disso, os ácidos graxos de cadeia curta principalmente o butirato é

uma importante fonte de energia para a mucosa do cólon distal, produções reduzidas de butirato devido à diminuição das populações bacterianas anaeróbias podem causar distúrbios funcionais diretos na mucosa.

Para o diagnóstico das diarreias realizamos a pesquisa de *Cryptosporidium*, rotavírus e coronavírus nas fezes das bezerras que apresentavam diarreias caracterizadas por escore fecal 2 e 3. Observamos uma alta frequência de animais positivos para *Cryptosporidium* spp., sendo que a dinâmica da infecção foi semelhante entre os grupos experimentais do D3-5 ao D27-30.

Em relação ao rotavírus, foi possível identificar 11 bezerras positivas durante o período estudado. Exames positivos para o rotavírus foram detectados a partir do D7-9 até o final do estudo, no qual foi observada maior frequência de rotavírus no grupo ATB+ no D27-30, apesar da ausência de diferenças estatísticas. Coronavírus não foram detectados nas fezes escore 2 e 3 das bezerras de ambos os grupos. Diversas pesquisas têm demonstrado que o *Cryptosporidium* associado ou não ao rotavírus é o principal agente envolvido na diarreia neonatal, corroborando com os achados desta pesquisa.

Um trabalho realizado com bezerros leiteiros apresentando diarreia na França mostrou que apenas 6,1% dos animais estudados foram infectados por *E. coli* K99, 14,3% por rotavírus, 6,8% por coronavírus, 0,3% por *Salmonella* e 50% dos animais avaliados estavam excretando oocistos de *C. parvum*. O pico de eliminação dos oocistos relatado neste trabalho foi no sétimo dia de vida (NACIRI et al., 1999), diferente do que observamos em nosso estudo com maior prevalência no D14.

Muitas vezes é difícil realizar o diagnóstico etiológico das diarreias devido à presença de coinfeções e o fato de que alguns dos agentes também podem ser encontrados em indivíduos saudáveis (MEGANK et al., 2015; GOMEZ et al., 2017). Devemos lembrar também que a simples presença do agente não é sempre suficiente para provocar a doença porque os mecanismos de defesa do hospedeiro podem resistir aos efeitos do patógeno. Desta forma as alterações observadas na composição microbiana gastrointestinal pelo uso de antimicrobianos, como já sugerido anteriormente, estão entre os fatores que predisõem os animais ao desenvolvimento de infecções por agentes patogênicos (MAYER et al., 2012).

A identificação do grupo etário apresentando diarreia pode auxiliar o diagnóstico etiológico da enfermidade. Bezerras com idade inferior a cinco dias de vida são frequentemente acometidas por *Escherichia coli* enterotoxigênica, bezerros

de 1 a 3 semanas de idade são mais acometidos por rotavírus, coronavírus e *Cryptosporidium* e próximo ao desmame por, *Salmonella*, *Eimeria* e *Giardia* (MCGUIRK, 2008; MEGANK et al., 2014).

No ≤ 12 h observou-se 2 bezerras com diarreia no grupo ATB- e 1 bezerra com diarreia no ATB+, no entanto esta manifestação clínica não foi associada ao *Cryptosporidium* spp. nem rotavírus. As infecções por *Escherichia coli* enterotoxigênica geralmente ocorrem em animais com menos de cinco dias de vida, esse bactérias pode ter participado do desenvolvimento da diarreia observada nestes animais, utilizando o PCR em tempo real detectamos um alto número de cópias de DNA de *Escherichia coli* nestes animais que apresentaram diarreia no ≤ 12 h.

A maioria das cepas de *E. coli* presentes no trato gastrointestinal são comensais não patogênicas e participam do processo normal de colonização do intestino (MANZLOOR et al., 2015; PICCO et al., 2015; EI-SEEDY et al., 2016). Infelizmente realizamos apenas a pesquisa de DNA da *Escherichia coli* nas fezes, desta forma não sabemos se as bactérias encontradas nesses animais eram realmente patogênicas, pois não realizamos a identificação de fatores de virulência ou a pesquisa por genes que codificam toxinas (FERRAREZI et al., 2008; COSTA et al., 2014).

Podemos sugerir também que a diarreia observada nesses animais logo no primeiro momento de coleta pode ter ocorrido devido ao efeito laxativo do colostro responsável pela desobstrução do intestino através da eliminação do mecônio (PEREIRA et al., 2011).

As vacas desta fazenda eram vacinadas no período pré-parto para *Escherichia coli*, rotavírus e coronavírus, assim, desta forma podemos imaginar que o rotavírus está circulando nesta fazenda e que observamos um número baixo de animais positivos devido aos anticorpos ingeridos de forma passiva. Meganck et al. (2015) mostraram que a vacinação materna reduz a frequência da diarreia neonatal de 39,9% para 14,3%.

Foram detectados treze casos de broncopneumonia ao longo do período estudado, sendo oito do grupo ATB- e cinco do grupo ATB+, não observamos diferenças entre os grupos em relação à broncopneumonia.

O período de maior incidência da broncopneumonia em bezerros vai do final do período neonatal até o desmame, dessa forma devido à baixa incidência da

doença no período estudado não podemos tirar conclusões sobre o efeito do antimicrobiano nesta doença.

Em geral, o uso da tulatromicina parenteral ao nascimento reduziu a frequência de onfalite, porém não afetou a prevalência de diarreias, broncopneumonias e ganho de peso no período neonatal.

7 CONCLUSÃO

A administração de tulatromicina na dose metafilática (2,5 mg/Kg) ao nascimento diminuiu a frequência de inflamações umbilicais, não influenciou na prevalência de broncopneumonias, ganho de peso e na prevalência de diarreias nos momentos de avaliação, porém corroborou com a presença de doença gastrointestinal mais intensa.

REFERÊNCIAS

- ASANO, K. M.; DE SOUZA, S. P.; DE BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; SILVA, S. O. S.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus. **Journal of virological methods**, v. 169, n. 2, p. 375-379, 2010.
- AKASHI, H.; INABA, Y.; MIURA, Y.; TOKUHISHA, S.; SATO, K.; SATODA, K. Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 5, p. 265-276, 1980.
- BARTLETT, J. G. Antibiotic-associated diarrhea. **New England journal of medicine**, v. 346, n. 5, p. 334-339, 2002.
- BARRINGTON, G. M.; PARISH, S. M. Bovine Neonatal Immunology. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 17, n. 3, p. 463-476, 2001.
- BARTELS, C. J.; HOLZHAUER, M.; JORRITSMA, R.; SWART, W. A.; LAM, T. J. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive veterinary medicine**, v. 93, n. 2, p. 162-169, 2010.
- BARTIER, A.L.; WINDEYER, M.C.; DOEPEL, L. Evaluation of on-farm tools for colostrum quality measurement. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.3, p.1878-1884, 2015.
- BERGE, A. C. B.; MOORE, D. A.; BESSER, T. E.; SISCHO, W. M. Targeting therapy to minimize antimicrobial use in preweaned calves: Effects on health, growth, and treatment costs. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 9, p. 4707-4714, 2009.
- BERGE, A. C. B.; MOORE, D. A.; SISCHO, W. M. Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* in dairy calves. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3872-3878, 2006.
- BEESER, T.E.; GARMEDIA, A.E.; MCGUIRE, T.C.; GAY, C.C. Effect of colostrum immunoglobulin G1 and immunoglobulin M concentrations on immunoglobulin absorption in calves. **Journal Dairy Science**, v. 68, n.8, p.2033–2037, 1985.
- CHASE, C.C.L.; HURLEY, D.J.; REBER, A.J. Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.24, n.1, p.87–104, 2008.
- COSTA, K.; FILHO, F. A.; COSTA, J. N.; AMORIM, C. R. N.; YANO, T.; CONCEIÇÃO, R. A. Fatores de virulência das amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia na região de Feira de Santana, Bahia. *Revista Brasileira Medicina Veterinária*, v. 36, n.4, p. 430-436, 2014.

DAVEY, M. G.; JOHNS, D. P.; HARDING, R. Postnatal development of respiratory function in lambs studied serially between birth and 8 weeks. **Respiration Physiology**, v. 113, p. 83-93, 1998.

DCHA. **Dairy Calf & Heifer Association Gold Standards**. In: *Production and performance standards established for Holstein calves, from birth to 6 months of age, across the United States*, v.1, 2013. 2p.

DEELEN, S.M.; OLLIVETT, T.L.; HAINES, D.M.; LESLIE, K.E. Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. **Journal of dairy science**, v.97, n.6, p.3838-3844, 2014.

DONOVAN, D. C.; FRANKLIN, S. T.; CHASE, C. C. L.; HIPPEN, A. R. Growth and Health of Holstein Calves Fed Milk Replacers Supplemented with Antibiotics or Enteroguard1, 2. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 4, p. 947-950, 2002.

EL-SEEDY, F. R.; ABED, A. H.; YANNI, H. A.; EL-RAHMAN, S. A. Prevalence of Salmonella and E. coli in neonatal diarrheic calves. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 45-51, 2016.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: a Arte do Diagnóstico**. 3. Ed. São Paulo: Roca, 2014.

FERREIRA, F.; PIRES, M. F. A.; MARTINEZ, M. L.; COELHO, S. G.; CARVALHO, A. U.; FERREIRA, P. M.; CAMPOS, W. E. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 732-738, 2006.

FERRAREZI, M. C.; CARDOSO, T. C.; DUTRA, I. S. Genotyping of Clostridium perfringens isolated from calves with neonatal diarrhea. **Anaerobe**, v. 14, n. 6, p. 328-331, 2008.

FIGUEIREDO, L.J.C. **Onfalopatias de bezerros**. 1ed. Salvador: EDUFBA, 1999. 94p.

GABLER, M. T.; TOZER, P. R.; HEINRICHS, A. J. Development of a Cost Analysis Spreadsheet for Calculating the Costs to Raise a Replacement Dairy Heifer1. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 5, p. 1104-1109, 2000.

GANZ, T. Heparin: A regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 171-182, 2005.

GODDEN, S. Colostrum Management for Dairy Calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Philadelphia, v.24, n.1, p.19-39, 2008.

GOMEZ, D. E.; ARROYO, L. G.; COSTA, M. C.; VIEL, L.; WEESE, J. S. Characterization of the Fecal Bacterial Microbiota of Healthy and Diarrheic Dairy Calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 3, p. 928-939, 2017.

HEINRICHS, A. J.; HEINRICHS, B. S. A prospective study of calf factors affecting first-lactation and lifetime milk production and age of cows when removed from the herd. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 1, p. 336-341, 2011.

HEINRICHS, A. J.; HEINRICHS, B. S.; HAREL, O.; ROGERS, G. W.; PLACE, N. T. A prospective study of calf factors affecting age, body size, and body condition score at first calving of Holstein dairy heifers. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 8, p. 2828-2835, 2005.

HEINRICHS, A. J.; JONES, C. M.; HEINRICHS, B. S. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 12, p. 4064-4069, 2003.

IVES, S. E.; RICHESON, J. T. Use of antimicrobial metaphylaxis for the control of bovine respiratory disease in high-risk cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 31, n. 3, p. 341-350, 2015.

KANEENE, J. B.; WARNICK, L. D.; BOLIN, C. A.; ERSKINE, R. J.; MAY, K.; MILLER, R. Changes in tetracycline susceptibility of enteric bacteria following switching to nonmedicated milk replacer for dairy calves. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1968-1977, 2008.

LASSITER, C. A. Antibiotics as Growth Stimulants for Dairy Cattle: A Review1. **Journal of Dairy Science**, v. 38, n. 10, p. 1102-1138, 1955.

LEONEL, R. A. B.; MATSUNO, R. M. J.; VERONEZI, A. H. M.; PEREIRA, D. M. Neonatologia de grandes animais. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 12, p. 1-8, 2009.

MANZOOR, R.; SHAH, M. I.; ASMA-UL-HUSNA, S. A. W.; PANDIT, F.; DAR, P. A.; MIR, M. I. Prevalence, serodiversity and antibiogram of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in diarrhoeic calves and lambs of Kashmir valley (J&K), India. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 7, n. 1, p. 477-481, 2015.

MAYER, M.; ABENTHUM, A.; MATTHES, J. M.; KLEEBERGER, D.; EGE, M. J.; HÖLZEL, C.; BAUER, J.; SCHWAIGER, K. Development and genetic influence of the rectal bacterial flora of newborn calves. **Veterinary microbiology**, v. 161, n. 1-2, p. 179, 2012.

MCFARLAND, L. V. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea. **Digestive Diseases**, v. 16, n. 5, p. 292-307, 1999.

MCGUIRK, S. M. Disease management of dairy calves and heifers. **Veterinary Clinics of North America, food animal practice**, v. 24, n.1, p. 139-156, 2008.

MEE, J. F. Managing the calf at calving time. **Proceedings of the American Association of Bovine Practitioners**, v. 41, p. 46-53, 2008.

MEGANCK, V.; HOFLACK, G.; PIEPERS, S.; OPSOMER, G. Evaluation of a protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhoea on dairy herds. **Preventive veterinary medicine**, v. 118, n. 1, p. 64-70, 2015.

MEGANCK, V.; HOFLACK, G.; OPSOMER, G. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. **Acta Veterinaria Scandinavica**, p. 56-75, 2014.

MICHANEK, P.; VENTORP, M.; WESTROM, B. Intestinal transmission of macromolecules in new born dairy calves of different ages at first feeding. **Research in Veterinary Science**, v. 46, n.3, p. 375–9, 1989.

NACIRI, M.; LEFAY, M. P.; MANCASSOLA, R.; POIRIER, P.; CHERMETTE, R. Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. **Veterinary parasitology**, v. 85, n. 4, p. 245-257, 1999.

NAGY, D. W. Resuscitation and critical care of neonatal calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 1-11, 2009.

NICKELL, J. S.; WHITE, B. J. Metaphylactic antimicrobial therapy for bovine respiratory disease in stocker and feedlot cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 285-301, 2010.

NOVO, S. M. F.; DOS REIS COSTA, J. F.; BACCILI, C. C.; SOBREIRA, N. M.; SILVA, B. T.; DE OLIVEIRA, P. L.; HURLEY, D. J.; GOMES, V. Effect of maternal cells transferred with colostrum on the health of neonate calves. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p. 97-104, 2017.

OGASSAWARA, S.; BENASSI, S. Infecção experimental de gatos com coração de bovino parasitado por *Sarcocystis* sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 47, p. 27-32, 1980.

PICCIONE, G.; BORRUSO, M.; FAZIO, F.; GIANNETTO, C.; CAOLA, G. Physiological parameters in lambs during the first 30 days postpartum. **Small Ruminant Research**, v. 72, p. 57-60, 2007.

PICCIONE, G.; CASELLA, S.; PENNISI, P.; GIANNETTO, C.; COSTA, A.; CAOLA, G. Monitoring of physiological and blood parameters during perinatal and neonatal period in calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1-12, 2010.

PICCO, N. Y.; ALUSTIZA, F. E.; BELLINGERI, R. V.; GROSSO, M. C.; MOTTA, C. E.; LARRIESTRA, A. J.; VIVAS, A. B. Molecular screening of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from dairy neonatal calves in Cordoba province, Argentina. **Revista argentina de microbiología**, v. 47, n. 2, p. 95-102, 2015.

POULSEN, K. P.; MCGUIRK, S. M. Respiratory disease of the bovine neonate. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 25, p. 121–137, 2009.

QUIGLEY, J. D.; DREWRY, J. J. Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre- and postcalving. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 10, p. 2779-2790, 1998.

QUIGLEY, J.V.D.; LAGO., A.; CHAPMAN, C.; ERICKSON, P.; POLO, J. Evaluation of the BRIX refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. **Journal Dairy Science**, v.96, n.2, p.1148-1155, 2013.

RAMIREZ, C. R.; HARDING, A. L.; FORTEGUERRI, E. B. R.; ALDRIDGE, B. M.; LOWE, J. F. Limited efficacy of antimicrobial metaphylaxis in finishing pigs: A randomized clinical trial. **Preventive veterinary medicine**, v. 121, n. 1, p. 176-178, 2015.

RENGIFO, S. A.; DA SILVA, R. A.; PEREIRA, I. A.; ZEGARRA, J. Q.; DE SOUZA, M. M.; BOTTEON, R. D. C. C. M. Isolamento de agentes microbianos a partir de amostras de sangue e umbigo de bezerros mestiços neonatos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 442-447, 2006.

RODRIGUES, C. A.; SANTOS, P. S. P. D.; PERRI, S. H. V.; TEODORO, P. H. M.; ANHESINI, C. R.; ARAÚJO, M. A. D.; VIANA FILHO, M. N. Correlação entre os métodos de concepção, ocorrência e formas de tratamento das onfalopatias em bovinos: estudo retrospectivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n.8, p. 618-622, 2010.

RODRIGUEZ, C. A. R.; BRANDÃO, P. E.; FERREIRA, F.; GREGORI, F.; BUZINARO, M. G.; JEREZ, J. A. Improved animal rotavirus isolation in MA104 cells using different trypsin concentrations. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 4, p. 437-441, 2004.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary parasitology**, v. 122, n. 2, p. 103-117, 2004.

SEINO, C. H.; BOMBARDELLI, J. A.; REIS, G. A.; DOS SANTOS, R. B.; SHECAIRA, C. L.; AZEDO, M. R.; BENESI, F. J. Avaliação ultrassonográfica de componentes umbilicais inflamados em bezerros da raça Holandesa com até 30 dias de vida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 492-502, 2016.

SILVERLÅS, C.; DE VERDIER, K.; EMANUELSON, U.; MATTSSON, J. G.; BJÖRKMAN, C. *Cryptosporidium* infection in herds with and without calf diarrhoeal problems. **Parasitology research**, v. 107, n. 6, p. 1435-1444, 2010.

STANTON, A. L.; KELTON, D. F.; LEBLANC, S. J.; MILLMAN, S. T.; WORMUTH, J.; DINGWELL, R. T.; LESLIE, K. E. The effect of treatment with long-acting antibiotic at postweaning movement on respiratory disease and on growth in commercial dairy calves. **Journal Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 574–581, 2010.

SILVA, B. T.; HENKLEIN, A.; DE SOUSA MARQUES, R.; DE OLIVEIRA, P. L.; LEITE, S. B. P.; FONTES, S. M.; GOMES, V. Vital parameters of Holstein calves from birth to weaning. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 38, n. 3, p. 299-304, 2016.

SMITH, G. Antimicrobial decision making for enteric diseases of cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 47-60, 2015.

UHDE, F. L.; KAUFMANN, T.; SAGER, H.; ALBINI, S.; ZANONI, R.; SCHELLING, E.; MEYLAN, M. Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. **The Veterinary record**, v. 163, n. 12, p. 362-366, 2008.

VARGA, J.; MESTER, L.; BÖRZSÖNYI, L.; ERDÉSZ, C.; VÁRI, A.; KÖRMÖCZI, P. S.; SZENCI, O. Adaptation of respiration to extrauterine-life in healthy newborn calves. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 377–379, 1999.

WALTNER-TOEWS, D.; MARTIN, S. W.; MEEK, A. H. Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. IV. Association of management with mortality. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 4, n. 2, p. 159-171, 1986.

WALKER, W. L.; EPPERSON, W. B.; WITTUM, T. E.; LORD, L. K.; RAJALA-SCHULTZ, P. J.; LAKRITZ, J. Characteristics of dairy calf ranches: morbidity, mortality, antibiotic use practices, and biosecurity and biocontainment practices. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 4, p. 2204-2214, 2012.

WINDEYER, M. C.; LESLIE, K. E.; GODDEN, S. M.; HODGINS, D. C.; LISSEMORE, K. D.; LEBLANC, S. J. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Preventive veterinary medicine**, v. 113, n. 2, p. 231-240, 2014.

YOUNG, V. B.; SCHMIDT, T. M. Antibiotic-associated diarrhea accompanied by large-scale alterations in the composition of the fecal microbiota. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1203-1206, 2004.

**CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DO USO PRECOCE DE ANTIMICROBIANO NA
COLONIZAÇÃO BACTERIANA INTESTINAL DE BEZERRAS
HOLANDESAS NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA**

8 INTRODUÇÃO

O processo de colonização do trato gastrointestinal dos bezerros é pouco conhecido, porém a detecção de material genético de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em porções do jejuno proximal, jejuno distal e íleo imediatamente após o nascimento sugerem que a transferência vertical de bactérias ocorre antes da colostragem (MALMUTHUGE et al., 2015). A similaridade entre o microbioma da vagina e fezes de bezerros recém-nascidos indica que a aquisição da microbiota ocorre durante a passagem do feto pelo canal vaginal no trabalho de parto (OIKONOMOU et al., 2013; MALMUTHUGE; GRIEBEL, 2014; LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2015). Independente da origem é desejável que a trajetória do microbioma gastrintestinal siga em direção a diversidade e riqueza (JERNBERG et al., 2010).

Em geral, o perfil da colonização gastrintestinal demonstrado em várias pesquisas é bastante semelhante. As primeiras bactérias a colonizar o intestino de recém-nascidos são as anaeróbias facultativas como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Enterobacteriaceae* spp., responsáveis pelo consumo de oxigênio local para propiciar um ambiente favorável para a multiplicação das bactérias anaeróbias obrigatórias como o *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. O padrão da microbiota gastrintestinal sofre alterações ao longo das 12 primeiras semanas de vida, observando-se o aparecimento de *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter* com a transição entre a dieta líquida e sólida (MALMUTHUGE et al., 2014).

Pesquisas recentes em bezerros demonstraram que as bactérias do gênero *Bifidobacterium* previnem as infecções por vírus e bactérias patogênicas, o que leva a menor ocorrência de diarreias (GOMEZ et al., 2017). As bifidobactérias produzem ácidos graxos de cadeia curta que são transformados em butirato, lactato e acetato, que estimulam o crescimento de bactérias produtoras de antibióticos. Além disso, o *Bifidobacterium* também contribui para a saúde intestinal pela produção de substâncias inibitórias para as bactérias patobióticas, além de contribuir para o desenvolvimento do sistema imune de mucosas (BELENGUER et al., 2006; GOMEZ et al., 2017). A administração oral de probióticos contendo *Bifidobacterium pseudolongum* e *Lactobacillus acidophilus* aumenta a conversão alimentar, ganho de

peso e diminui a frequência de diarreia em bezerros (ABE et al., 1995). Outros microorganismos como o *Faecalibacterium spp.* também foram associados a saúde intestinal, menor índice de mortalidade e ganho de peso em bezerros (OIKONOMOU et al., 2013; FODITSCH et al., 2015).

O principal fator exógeno que desequilibra a microbiota gastrointestinal é o uso dos antimicrobianos (ANTONPOULOS et al., 2009; SUCHODOLSKI et al., 2009; RUTTEN et al., 2015; PEREIRA et al., 2016). Neste contexto, a preocupação com a composição da microbiota das bezerras leiteiras é grande considerando-se o elevado grau de exposição aos antimicrobianos pelo uso de colostro e leite de transição oriundo de vacas tratadas com antimicrobianos no período seco, uso de leite de descarte para amamentar as bezerras, uso de antimicrobianos como promotor de crescimento, e especialmente o uso de antimicrobiano ao nascimento para tratamento metafilático das doenças neonatais (HEINRICHS et al., 2003; BERGE et al., 2009; DONOVAN et al., 2009; EDRINGTON et al., 2012; STANTON et al., 2013; PEREIRA et al., 2016).

O uso rotineiro da suplementação do leite com antimicrobianos com o objetivo de prevenir as diarreias e aumentar o desempenho tem feito com que a maioria das pesquisas fossem centralizadas nesta via de aplicação. Os trabalhos avaliando o uso de antimicrobianos parenteral em dose metafilática em bezerros recém-nascidos são raros, apesar do emprego rotineiro desse protocolo em fazendas de leite e corte. Além disso, os resultados oriundos destas pesquisas não são consensuais observando-se efeitos benéficos (STANTON et al., 2013), maléficos (BERGE et al., 2009) e nulos (DONOVAN et al., 2002; HEINRICHS et al., 2003) em relação à saúde intestinal e desempenho.

Em humanos, a ingestão de leite com ampicilina influenciou o desenvolvimento da microbiota intestinal, observando-se redução significativa nas taxas de colonização por *Bacteroides fragili*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* durante o primeiro mês de vida (GRONLUND et al., 2000). Oultram et al. (2015) escreveram uma comunicação científica notificando a diminuição da riqueza e população de bactérias do gênero *Lactobacillus* no intestino de bezerros doentes tratados com os antimicrobianos florfenicol, oxitetraciclina e tulatromicina.

Em bovinos, não foram encontrados estudos específicos avaliando o uso de antimicrobianos por via parenteral na dose metafilática sobre a composição da microbiota intestinal utilizando o PCR em tempo real.

A hipótese desta pesquisa é que o uso precoce de antimicrobianos influencia no desenvolvimento da microbiota intestinal. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a influencia do uso precoce do antimicrobiano tulatromicina na estrutura da comunidade microbiana gastrointestinal de bezerras Holandesas no primeiro mês de vida.

9 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, protocolo nº 2596070715.

9.1 MANEJO E SELEÇÃO DAS BEZERRAS RECÉM-NASCIDAS

Para a escolha da fazenda inicialmente realizamos visitas em diferentes propriedades da região com o objetivo de verificar qual delas atendia aos critérios desejáveis para a realização desta pesquisa: partos assistidos em baias de parição, manejo do colostro, aleitamento com leite pasteurizado e sem antibióticos e adequadas condições de higiene na maternidade e bezerreiro com gaiolas individuais. Assim, optou-se pela realização desta pesquisa em fazenda comercial de alta produção localizada no município de Descalvado – São Paulo. A colheita de amostras foi realizada entre maio e julho de 2016.

Durante a fase da pesquisa na fazenda, a equipe permanecia na fazenda de segunda à quinta-feira para acompanhamento dos partos ocorridos durante o dia, sendo os partos noturnos assistidos pelos colaboradores da fazenda. As vacas que estavam próximas a data prevista do parto ou que apresentavam sinais prodrômicos eram transferidas do piquete pré-parto para baias maternidade com cama de areia onde permaneciam até o momento da parição.

Após o parto, as vacas eram ordenhadas com ordenhadeira mecânica do tipo balde ao pé ainda nas baias de parição. Antes da ordenha os tetos eram limpos com solução clorada e secos com papel toalha individual. Todo o colostro coletado era avaliado quanto a sua qualidade imunológica pela avaliação indireta da concentração de imunoglobulinas do colostro por meio do colostro *balls* e refratômetro Brix.

Para avaliação do colostro através do colostro *balls*⁷ o conjunto composto por 3 bolas verdes, 1 laranja e 2 vermelhas com diferentes densidades foram

⁷Ms colostro *balls*, Nutri Support®, 3705010

adicionadas em um recipiente contendo 2 litros de colostro, em seguida, realizou-se a leitura, observando-se a quantidade e cor das bolas que flutuaram para a superfície: flutuação apenas de bolas vermelhas e laranja= indicativo de colostro de má qualidade com densidade igual ou abaixo de 1035; bolas vermelhas, laranja e uma verde= colostro de boa qualidade com densidade de 1045; bolas vermelhas, laranja e duas verdes= colostro de ótima qualidade com densidade de 1060; e bolas vermelhas, laranja e três verdes= colostro de ótima qualidade com densidade de 1075. Somente colostro com densidade igual ou maior a 1045 foi utilizado para a colostragem das bezerras.

A determinação do índice BRIX foi realizada utilizando-se refratômetro óptico BRIX com escala entre 0 a 32%⁸. Foi adotado o ponto de corte equivalente a 21% para distinguir colostro com baixa ou boa qualidade (>50mg/mL de IgG) como descrito por Quigley et al. (2013).

Logo após o nascimento as bezerras eram separadas das vacas e transferidas para baias de transição, onde era realizada a cura o umbigo e a colostragem utilizando mamadeira.

A colostragem das bezerras era realizada o mais rápido possível após o nascimento, sendo a primeira mamada fornecida até seis horas de vida. A segunda alimentação era realizada geralmente com um intervalo de 6 horas da primeira mamada. O volume total de colostro oferecido era equivalente a 10% do peso vivo, optando-se por priorizar a ingestão do colostro fresco, seguido do refrigerado (2 a 8°C, máximo 24 horas) ou congelado em situações no qual a 1ª opção era inviável. O colostro congelado ficava armazenado em sacos plásticos em freezer, e o seu descongelamento sempre foi realizado em banho-maria a 37°C.

As mamadeiras e bicos eram lavadas com água quente e detergente para retirar toda a gordura, em seguida eram enxaguadas e adicionadas em um recipiente contendo aproximadamente 10 litros de água e 2 colheres de sopa de água sanitária. Antes do uso eram enxaguadas com água.

A cura do umbigo foi realizada logo após o nascimento pela imersão completa do cordão umbilical em recipiente contendo Umbicura (Pec®) por 1 minuto e meio, repetindo-se o processo após 12 horas. Repetiu-se este processo duas vezes ao dia

⁸Modelo 300001; SperScientific, Scottsdale, AZ

até a mumificação completa do cordão umbilical que ocorria por volta dos 8 a 10 dias de vida das bezerras.

As bezerras permaneceram nas baias de transição próximas a maternidade por aproximadamente três dias, recebendo apenas o colostro e leite de transição na mamadeira, sendo oferecido em torno de 3 litros de leite de transição por mamada, proveniente de *pool* de leite de vacas que estavam 1 a 5 dias no pós-parto. Após este período, as bezerras eram transferidas para o bezerreiro onde permaneciam até o desmame. No bezerreiro as bezerras eram mantidas em baias individuais suspensas de metal e madeira com cama de feno e eram alimentadas por meio de balde, duas vezes ao dia, com um total de seis litros de leite proveniente das vacas pós-parto (1 a 5 dias). Era usado sucedâneo⁹ para completar o volume de leite diário, quando necessário, além de ração comercial e água *ad libitum*. Estes produtos não continham antibióticos como promotor de crescimento. Era realizada a mochação de todas as bezerras do experimento entre 4 e 6 dias de vida utilizando pasta cáustica.

Alguns animais precisaram de tratamentos com antimicrobianos devido a inflamações umbilicais e broncopneumonia, nestes casos os animais foram excluídos destas análises para não haver interferência de outros antimicrobianos.

9.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram selecionadas vinte e seis bezerras híginas após triagem e estas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos compostos por 13 animais: Grupo 1- receberam uma dose do antibiótico Tulatromicina (2,5 mg/Kg) por via subcutânea até doze horas após o nascimento (ATB+); Grupo 2- receberam uma dose de solução fisiológica por via subcutânea até doze horas após o nascimento (ATB-).

⁹Natimilk, Auster®

9.3 HISTÓRICO CLÍNICO

No capítulo 1 desta dissertação está descrito detalhadamente o histórico clínico do grupo ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida. As alterações umbilicais foram detectadas nos bezerros já no D3-5 e persistiram até o D13-15, o grupo ATB- apresentou mais alterações relacionadas à região umbilical e mucosas esbranquiçadas relacionadas à anemia do processo inflamatório crônico. Durante todo o período experimental foram detectadas treze bezerras com broncopneumonia, sendo oito do grupo ATB- e cinco do grupo ATB+.

A diarreia foi à condição de doença mais frequente observada durante o período neonatal, observando-se frequências semelhantes entre os grupos experimentais, porém observamos que os animais do grupo ATB+ apresentaram maior gravidade dos casos de diarreia, com menores valores de matéria seca. O pico máximo de diarreia foi detectado em ambos os grupos no D13-15, a frequência de diarreia diminuiu abruptamente no D20-23 com leve aumento no D27-30. A alta prevalência de diarreia no D13-15 culminou na redução significativa do ganho de peso neste momento. O principal agente etiológico detectado nas fezes dos animais apresentando diarreia foi o *Cryptosporidium*, observou-se também a presença de rotavírus nas fezes de alguns animais.

9.4 MOMENTOS DE AVALIAÇÃO

As avaliações e colheitas das amostras de sangue e fezes foram realizadas nos seguintes momentos: até doze horas após o nascimento ($\leq 12h$); 3-5º dia de vida (D3-5); 7-9º dia de vida (D7-9); 13º-15º dia de vida (D13-15); 20-23º dia de vida (D20-23); e 27-30º dias pós-nascimento (D27-30).

9.5 COLHEITA, PREPARO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal com luvas de látex estéreis e acondicionadas em coletores universais estéreis (Figura 20). Todas as amostras após a coleta foram mantidas refrigeradas até o processamento no laboratório. No laboratório as amostras de fezes foram aliquotadas assepticamente em seis microtubos armazenados em freezer a -80°C .

Figura 20 - Demonstração da coleta de amostras. Coleta de fezes direto da ampola retal utilizando luva estéril (a) – São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

9.6 ANÁLISES LABORATORIAIS

9.6.1 Extração de DNA total das fezes

As fezes estocadas a -80°C foram descongeladas em temperatura ambiente e o DNA foi extraído utilizando kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit¹⁰ conforme instruções do fabricante, com pequenas modificações descritas a seguir.

Foram pesados, 200 ± 20 mg de material fecal em tubo de microcentrífuga estéril de dois mililitros. Adicionou-se ao material fecal 1,4 mL de tampão de lise ASL, misturou-se continuamente em *vortex* por aproximadamente 2 minutos, até completa homogeneização, e aqueceu-se a suspensão por 5 minutos a 95°C em bloco seco. A seguir, a suspensão foi homogeneizada em *vortex* por 2 minutos e centrifugada a $25759 \times g$ por um minuto e meio. O sobrenadante (1,2 mL) foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga estéril onde foi adicionado um tablete InhibitEX que foi imediatamente submetido ao *vortex* até sua completa dissolução (aproximadamente um minuto), após este procedimento a suspensão foi incubada por 1 minuto em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a $25759 \times g$ por três minutos e meio. Todo o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga e centrifugado a $25759 \times g$ por três minutos e meio. Após a centrifugação foram pipetados 200 μL do sobrenadante em um novo tubo de microcentrífuga onde foram adicionados 15 μL de Proteinase K (Qiagen®) e 200 μL de tampão de lise AL e a solução foi vigorosamente misturada em *vortex*. A solução homogênea foi incubada em banho-maria a 70°C por 10 minutos.

A seguir, 200 μL de etanol p.a. (Merck) foram adicionados ao lisado e misturados por *vortex*. Todo o volume foi aplicado na coluna QIAam®, que foi centrifugada a $25759 \times g$ por um minuto e meio. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor onde foram adicionados 500 μL de tampão AW1 e foi centrifugada a $25759 \times g$ por um minuto e meio, a coluna foi novamente transferida para um novo tubo coletor onde foram adicionados 500 μL de tampão AW2 e centrifugada a 25759

¹⁰QIAGEN®, Brasil

x g por três minutos e meio. O tampão residual foi eliminado por centrifugação adicional por um minuto e meio à velocidade máxima (25759 x g). A coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL e foram aplicados 100 µL de tampão AE diretamente sobre a membrana. A coluna foi mantida por cinco minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 25759 x g por um minuto e meio para eluir o DNA.

9.6.2 Determinação da concentração do DNA bacteriano

Após a extração, as suspensões contendo o DNA purificado foram avaliadas quanto à concentração de DNA por espectrofotometria¹¹. O aparelho foi calibrado utilizando o tampão AE (Qiagen), após a calibração foi adicionado 1 µL do DNA extraído para a quantificação do DNA de cada amostra (ng/µL) (Figura 21). Após a quantificação, as amostras contendo o DNA foram mantidas a -30°C.

Figura 21 - Análise para quantificação do DNA extraído por espectrofotometria - São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

¹¹NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA

9.6.3 Construção da curva-padrão para os ensaios de RealTime - PCR

Foram avaliadas quantitativamente os seguintes grupos bacterianos: *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., além do total de bactérias pelo gene 16S rRNA. A padronização de cada curva padrão foi realizada com oito pontos de diluições seriada do DNA cromossômico das seguintes cepas de referência: *Bifidobacterium bifidum* ATCC1696, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Clostridium perfringens* ATCC 13124. A padronização da curva para o 16S rRNA foi utilizado a cepa de referência de *Escherichia coli* ATCC 25922.

A inclinação da curva-padrão para cada DNA das cepas de referência foi calculada por regressão linear segundo as diluições seriadas para cada microrganismo, utilizando programa incorporado no sistema de detecção Rotor Gene 6000¹². Para esta pesquisa foram consideradas apenas as curvas que apresentaram eficiência entre 0,90–1,10 (Figuras 22 a 26). As curvas-padrão foram usadas para determinar os limites de detecção bacteriana e o número de cópias amplificado de DNA em cada uma das amostras fecais.

Figura 22 - Curva padrão para bactérias totais - 16S rRNA (*Escherichia coli* ATCC 25922)

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

¹²Corbett Life Science, Mort lake, New South Wales, Australia

Figura 23 - Curva padrão para *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum* ATCC1696)

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Figura 24 - Curva padrão para *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus* ATCC4356)

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Figura 25 – Curva padrão para *Escherichia coli* (*Escherichia coli* ATCC 25922)

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Figura 26 – Curva padrão para *Clostridium perfringens* (*Clostridium perfringens* ATCC 13124)

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

9.6.4 Análises quantitativas das amostras fecais: PCR quantitativo (SybrGreen)

Para a avaliação dos primers utilizados nesta pesquisa utilizamos o programa NetPrimer¹³ para verificar as melhores condições de amplificação de cada reação (Quadro 5). A determinação das especificidades dos primers foi observada no programa BLAST¹⁴.

As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 20 µL contendo 10 µL do SYBR Green PCR Master Mix 2X que contem *Taq* DNA polymerase, reaction buffer, dNTP mix e SYBR dye¹⁵, 0,5 µL da solução de cada par de primer na concentração de 10 µM, 2 µL de DNA e 7 µL de água ultra pura¹⁶. As amplificações foram realizadas em termociclador Rotor Gene 6000¹⁷. As condições para amplificação foram: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos para desnaturação do DNA, seguidos de 45 ciclos para o *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e 40 ciclos para a *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e 16S rRNA de 95°C por 15 segundos e temperatura de hibridização dos oligonucleotídeos (Tm) para cada um dos primers descritos no quadro 5 por 15 segundos para o *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, 20 segundos para o 16S rRNA e 30 segundos para a *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*. Como controle negativo foi utilizado uma mistura da reação sem DNA. A identificação do sinal fluorescente foi realizada nos 30 segundos finais da etapa de extensão.

¹³Premier Biosoft International

¹⁴National Center for Biotechnology Information-NCBI

¹⁵GoTaq qPCR Master Mix/Promega Corporation, Brasil

¹⁶Promega, Brasil

¹⁷Corbett Life Science, Mort lake, New South Wales, Australia

Quadro 5 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados na quantificação de DNA de bactérias presentes nas fezes de bezerros por qPCR (SybrGreen)

Microorganismos	Seqüência (5'-3')	Produto pb	Tm°C	Referências
Domínio Bactéria	F:ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT R:ATTACCGCGGCTGCTGGC	197	62°C	Ellis et al., 2010
<i>Bifidobacterium</i>	F:TACACCGGAATAGCTCCTGG R:CGTCAAGCTGATAGGACGC	115	58°C	Malmuthuge et al., 2015
<i>Lactobacillus</i>	F:GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC R:GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC	126	55°C	Malmuthuge et al., 2015
<i>Escherichia coli</i>	F:AGAAGCTTGCTCTTTGCTGA R:CTTTGGTCTTGCGACGTTAT	120	57°C	Lee et al., 2010
<i>Clostridium perfringens</i>	F:TCATCATTCAACCAAAGGAGCAATCC R:CCTTGGTAGGCCGTTACCC	105	55°C	Jang et al., 2015

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

O número de cópias para cada bactéria e bactérias totais foi determinado pela relação com os valores das suas respectivas curvas padrão. O número final de cópias de bactérias por grama de fezes foi calculado usando a equação $(QM \times C \times DV) / (S \times V)$, onde QM é a média quantitativa de número de cópias, C é a concentração de DNA de cada amostra, CV o volume da diluição do DNA extraído, S a quantidade de DNA utilizada para a análise (ng) e V o peso da amostra de fezes utilizada para extração do DNA (g) (METZLER-ZEBELI et al., 2013).

9.7 ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS 19.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

As variáveis que apresentaram valores quantitativos foram avaliadas quanto à distribuição em relação à curva gaussiana pelo teste de Shapiro-Wilk. Alguns dados não apresentaram distribuição normal e foram submetidos a uma transformação por

$\log_{10}$, raiz quadrada ou inversa para verificar a possibilidade de realizar uma análise paramétrica.

Os dados paramétricos estão representados pelas medidas de média e desvio padrão, sendo utilizado o teste *T* de *Student* para amostras independentes na comparação dos valores obtidos no grupo ATB- e grupo ATB+ em cada momento. A análise no tempo (≤ 12 h ao D27-30) dentro do mesmo grupo foi feita por cálculos de one-way ANOVA para medidas repetidas com teste post hoc de Tukey.

No caso onde ocorreram as transformações, o valor de *p* apresentado nas tabelas diz respeito aos testes relacionados com os valores transformados, enquanto os valores descritos são reais. As análises foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$ (*) e tendência quando *p* estava entre $>0,05$ e $< 0,1$ (†).

10 RESULTADOS

Este trabalho avaliou a influência da utilização precoce de antibiótico na colonização bacteriana intestinal de bezerras Holandesas durante o primeiro mês de vida por meio da quantificação do DNA das principais bactérias presentes nas fezes.

10.1 DINAMICA DAS PRINCIPAIS BACTÉRIAS DAS FEZES DE BEZERRAS NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA

Em geral, o comportamento das bactérias totais (16S rRNA), *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* para os dois grupos experimentais durante o primeiro mês de vida, especialmente nos momentos que antecederam os episódios de diarreias (≤ 12 h ao D7-9). Dentre as bactérias investigadas, a *Escherichia coli* foi a 1ª a ser detectada nas amostras fecais obtidas antes das 12 horas de vida em ambos os grupos experimentais. No D3-5 e D7-9 observou-se maiores números de cópias para o *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* nas bezerras ATB-. No momento do pico de diarreias (D13-15), todos os grupos bacterianos diminuíram abruptamente. A partir deste evento, a *Escherichia coli* tornou-se predominante no grupo de bezerras que receberam uma dose de tulatomicina (ATB+) (Figuras 27 e 28).

Figura 27 - Valores médios do número de cópias de DNA de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* nas fezes de bezerras Holandesas do grupo ATB- no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.

Figura 28 - Valores médios do número de cópias de DNA de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* nas fezes de bezerras Holandesas do grupo ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento.

Os valores médios e desvio padrão do número de cópias de DNA das bactérias totais (16S rRNA), *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* nas fezes de bezerras do grupo ATB- e ATB+ estão apresentados na tabela 12 e figura 29

Os grupos ATB- e ATB+ não apresentaram diferenças estatísticas entre si em relação ao número de cópias de DNA das bactérias totais (16S rRNA), apesar de que o menor número de cópias sempre foi menor no grupo ATB+. A análise no tempo revelou diferenças entre os momentos nos dois grupos experimentais ($P=0,000$). O número de cópias de DNA das bactérias totais (16S rRNA) foi menor na 1ª avaliação pós-nascimento no grupo ATB- ($4,51E+04$ cópias/grama) e ATB+ ($5,26E+03$ cópias/grama).

Em relação ao *Bifidobacterium*, observou-se diferenças entre grupos no D3-5 ($P=0,002$) e D7-9 ($P=0,018$). As bezerras do grupo ATB- apresentaram maior número de cópias (D3-5= $1,61E+03$; D7-9= $1,12E+03$ cópias/grama), quando comparadas com o grupo ATB+ (D3-5= $3,53E+00$; D7-9= $1,84E+02$ cópias/grama). A análise no tempo revelou diferenças para os 2 grupos ($P=0,000$). Os valores mínimos foram observados para ambos os grupos logo após o nascimento (ATB-= $1,15E+00$; ATB+= $2,22E-01$ cópias/grama), observando-se picos no D3-5 no grupo ATB- ($1,61E+03$ cópias/grama) e D7-9 no grupo ATB+ ($1,84E+02$ cópias/grama). Após os episódios de diarreias os valores tornaram-se mínimos.

Em relação ao *Lactobacillus*, observou-se tendência ($P=0,097$) para maior número de cópias de DNA no grupo ATB- ($4,23E+03$ cópias/grama) em relação ao ATB+ ($6,48E+02$ cópias/grama) no D3-5. A análise no tempo revelou diferenças entre os momentos em ambos os grupos ($P=0,000$). Os valores mínimos foram observados para ambos os grupos até 12 horas após o nascimento (ATB-= $6,90E-01$; ATB+= $6,40E-01$ cópias/grama), observando-se pico máximo de *Lactobacillus* no D7-9 ($6,25E+03$ cópias/grama) para o grupo ATB- e no D20-23 ($4,37E+03$ cópias/grama) para o grupo ATB+. Após os episódios de diarreias, as bezerras ATB- apresentaram redução na quantidade de *Lactobacillus* e assumiram um perfil muito semelhante àquelas do grupo ATB+.

A comparação dos valores médios do número de cópias de *Escherichia coli* nas fezes apresentou tendência no D20-23 e D27-30 ($P=0,052$ e $P=0,072$), no qual o grupo ATB- apresentou menores valores (D20-23= $3,78E+01$; D27-30= $3,78E+01$ cópias/grama) quando comparado com o grupo ATB+ (D20-

23=4,95E+02; D27-30=1,11E+03 cópias/grama). A análise no tempo demonstrou diferenças nos dois grupos experimentais ($P=0,000$). Os valores mínimos foram encontrados nas primeiras 12 horas de vida após o nascimento no grupo ATB+ (1,17E+02 cópias/grama). O pico máximo para ambos os grupos foi observado no D3-5 (ATB-=4,70E+03; ATB+=4,80E+03 cópias/grama), enquanto os valores mínimos no grupo ATB- (3,44E+01 cópias/grama) foram observados no D27-30.

O número de cópias observadas para o *Clostridium perfringens* apresentou perfil semelhante entre os grupos, não sendo possível detectar diferenças estatísticas. Apesar disto, o grupo de animais que recebeu uma dose de tulatromicina logo após o nascimento apresentou menores valores de números de cópias de *Clostridium perfringens* do nascimento até o D20-23. A análise no tempo revelou diferenças em ambos os grupos experimentais ($P=0,000$). Os maiores valores médios foram observados no D3-5 (ATB-= 7,76E+02; ATB+=6,12E+02 cópias/grama), sendo os valores mínimos foram detectados D20-23 em ambos os grupos experimentais (ATB-=9,19E+00; ATB+=5,35E+00 cópias/grama).

Tabela 12 - Valores médios do número de cópias de DNA das bactérias totais (16S rRNA), *Bifidobacterium*, *Latobacillus*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* nas fezes de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016

M(s)	Bactérias totais (16S rRNA)					
	ATB -			ATB +		P
≤12h	4,51E+04±1,45E+05 ^a			5,26E+03±1,86E+04 ^a		0,381
D3-5	3,69E+05±4,92E+05 ^b			2,75E+05±2,61E+05 ^b		0,675
D7-9	1,12E+06±9,66E+05 ^b			6,91E+05±5,14E+05 ^b		0,879
D13-15	5,79E+05±6,16E+05 ^b			3,29E+05±4,82E+05 ^b		0,260
D20-23	6,03E+05±9,38E+05 ^b			5,57E+05±6,33E+05 ^b		0,958
D27-30	4,01E+05±2,72E+05 ^b			3,69E+05±2,74E+05 ^b		0,561
P	0,000*			0,000*		
M(s)	<i>Bifidobacterium</i>			<i>Lactobacillus</i>		
	ATB -	ATB +	P	ATB -	ATB +	P
≤12h	1,15E+00±3,60E+00 ^a	2,22E-01±2,20E-01 ^a	0,542	6,90E-01±8,30E-01 ^a	6,40E-01±6,20E-01 ^a	0,829
D3-5	1,61E+03±2,33E+03 ^{bc}	3,53E+00±6,71E+00 ^{ac}	0,002*	4,23E+03±8,53E+03 ^b	6,48E+02±9,50E+02 ^{ab}	0,097†
D7-9	1,12E+03±1,15E+03 ^b	1,84E+02±4,24E+02 ^{bd}	0,018*	6,25E+03±6,26E+03 ^b	3,12E+03±2,61E+03 ^b	0,177
D13-15	3,19E+01±6,07E+01 ^{cd}	7,30E+00±1,04E+01 ^{cd}	0,392	3,36E+03±2,59E+03 ^b	2,93E+03±3,62E+03 ^b	0,478
D20-23	4,96E+01±1,25E+02 ^{bc}	8,18E+00±1,43E+01 ^{ad}	0,451	4,31E+03±4,24E+03 ^b	4,37E+03±4,99E+03 ^b	0,865
D27-30	5,99E+00±1,43E+01 ^{ad}	4,47E+00±7,51E+00 ^{ad}	0,936	3,00E+03±2,32E+03 ^b	2,27E+03±2,43E+03 ^b	0,356
P	0,000*	0,000*		0,000*	0,000*	
M(s)	<i>E. coli</i>			<i>C. perfringens</i>		
	ATB -	ATB +	P	ATB -	ATB +	P
≤12h	1,11E+03±3,47E+03 ^a	1,17E+02±4,18E+02 ^a	0,168	1,10E+02±3,48E+02 ^a	9,15E+00±2,48E+01 ^a	0,536
D3-5	4,70E+03±7,65E+03 ^b	4,80E+03±8,93E+03 ^b	0,987	7,76E+02±1,49E+03 ^b	6,12E+02±2,48E+01 ^b	0,546
D7-9	4,86E+02±7,73E+02 ^{bc}	2,83E+02±5,77E+02 ^{bc}	0,144	6,17E+01±1,33E+02 ^{ab}	4,08E+01±8,13E+01 ^{ab}	0,221
D13-15	3,56E+01±4,21E+01 ^{ac}	5,83E+01±1,12E+02 ^c	0,671	5,95E+01±8,33E+01 ^{ac}	3,42E+01±5,42E+01 ^{aab}	0,992
D20-23	3,78E+01±1,01E+02 ^a	4,95E+02±1,18E+03 ^c	0,052†	9,19E+00±1,10E+01 ^{ac}	5,35E+00±9,90E+00 ^a	0,522
D27-30	3,44E+01±8,68E+01 ^a	1,11E+03±3,33E+03 ^c	0,072†	1,56E+02±1,70E+02 ^{bc}	2,19E+02±2,91E+02 ^b	0,927
P	0,000*	0,000*		0,000*	0,000*	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student* ou diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA. Letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os momentos dentro de cada grupo pelo teste de Tukey.

Figura 29 - Valores médios do número de cópias de DNA de bactérias totais (16S rRNA), *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* nas fezes de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento. * Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student*.

11 DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado para ilustrar as mudanças que ocorrem na população de bactérias totais (16S rRNA), *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* nas fezes de bezerros no período neonatal, em resposta a administração precoce de tulatromicina na dose recomendada para tratamento metafilático (2,5 mg/Kg).

A microbiota fecal é composta apenas pelos microorganismos que estão no lúmen da região reto-sigmóide, e essas populações diferem um pouco entre as porções do intestino, como região íleo-cecal, superfícies das mucosas das criptas e vilosidades, havendo dessa forma diferenças entre as populações da região superior e inferior do intestino. Apesar destas variações, o material fecal tem sido usado como reflexo do microbiota intestinal devido à questões de bioética envolvidas com a eutanásia de animais para o estudo dos microorganismos aderidos aos tecidos. Em relação à técnica para a detecção dos grupos bacterianos, ressalta-se que o PCR em tempo real detecta DNA. Assim não é possível fazer a distinção entre a presença de bactérias viáveis e não viáveis (HILL; DRASAR, 1975; PANDA et al., 2014).

A maioria das fezes coletadas até 12 horas após o nascimento era mecônio, somente dois animais do grupo ATB- e um animal do grupo ATB+ apresentaram fezes pastosas neste momento. Observamos um baixo número de cópias de DNA principalmente para *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em ambos os grupos. O número de bactérias totais estava menor em relação aos demais tempos avaliados, mas foi possível observar uma quantidade significativa de cópias de DNA, observando-se detecção de elevado número de cópias do DNA de *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* neste momento, especialmente nas bezerras do grupo ATB- em relação ao grupo ATB+. Em uma análise individual dos resultados observamos que os animais que apresentaram fezes pastosas neste momento tinham valores muito altos de bactérias totais, *E. coli* e *C. perfringens* quando comparados aos animais que apresentavam mecônio. Desta forma, estes valores aumentaram os valores médios dessas bactérias do grupo ATB- em relação ao grupo ATB+.

Antigamente acreditava-se que o útero era um ambiente completamente estéril (JIMÉNEZ et al., 2005; FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013), mas com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e pesquisas utilizando sangue

do cordão umbilical, placenta, líquido amniótico e mecônio demonstraram que a colonização se inicia em pequena escala no período fetal (JIMÉNEZ et al., 2005; SATOKARI et al., 2009; FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013; GOSALBES et al., 2013). Bactérias da família *Enterobacteriaceae*, principalmente *Escherichia* e *Shigella* e alguns gêneros bacterianos pertencentes ao filo *Firmicutes*, já foram detectados no mecônio de bebês saudáveis logo após o nascimento (GOSALBES et al., 2013). Desta forma podemos imaginar que os bezerros podem ter adquirido essas bactérias encontradas no mecônio ainda no útero ou durante a passagem pelo canal vaginal no trabalho de parto, no entanto não podemos excluir a possibilidade de contaminação ambiental.

Costa (2016) também encontraram bactérias aeróbicas no mecônio de bezerras holandesas por métodos de cultura tradicional e provas bioquímicas. As bactérias isoladas foram *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp. *Morganella* spp., *Proteus* spp. e bactéria não fermentativa.

O maior número de cópias bacterianas considerando todos os agentes investigados foi detectado no 2º momento de avaliação (D3-5), em ambos os grupos experimentais. Este pico de detecção bacteriana também foi observado na dissertação de mestrado de Costa (2016) que pesquisou bactérias aeróbias e detectou uma grande quantidade de bactérias próprias da microbiota neste momento, como as pertencentes aos gêneros *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp. O autor sugere que as mudanças ambientais e ingestão do colostro foram responsáveis por esse aumento.

As bezerras do experimento foram retiradas das baias de parição e transferidas para baias de transição na maternidade imediatamente após o nascimento, onde foi realizada a cura do umbigo e colostragem. Desta forma verificamos que o contato das recém-nascidas com o meio externo e o aleitamento intensificaram a colonização intestinal. Malmuthuge et al. (2015) verificaram que o fornecimento de colostro favorece a colonização intestinal de bezerros.

A população de *Lactobacillus* aumentou significativamente entre 12 horas até D7-9, deste momento até o final do período experimental as bactérias deste gênero predominaram em relação aos demais grupos identificados nos bezerros ATB- e ATB+. O *Lactobacillus* pertence ao grupo de bactérias ácido-láticas que produzem ácido láctico a partir da quebra da glicose e fermentação láctica (HEINRICHS et al., 2003; FERNÁNDEZ et al., 2013). Em animais saudáveis é observado um aumento

de bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* no primeiro mês de vida, principalmente o *Lactobacillus*, devido à ingestão de leite. Após os trinta dias de vida, com a introdução da dieta sólida e diminuição do consumo de leite esta população tende a diminuir (OIKONOMOU et al., 2013; KLEIN-JOBSTL et al., 2014; OULTRAM et al., 2015).

A colonização intestinal por bactérias do gênero *Bifidobacterium* nas bezerras que não tratadas com tulatromicina ao nascimento (ATB-) iniciou-se de fato no D3-5, onde houve o pico de detecção do DNA dessas bactérias nas fezes. Esta população permaneceu em elevadas quantidades no D7-9, com diminuição nos momentos subsequentes até o final do experimento.

Trabalhos em humanos mostram alta quantidade de espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (GRONLUND et al., 2007; MARTIN et al., 2007; MAKINO et al., 2013) na vagina e leite materno. Martin et al. (2017) relataram que a maior parte das cepas de *Lactobacillus* encontradas em bebês eram semelhantes as detectadas no leite materno. Enquanto o trabalho realizado por Makino et al. (2013), revelou que bebês nascidos por via vaginal apresentaram as mesmas cepas de *Bifidobacterium* spp. presentes nas fezes de suas respectivas mães, e bebês nascidos por cesariana continham maior diferença entre as cepas. Com essas informações podemos concluir que os recém nascidos adquirem *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* primeiramente durante o parto e posteriormente ocorre a ingestão dessas bactérias por via colostro e leite. O uso de colostro e leite pasteurizado vem aumentando na criação de bezerras, desta forma é importante investigar a influência desse tipo de alimentação na colonização intestinal.

Um trabalho realizado por Malmuthuge et al. (2015) mostrou que bezerros alimentados com colostro pasteurizado apresentavam maiores quantidades de DNA de *Bifidobacterium* no conteúdo intestinal quando comparado aos animais que receberam colostro não pasteurizado. Os autores não detectaram amplificação de DNA de bactérias no colostro após o processo de pasteurização. Desta forma é sugerido que o aumento da população de *Bifidobacterium* no intestino de bezerros que recebem colostro pasteurizado ocorreu pela maior disponibilidade de oligossacarídeos neste tipo de colostro devido à quebra dos açúcares no momento da pasteurização (alta temperatura). O leite bovino, e principalmente o colostro, contém oligossacarídeos não digeríveis que promovem a proliferação de bactérias

intestinais específicas, especialmente o *Bifidobacterium* spp. favorecendo o crescimento dessa população bacteriana no período de colostragem e aleitamento (MALMUTHUGE et al., 2015; GOMEZ et al., 2017).

O D3-5 foi o momento subsequente a administração do antimicrobiano, sendo assim as maiores diferenças entre os grupos foram encontradas neste momento devido as elevadas concentrações plasmáticas do antimicrobiano. Em geral, todas as populações bacterianas do grupo ATB+ apresentaram menor número de cópias em relação ao grupo que não recebeu antibiótico, porém observamos diferenças e tendência entre grupos apenas para a população de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Ainda foi possível detectar os efeitos do antimicrobiano no momento D7-9, no qual todas as populações bacterianas do grupo ATB+ permaneciam menores em comparação ao grupo ATB-. Apesar disto, as diferenças foram observadas apenas na população de bactérias do gênero *Bifidobacterium*.

Muitos fatores relacionados às características dos antimicrobianos influenciam no seu efeito sobre as populações bacterianas como o espectro de ação, dose utilizada, tempo de exposição, via de administração e suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas (ANTONPOULOS et al., 2009; SUCHODOLSKI et al., 2009; JERNBERG et al., 2010; SCHULFER; BLASER, 2015). Por isso para compreender melhor os efeitos do antibiótico nas populações bacterianas precisamos entender melhor seu mecanismo de ação.

A tulatromicina é um antimicrobiano macrolídeo semi-sintético de ação prolongada composto por triamilida, seu efeito bacteriostático é decorrente da inibição da síntese proteica essencial para o metabolismo das bactérias, em consequência da sua ligação seletiva a subunidade 50S do ribossomo bacteriano. A tulatromicina atinge concentração máxima no plasma após 30 minutos da administração, sua meia vida no plasma é de 90 horas, e o período de carência para bovinos (carne) é de 22 dias (ANDRADE, 2008; SUCHODOLSKI et al., 2009; STANTON et al., 2013; IVES et al., 2015; ZOETIS, 2014).

Os macrolídeos de maneira geral são mais eficazes em atravessar a membrana de bactérias Gram-positivas em comparação aos microorganismos Gram-negativos, portanto sua ação é maior contra bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Clostridium* spp. e algumas espécies de Micoplasmas, além das bactérias Gram-negativas como *Pasteurella* spp. e *Campylobacter* spp. e alguns anaeróbios. As enterobactérias, como por exemplo,

Escherichia coli e bacilos gram-negativos são comumente resistentes aos antibióticos dessa classe (ANDRADE, 2008; SUCHODOLSKI et al., 2009). Testes *in vitro* mostraram que a tulatromicina possui atividade contra microrganismos associados às doenças respiratórias, sendo os principais: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis* e *Bordetella bronchiseptica*, *Dichelobacter nodosus*, *Moraxella bovis* (ZOETIS, 2014).

A tulatromicina faz parte do grupo de antimicrobianos aprovados internacionalmente para o tratamento e controle da Doença Respiratória Bovina em gado de corte e leite não lactante. Ao contrário de outros antimicrobianos atualmente disponíveis, a tulatromicina mantém concentrações efetivas contra patógenos comumente associados com a Doença Respiratória por até 10 dias após sua administração (STANTON et al., 2013; IVES et al., 2015).

Alguns estudos em humanos (ANTONOPOULOS et al., 2009; PANDA et al., 2014) e bezerros (OULTRAM et al., 2015) também avaliaram a resposta da microbiota intestinal após administração parenteral de florfenicol, tulatromicina, oxitetraciclina, fluoroquinolona, amoxicilina, metronidazol e antibióticos β -lactâmicos. A redução significativa da riqueza e diversidade da microbiota intestinal após o uso dos antimicrobianos coincidem com os dados observados nesta pesquisa. A diminuição das populações de bactérias parece um achado comum, não estando tão associado ao tipo ou dose do antibiótico utilizado.

Dentre as populações bacterianas pesquisadas, as que mais sofreram influência do uso do antibiótico foram o *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus*. A adição de ampicilina no leite (GRONLUND et al., 2000) ou tratamento de bezerras doentes no aleitamento com antimicrobianos (florfenicol, tulatromicina e oxitetraciclina) por via parenteral (OULTRAM et al., 2015) também alteraram a população de várias espécies bacterianas, porém os maiores efeitos deletérios foram observados principalmente para a população de *Bacteroides fragili*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*.

As bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são comumente utilizadas na alimentação de humanos e animais em formulações probióticas. Diferentemente de outras bactérias, essas estão adaptadas para residir no trato gastrointestinal e interagir de forma simbiótica com seu hospedeiro. Alguns trabalhos mostram o potencial antiinflamatório, imunomodulador e metabólico tanto *in vitro*

como *in vivo* dessas bactérias e seus efeitos benéficos no ganho de peso, conversão alimentar e incidência de diarreia em humanos e bezerros no primeiro mês de vida (HEINRICHS et al., 2003; MARTIN et al., 2012; FERNÁNDEZ et al., 2013; MALMUTHUGE et al., 2015; MALMUTHUGE et al., 2015b). A administração de tulatromicina reduziu a população de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* no D3-5 e de *Bifidobacterium* também no D7-9, esses resultados mostram o efeito negativo do uso de antibióticos sobre a população de bactérias consideradas benéficas e que possuem potencial para uso como probiótico.

Os microorganismos probióticos têm sido utilizados com a alimentação como adjuvantes para promover uma melhora no estado de saúde de humanos e animais (MALDONADO et al., 2012). A utilização de probióticos contendo bactérias ácido lácticas como, por exemplo, *Lactobacillus*, já é conhecida em todo o mundo. A administração destas bactérias foi associada com a diminuição da colonização de vários agentes patogênicos causadores de infecção, tais como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (SIGNORINI et al., 2009; WANG et al., 2012). A *Bifidobacteria* é considerada um excelente probiótico por possuir ação antibacteriana com diminuição do perfil inflamatório dos enteropatógenos, principalmente sua pela produção de compostos ácidos, que inibem o crescimento de patógenos pela diminuição do pH gastrointestinal e também atuam na inibição da aderência de bactérias patogênicas como a *Escherichia coli* através da competição por receptores (MARTIN et al., 2012; FERNÁNDEZ et al., 2013; MALMUTHUGE et al., 2015).

As bactérias da espécie *Clostridium perfringens* avaliadas em nosso estudo foram as que menos sofreram alterações decorrentes do uso de tulatromicina, esse resultado não era esperado uma vez que esta classe de antibióticos apresenta sensibilidade *in vitro* frente a essa bactéria e é recomendado para o tratamento de enterites causados por *Clostridium perfringens* (ANDRADE, 2008; SUCHODOLSKI et al., 2009).

Uma pesquisa realizada em cães saudáveis por Suchodolski et al. (2009) relatou um aumento na população de *Clostridium perfringens* no conteúdo do jejuno após a administração de tilosina (macrolídeo). Os autores afirmam que os macrolídeos são recomendados para o tratamento de enteropatias crônicas em cães, devido ao seu efeito conhecido sobre alguns patógenos gastrointestinais que participam da etiopatogenia da doença, como por exemplo, o *Clostridium perfringens*.

Esses resultados ilustram a complexidade da microbiota intestinal e os desafios associados à avaliação do efeito dos antimicrobianos nos diversos grupos bacterianos presentes no intestino e suas potenciais interações. É possível notar que os resultados dos testes de sensibilidade realizados *in vitro* não correspondem necessariamente às alterações que serão observadas *in vivo*. Possivelmente essas alterações ocorrem no ambiente intestinal devido ao complexo ecossistema ali existente. A utilização de antimicrobianos induz mudanças que podem ser maléficas para um conjunto de organismos enquanto para outros pode ser benéfica, além disso, as alterações nas populações de uma bactéria podem favorecer o aparecimento e desenvolvimento de outras ou diminuir seu crescimento. Essas alterações na dinâmica das populações bacterianas intestinais que ocorrem após o uso de antimicrobianos *in vivo* não estão previstas quando são realizados testes de sensibilidade *in vitro* (SUCHODOLSKI et al., 2009).

A bactéria *Escherichia coli* foi a espécie predominante no D3-5, observando-se queda acentuada no D7-9 em ambos o grupos. Este achado está de acordo com Rada et al. (2006) que relataram maior frequência da população bacteriana em questão no terceiro dia, observando-se diminuição acentuada até o sétimo dia. Como já era esperado a população de *Escherichia coli* não sofreu alterações logo após a administração de tulatromicina devido a já relatada resistência apresentada por bactérias deste grupo aos macrolídeos. Bactérias desta espécie têm sido associadas a um impacto negativo na saúde gastrointestinal de bezerros e são consideradas o principal agente bacteriano responsável por casos de diarreia em bezerros nos primeiros dias de vida (BARTELS et al., 2010; MEGANCK et al., 2014).

A administração de tulatromicina não foi a única responsável pelas alterações observadas na dinâmica das bactérias pesquisadas nas fezes das bezerras de ambos os grupos. Este fato é claro no momento D13-15, no qual as bezerras ATB- e ATB+ apresentaram elevada e semelhante prevalência de diarreias.

Os dados desta pesquisa demonstraram diminuição na população de *Bifidobacterium*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* após os episódios de diarreias no D13-15. Não foram encontradas diferenças entre o D13-15 para a população de bactérias totais e *Lactobacillus*, apesar da diminuição observada nos momentos subsequentes ao D13-15. A dinâmica das bactérias no tempo sugere que as diarreias promoveram alterações no microbioma bacteriano do trato gastrointestinal.

Geralmente a diversidade bacteriana está associada a um intestino saudável (YOUMANS et al., 2015). Oikonomou et al. (2013) relataram diferenças entre as populações de bactérias em bezerros com e sem diarreia, com menor diversidade bacteriana intestinal nos animais que apresentaram diarreia, neste trabalho os autores observaram também uma correlação positiva entre a diversidade bacteriana intestinal e o ganho de peso

A diarreia neonatal é uma disfunção complexa e de causa multifatorial, envolvendo agentes etiológicos bacterianos, virais e os protozoários. Nesta pesquisa as diarreias eram causadas por agentes não bacterianos como o *Cryptosporidium* e rotavírus.

Surpreendentemente observamos um aumento na população de *Escherichia coli* no grupo ATB+ nos últimos momentos avaliados (D20-23 e D27-30) após o fim do efeito do antimicrobiano, quando as populações das demais bactérias avaliadas já haviam se restabelecido. Não sabemos ao certo porque essas alterações ocorreram tão tardiamente. Devido ao número limitado de bactérias pesquisadas não podemos afirmar se está população de bactérias aumentou em decorrência da diminuição de outros grupos bacterianos que não foram pesquisados.

De uma maneira geral verificamos que uma única dose de antimicrobianos alterou substancialmente a dinâmica das populações bacterianas do intestino. As bactérias consideradas benéficas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) sofreram mais alterações deletérias nos momentos mais próximos da administração do antimicrobiano, enquanto as bactérias com potencial patogênico não sofreram muitas alterações e no caso da *Escherichia coli* observamos um aumento da população nos últimos momentos de coleta (D20-23 e D27-30). Suchodolski et al. (2009) demonstraram que os antimicrobianos da classe macrolídeos (tilosina) afetam significativamente as proporção de vários grupos bacterianos no intestino de cães. Um estudo recente realizado por Xie et al. (2013) também demonstraram alterações no microbioma fecal de bezerros de corte tratados com bacitracina e desalicilato de metileno por via oral, observando-se aumento no número de patógenos oportunistas como *Escherichia*, *Enterococcus* e *Shigella*, e diminuição das bactérias benéficas como *Roseburia*, *Faecalibacterium* e *Eubacterium*.

Pesquisas com a microbiota fecal de humanos mostraram que a maioria das populações bacterianas retorna ao seu estado inicial dentro de 30 dias, porém algumas espécies bacterianas não conseguem se recuperar por até 6 meses após a

interrupção da administração do antibiótico (GRONLUND et al., 2000; JERNBERG et al., 2010; SUCHODOLSKI et al., 2009; PANDA et al., 2014). Vários fatores influenciam na capacidade de recuperação das populações bacterianas aos níveis pré-tratamento incluindo o mecanismo de ação do antimicrobiano, dose utilizada, duração do tratamento, bem como as características individuais de cada hospedeiro e a composição inicial da microbiota (SCHULFER; BLASER, 2015).

Em geral, na nossa pesquisa as mudanças microbianas observadas nos grupos bacterianos após o uso de antimicrobianos ocorreram principalmente em três padrões: (1) grupos bacterianos que diminuíram suas proporções logo após a administração do antibiótico (D3-5 e D7-9) e recuperaram-se tardiamente (D20-23 e D27-30); (2) bactérias que mantiveram suas proporções logo após a administração do antibiótico (D3-5 e D7-9) e apresentaram um aumento tardio (D20-23 e D27-30) e (3) bactérias que não foram influenciadas pelo uso do antimicrobiano em nenhum dos momentos avaliados.

O aumento da carga bacteriana de uma população após o uso de antibióticos pode estar associada à diminuição na diversidade bacteriana. A redução dos microorganismos sensíveis a classe de antibiótico utilizada proporciona espaço para as cepas resistentes crescerem e dominarem o ambiente. Essa remodelação das populações bacterianas devido às diferenças na sensibilidade aos antimicrobianos determina quais bactérias irão aumentar ou diminuir. Desta forma o uso contínuo de antibióticos pode favorecer a permanência de cepas resistentes em longo prazo (PANDA et al., 2014).

12 CONCLUSÃO

A administração de tulatromicina na dose metafilática (2,5 mg/Kg) ao nascimento influenciou na microbiota de bezerras recém-nascidas, observando-se diminuição da população de bactérias simbióticas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) e aumento tardio da população de *Escherichia coli* nas fezes das bezerras.

REFERÊNCIAS

- ABE, F.; ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets, **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2838-2846, 1995.
- ANDRADE, S. F. Manual **de** terapêutica *Veterinária*, 3 ed. São Paulo: Editora Roca, 2008, 912 p.
- ANTONPOULOS, D. A.; HUSE, S. M.; MORRISON, H. G.; SCHMIDT, T. M.; SOGIN, M. L.; YOUNG, V. B. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. **Infection and immunity**, v. 77, n. 6, p. 2367-2375, 2009.
- AZIZ, Q.; DORÉ, J.; EMMANUEL, A.; GUARNER, F.; QUIGLEY, E. M. M. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n. 1, p. 4-15, 2013.
- BARTELS, C. J. M.; HOLZHAUER, M.; JORRITSMA, R.; SWART, W. A. J. M.; LAM, T. J. G. M. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, p. 162–169, 2010.
- BELENGUER, A.; DUNCAN, S. H.; CALDER, A. G.; HOLTROP, G.; LOUIS, P.; LOBLEY, G. E.; FLINT, H. J. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3593-3599, 2006.
- BERGE, A. C. B.; MOORE, D. A.; BESSER, T. E.; SISCHO, W. M. Targeting therapy to minimize antimicrobial use in preweaned calves: Effects on health, growth, and treatment costs. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 9, p. 4707-4714, 2009.
- COSTA, J. F. R. **Influência dos leucócitos do colostro no desenvolvimento da microbiota intestinal, resposta imune inata e incidência de diarreias em bezerras recém-nascidas**. São Paulo, 2016. 157 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- EDRINGTON, T. S.; DOWD, S. E.; FARROW, R. F.; HAGEVOORT, G. R.; CALLAWAY, T. R.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J. Development of colonic microflora as assessed by pyrosequencing in dairy calves fed waste milk. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 8, p. 4519-4525, 2012.
- ELLIS, C. L.; MA, Z. M.; MANN, S. K.; LI, C. S.; WU, J.; KNIGHT, T. H.; OVERMAN, H. A. Molecular characterization of stool microbiota in HIV-infected subjects by panbacterial and order-level 16S ribosomal DNA (rDNA) quantification and correlations with immune activation. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 57, n. 5, p. 363, 2011

FERNÁNDEZ, L.; LANGA, S.; MARTÍN, V.; MALDONADO, A.; JIMÉNEZ, E.; MARTÍN, R.; RODRÍGUEZ, J. M. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 1-10, 2013.

FERRAREZI, M. C.; CARDOSO, T. C.; DUTRA, I. S. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from calves with neonatal diarrhea. **Anaerobe**, v. 14, n. 6, p. 328-331, 2008.

FODITSCH, C.; PEREIRA, R. V. V.; GANDA, E. K.; GOMEZ, M. S.; MARQUES, E. C.; SANTIN, T.; BICALHO, R. C. Oral administration of *Faecalibacterium prausnitzii* decreased the incidence of severe diarrhea and related mortality rate and increased weight gain in preweaned dairy heifers. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0145485, 2015.

FUNKHOUSER, L. J.; BORDENSTEIN, S. R. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. **PLoS Biol**, v. 11, n. 8, p. e1001631, 2013.

GOMEZ, D. E.; ARROYO, L. G.; COSTA, M. C.; VIEL, L.; WEESE, J. S. Characterization of the Fecal Bacterial Microbiota of Healthy and Diarrheic Dairy Calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 3, p. 928-939, 2017.

GOSALBES, M. J.; LLOP, S.; VALLES, Y.; MOYA, A.; BALLESTER, F.; FRANCINO, M. P. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 43, n. 2, p. 198-211, 2013.

GRONLUND, M-M.; ARVILOMMI, H.; KERO, P.; LEHTONEN, O-P.; ISOLAURI, E. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal**, v. 83, p. 186-192, 2000.

GRÖNLUND, M. M.; GUEIMONDE, M.; LAITINEN, K.; KOCIUBINSKI, G.; GRÖNROOS, T.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 37, n. 12, p. 1764-1772, 2007.

HEINRICHS, A. J.; JONES, C. M.; HEINRICHS, B. S. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 12, p. 4064-4069, 2003.

HILL, M. J.; DRASAR, B. S. The normal colonic bacterial flora. **Gut**, v. 16, n. 4, p. 318-323, 1975.

IVES, S. E.; RICHESON, J. T. Use of Antimicrobial Metaphylaxis for the Control of Bovine Respiratory Disease in High-Risk Cattle. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 31, n. 3, p. 341–350, 2015.

JANG, H. J.; HAN, J. I.; KANG, H. M.; NA, K. J. Development of a Panel of Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays for Simultaneous Detection of Canine Enteric Bacterial Pathogens. **J Vet Clin**, v. 32, n. 2, p. 154-157, 2015.

JERNBERG, C.; LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; JANSSON, J. K. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. **Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 3216, 2010.

JIMÉNEZ, E.; FERNÁNDEZ, L.; MARÍN, M. L.; MARTÍN, R.; ODRIÓZOLA, J. M.; NUENO-PALOP, C.; RODRÍGUEZ, J. M. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. **Current microbiology**, v. 51, n. 4, p. 270-274, 2005.

LEE, J. H.; SHIN, J. S.; BAE, J. E. Quantitative detection of residual E. coli host cell DNA by real-time PCR. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 1463-1470, 2010.

LIMA, S. F.; TEIXEIRA, A. G.; LIMA, F. S.; GANDA, E. K.; HIGGINS, C. H.; OIKONOMOU, G.; BICALHO, R. C. The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 3031-3042, 2017.

MALDONADO, N. C.; DE RUIZ, C. S.; OTERO, M. C.; SESMA, F.; NADER-MACÍAS, M. E. Lactic acid bacteria isolated from young calves—characterization and potential as probiotics. **Research in veterinary science**, v. 92, n. 2, p. 342-349, 2012.

MALMUTHUGE, N.; CHEN, Y.; LIANG, G.; GOONEWARDENE, L. A. Heat-treated colostrum feeding promotes beneficial bacteria colonization in the small intestine of neonatal calves. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 11, p. 8044-8053, 2015.

MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P. J.; GUAN, L. L. The Gut Microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, p. 36, 2015.b

MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P. J. Taxonomic identification of commensal bacteria associated with the mucosa and digesta throughout the gastrointestinal tracts of preweaned calves. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 6, p. 2021-2028, 2014.

MALMUTHUGE, N.; GUAN, L. L. Understanding the gut microbiome of dairy calves: Opportunities to improve early-life gut health. **Journal of Dairy Science**, 2017.

MAKINO, H.; KUSHIRO, A.; ISHIKAWA, E.; KUBOTA, H.; GAWAD, A.; SAKAI, T.; TANAKA, R. Mother-to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early development of vaginally delivered infant's microbiota. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e78331, 2013.

MARTIN, V.; BARRAGÁN, A. M.; MOLES, L.; BANOS, M. R.; CAMPO, R.; FERNANDEZ, L.; RODRIGUEZ, J. M.; JIMENEZ, E. Sharing of bacterial strains between breast milk and infants feces. **Journal of Human Lactation**, v. 28, n. 1, p. 36-44, 2012.

MARTÍN, R.; HEILIG, G. H. J.; ZOETENDAL, E. G.; SMIDT, H.; RODRÍGUEZ, J. M. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2638-2644, 2007.

MAYER, M.; ABENTHUM, A.; MATTHES, J. M.; KLEEBERGER, D.; EGE, M. J.; HÖLZEL, C.; BAUER, J.; SCHWAIGER, K. Development and genetic influence of the rectal bacterial flora of newborn calves. **Veterinary microbiology**, v. 161, n. 1-2, p. 179, 2012.

MEGANCK, V.; HOFLACK, G.; OPSOMER, G. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. **Acta Veterinaria Scandinavica**, p. 56-75, 2014.

METZLER-ZEBELI, B. U.; HOODA, S.; PIEPER, R.; ZIJLSTRA, R. T.; VAN KESSEL, A. G.; MOSENTHIN, R.; GÄNZLE, M. G. Nonstarch polysaccharides modulate bacterial microbiota, pathways for butyrate production, and abundance of pathogenic *Escherichia coli* in the pig gastrointestinal tract. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 11, p. 3692-3701, 2010.

OIKONOMOU, G.; TEIXEIRA, A. G. V.; FODITSCH, C.; BICALHO, M. L.; MACHADO, V. S.; BICALHO, R. C. Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of *Faecalibacterium* species with health and growth. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2015.

OULTRAM, J.; PHIPPS, E.; TEIXEIRA, A. G.; FODITSCH, C.; BICALHO, M. L.; MACHADO, V. S.; OIKONOMOU, G. Effects of antibiotics (oxytetracycline, florfenicol or tulathromycin) on neonatal calves' faecal microbial diversity. **The Veterinary Record**, v.177, n.23, p.598, 2015.

PANDA, S.; CASELLAS, F.; VIVANCOS, J. L.; CORS, M. G.; SANTIAGO, A.; CUENCA, S.; Guarner, F.; MANICHANH, C. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95476, 2014.

PEREIRA, R. V. V.; LIMA, S.; SILER, J. D.; FODITSCH, C.; WARNICK, L. D.; BICALHO, R. C. Ingestion of milk containing very low concentration of antimicrobials: Longitudinal effect on fecal microbiota composition in preweaned calves. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0147525, 2016.

QUIGLEY, J.VD.; LAGO., A.; CHAPMAN, C.; ERICKSON, P.; POLO, J. Evaluation of the BRIX refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. **Journal Dairy Science**, v.96, n.2, p.1148-1155, 2013.

RADA, V.; VLOKOVÁ, E.; NEVORAL, J.; TROJANOVÁ, I. Comparison of bacterial flora and enzymatic activity in faeces of infants and calves. **Microbiology Letters**, v. 258, p. 25-28, 2006.

RUTTEN, N. B. M. M.; RIJKERS, G. T.; MEIJSEN, C. B.; CRIJNS, C. E.; OUDSHOORN, J. H.; VAN DER ENT, C. K.; VLIEGER, A. M. Intestinal microbiota

composition after antibiotic treatment in early life: the INCA study. **BMC pediatrics**, v. 15, n. 1, p. 204, 2015.

SIGNORINI, M. L.; SOTO, L. P.; ZBRUN, M. V.; SEQUEIRA, G. J.; ROSMINI, M. R.; FRIZZO, L. S. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. **Research in veterinary science**, v. 93, n. 1, p. 250-258, 2012.

STANTON, A. L.; KELTON, D. F.; LEBLANC, S. J.; MILLMAN, S. T.; WORMUTH, J.; DINGWELL, R. T.; LESLIE, K. E. The effect of treatment with long-acting antibiotic at postweaning movement on respiratory disease and on growth in commercial dairy calves. **J Dairy Sci**, v. 93, n. 2, p. 574–581, 2010

SUCHODOLSKI, J. S.; DOWD, S. E.; WESTERMARCK, E.; STEINER, J. M.; WOLCOTT, R. D.; SPILLMANN, T.; HARMOINEN, J. A. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 210, 2009.

SCHULFER, A.; BLASER, M. J. Risks of antibiotic exposures early in life on the developing microbiome. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 7, p. e1004903, 2015.

WANG, S.; ZHU, H.; LU, C.; KANG, Z.; LUO, Y.; FENG, L.; LU, X. Fermented milk supplemented with probiotics and prebiotics can effectively alter the intestinal microbiota and immunity of host animals. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 9, p. 4813-4822, 2012

XIE, G., G. C.; DUFF, L. W.; HALL, J. D.; ALLEN, C. D.; BURROWS, J. C.; BERNAL-RIGOLI, S. E.; DOWD, V.; GUERRIERO, C. J.; YEOMAN, V. Alteration of digestive tract microbiome in neonatal Holstein Bull calves by bacitracin methylene disalicylate treatment and scours. **J. Anim. Sci**, v. 91, p. 4984–4990, 2013.

YOUMANS, B. P.; AJAMI, N. J.; JIANG, Z. D.; CAMPBELL, F.; WADSWORTH, W. D.; PETROSINO, J. F.; HIGHLANDER, S. K. Characterization of the human gut microbiome during travelers' diarrhea. **Gut microbes**, v. 6, n. 2, p. 110-119, 2015.

**CAPÍTULO 3 - INFLUÊNCIA DO USO PRECOCE DE ANTIMICROBIANO NO
PERFIL INFLAMATÓRIO DE BEZERRAS HOLANDESAS NO
PRIMEIRO MÊS DE VIDA**

13 INTRODUÇÃO

A placenta dos bovinos do tipo sinepteliocorial não permite a transferência de anticorpos maternos para o feto durante a gestação, levando ao nascimento de bezerros hipogamaglobulinêmicos. A proteção conferida ao feto no ambiente uterino estéril, não permite que ocorra estímulo antigênico externo neste período, desta forma os fetos não tem chances de desenvolver uma resposta imune adaptativa. Ao nascer são expostos a numerosos microorganismos e para sobreviver o animal recém-nascido terá que ser capaz de controlar a invasão microbiana (CHASE et al., 2008; MEGANCK et al., 2014; MEGANCK, 2015).

Bezerros recém-nascidos apresentam sistema imune deficiente, a formação e maturação dos seus componentes irão completar-se mais tardiamente. Além disso, ao nascimento os bezerros estão sobre o efeito do cortisol em decorrência do estresse materno-fetal que ocorre no momento do parto e possui impacto no status imune dos recém-nascidos. Os corticosteróides têm um efeito supressivo na resposta imune inata dos bezerros, levando a diminuição na fagocitose e na atividade bactericida dos neutrófilos e macrófagos (BARRINGTON; PARISH, 2001; CHASE et al., 2008; CORTESE, 2009).

Esses fatores tornam os bezerros vulneráveis a infecções principalmente no primeiro mês de vida. A diarreia neonatal é responsável pela maior parte da morbidade e mortalidade em bezerros, contabilizando > 50% do total de óbitos (GOMEZ et al., 2017). Muitos agentes podem estar associados aos casos de diarreia, de acordo com Meganck et al. (2014), Mawly et al. (2015) e Megank et al. (2015) os principais são: *Escherichia coli* enterotoxigênica, rotavírus, coronavírus e *Cryptosporidium parvum*. Diante de tantos desafios os bezerros precisam ser capazes de controlar a invasão microbiana e responder rapidamente aos estímulos.

Durante o processo de colonização intestinal os componentes bacterianos têm a importante função de modular as respostas imunes inatas (SATOKARI et al., 2009). A colonização intestinal após o parto e a exposição a bactérias intestinais são considerados um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento imunológico intestinal. Além disso, bactérias simbióticas que se estabelecem no intestino logo após o nascimento como as bifidobactérias, possuem um efeito imunoestimulador,

sendo importante nos processos iniciais do desenvolvimento do sistema imune (HEINRICHS et al., 2003; SATOKARI et al., 2009; MARTIN et al., 2012; FERNÁNDEZ et al., 2013).

Já é um consenso que a dinâmica da colonização intestinal e populações bacterianas de humanos e animais podem ser alteradas drasticamente com o uso de antimicrobianos (GRONLUND et al., 2000; EDRINGTON et al., 2012; OULTRAM et al., 2015; PEREIRA et al., 2016). Nos últimos anos a metafilaxia, principalmente para doenças do trato respiratório, tem sido utilizada em larga escala em bezerreiros leiteiros e confinamentos com o objetivo de melhorar a sanidade, aumentar o desempenho dos animais e diminuir a mortalidade em animais de alto risco (STANTON et al., 2013; IVES et al., 2015).

Além da ação indireta dos antimicrobianos na resposta imune pelo seu efeito nas populações bacterianas, tem sido relatado que os macrólídeos possuem também um efeito direto na modulação de respostas inflamatórias, pelo seu efeito, supressor na migração de neutrófilos, estímulo oxidativo em fagócitos e produção de várias citocinas pró-inflamatórias. Esses efeitos têm sido associados à capacidade de acúmulo de macrólídeos em leucócitos polimorfonucleares (CULIC; ERAKOVIC; PARNHAM, 2001; ZALEWSKA-KASZUBSKA; GORSKA, 2001).

Desta forma a hipótese desta pesquisa é que o uso precoce de antibióticos pode causar alterações nas populações bacterianas intestinais comensais e simbióticas comprometendo o desenvolvimento do sistema. O objetivo deste estudo foi avaliar o uso metafilático de um macrólido semi-sintético de longa ação (tulatromicina) no desenvolvimento da resposta imune em bezerras Holandesas do nascimento aos 30 dias de vida.

14 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, protocolo nº 2596070715.

14.1 MANEJO E SELEÇÃO DAS BEZERRAS RECÉM-NASCIDAS

Para a escolha da fazenda inicialmente realizamos uma visita em algumas propriedades da região para encontrar a fazenda que melhor se encaixasse nos nossos critérios de inclusão que incluíam o manejo da vaca durante o parto (partos em baias de parição e assistidos), higiene da baia de parição, manejo do colostro (qualidade e quantidade adequada), aleitamento com leite pasteurizado e sem antibióticos, higiene das baias maternidade e bezerreiro, e bezerreiro com gaiolas individuais. As bezerras desta pesquisa eram oriundas de fazenda comercial de alta produção, localizada no município de Descalvado – São Paulo. A colheita de amostras foi realizada entre maio e julho de 2016.

Durante este período, a equipe permanecia na fazenda de segunda à quinta-feira para acompanhamento dos partos ocorridos durante o dia, sendo os partos noturnos assistidos pelos colaboradores da fazenda. As vacas que estavam próximas a data prevista do parto ou que apresentavam sinais prodrômicos do parto eram transferidas do piquete pré-parto para baias maternidade com cama de areia onde permaneciam até o momento da parição.

Após o parto, as vacas eram ordenhadas com ordenhadeira mecânica do tipo balde ao pé ainda nas baias de parição. Antes da ordenha os tetos eram limpos com solução clorada e secos com papel toalha individual. Todo o colostro coletado era avaliado quanto a sua qualidade imunológica pela avaliação indireta da concentração de imunoglobulinas do colostro por meio do colostro *balls* e refratômetro Brix.

Para avaliação do colostro através do colostro *balls*¹⁸ as 3 bolas verdes, 1 laranja e 2 vermelhas com diferentes densidades foram adicionadas em um recipiente contendo 2 litros de colostro, em seguida, realizou-se a leitura observando quais bolas flutuaram para a superfície: apenas bolas vermelhas e laranja= indicativo de colostro de má qualidade com densidade igual ou abaixo de 1035; bolas vermelhas, laranja e uma verde= colostro de boa qualidade com densidade de 1045; bolas vermelhas, laranja e duas verdes= colostro de ótima qualidade com densidade de 1060 e bolas vermelhas, laranja e três verdes= colostro de ótima qualidade com densidade de 1075. Somente colostro com densidade igual ou maior que 1045 foi utilizado para a colostragem dos bezerros conforme recomendações do fabricante.

A determinação do índice BRIX foi realizada utilizando-se refratômetro óptico BRIX¹⁹ com escala entre 0 a 32%. Foi adotado o ponto de corte equivalente a 21% para distinguir colostro com baixa ou boa qualidade (>50mg/mL de IgG) como descrito por Quigley et al. (2013).

Logo após o nascimento as bezerras eram separadas das vacas e transferidas para baias de transição, onde era realizada a cura o umbigo e colostragem utilizando mamadeira.

A colostragem das bezerras era realizada logo após seu nascimento o mais rápido possível, sendo a primeira mamada fornecida no máximo após seis horas do nascimento. A segunda alimentação era realizada geralmente com um intervalo de 6 horas da primeira mamada de acordo com a necessidade do bezerro. Era fornecido para as bezerras 10% do peso vivo de colostro preferencialmente fresco, e na ausência deste utilizava-se colostro refrigerado em geladeira (2 a 8°C) ou congelado. O colostro congelado ficava armazenado em sacos plásticos em freezer e quando havia a necessidade de ser utilizado era descongelado lentamente em banho-maria a 37°C.

Após o uso as mamadeiras e bicos eram lavadas com água quente e detergente para retirar toda a gordura, após o enxágue eram colocadas em um recipiente contendo aproximadamente 10 litros de água e 2 colheres de sopa de água sanitária. Antes do uso eram enxaguadas com água.

A cura do umbigo foi realizada logo após o nascimento pela imersão completa do cordão umbilical em recipiente contendo Umbicura (Pec®) por 1 minuto e meio,

¹⁸Ms colostro *balls*, Nutri Support©, 3705010

¹⁹ Modelo 300001; SperScientific, Scottsdale, AZ

repetindo-se o processo após 12 horas. Repetiu-se este processo duas vezes ao dia até a mumificação completa do cordão umbilical que ocorria por volta dos 8 a 10 dias de vida das bezerras.

As bezerras permaneceram nas baias de transição próximas a maternidade por aproximadamente três dias, recebendo apenas o colostro e leite de transição na mamadeira, era oferecido em torno de 3 litros de leite de transição por mamada proveniente de pool de leite de vacas que estavam 1 a 5 dias no pós-parto. Após este período, as bezerras eram transferidas para o bezerreiro onde permaneciam até o desmame. No bezerreiro as bezerras eram mantidas em baias individuais suspensas de metal e madeira com cama de feno e eram alimentadas por meio de balde, duas vezes ao dia, com um total de seis litros de leite proveniente das vacas pós-parto (1 a 5 dias). Era usado sucedâneo²⁰ para completar o volume de leite diário, quando necessário além de ração comercial e água *ad libitum*. Estes produtos não continham antibióticos como promotor de crescimento. Era realizada a mochação de todas as bezerras do experimento entre 4 e 6 dias de vida utilizando pasta cáustica.

14.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram selecionadas vinte e seis bezerras híidas após triagem e estas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos compostos por 13 animais: Grupo 1- receberam uma dose do antibiótico tulatromicina (2,5 mg/Kg) por via subcutânea até doze horas após o nascimento (ATB+); Grupo 2- receberam uma dose de solução fisiológica por via subcutânea até doze horas após o nascimento (ATB-).

²⁰Natimilk, Auster®

14.3 HISTÓRICO CLÍNICO

No capítulo 1 desta dissertação está descrito detalhadamente o histórico clínico do grupo ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida. As alterações umbilicais foram detectadas nos bezerros já no D3-5 e persistiram até o D13-15, o grupo ATB- apresentou mais alterações relacionadas à região umbilical e mucosas esbranquiçadas relacionadas à anemia do processo inflamatório crônico. Durante todo o período experimental foram detectadas treze bezerras com broncopneumonia, sendo oito do grupo ATB- e cinco do grupo ATB+.

A diarreia foi à condição de doença mais frequente observada durante o período neonatal, observando-se frequências semelhantes entre os grupos experimentais, porém observamos que os animais do grupo ATB+ apresentaram maior gravidade dos casos de diarreia, com menores valores de matéria seca. O pico máximo de diarreia foi detectado em ambos os grupos no D13-15, a frequência de diarreia diminuiu abruptamente no D20-23 com leve aumento no D27-30. A alta prevalência de diarreia no D13-15 culminou na redução significativa do ganho de peso neste momento. O principal agente etiológico detectado nas fezes dos animais apresentando diarreia foi o *Cryptosporidium*, observou-se também a presença de rotavírus nas fezes de alguns animais.

14.4 MOMENTOS DE AVALIAÇÃO

As avaliações e colheitas das amostras de sangue e fezes foram realizadas nos seguintes momentos: até doze horas após o nascimento ($\leq 12h$); 3-5º dia de vida (D3-5); 7-9º dia de vida (D7-9); 13º-15º dia de vida (D13-15); 20-23º dia de vida (D20-23); e 27-30º dias pós-nascimento (D27-30).

14.5 COLHEITA, PREPARO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de sangue das bezerras por meio de punção da veia jugular externa, utilizando sistema a vácuo, em tubos sem anticoagulante (10mL) e com anticoagulante EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) (5mL). Todas as amostras foram mantidas refrigeradas (18°C) até o processamento no laboratório.

Após a chegada ao laboratório foi realizado o esfregaço sanguíneo e hemograma por metodologia automática. Um tubo de sangue total com EDTA foi mantido refrigerado a 4°C para posterior realização da imunofenotipagem e outro tubo de sangue total com EDTA foi armazenado por no máximo doze horas em isopor com gelo em temperatura de aproximadamente 18°C para análise da produção das espécies reativas de oxigênio (ERO's).

Para obter uma temperatura adequada de armazenamento do sangue para as amostras destinadas a mensuração da produção de espécies reativas de oxigênio e determinar se haveriam mudanças significativas na viabilidade e função celular realizamos um piloto, onde coletamos 3 amostras de sangue de cinco animais. As amostras foram distribuídas em três grupos. Grupo 1 – amostras processadas até 30 minutos após a coleta, grupo 2 - amostras armazenadas refrigeradas em geladeira (aproximadamente 4°C), grupo 3 - amostras armazenadas em isopor com temperatura de aproximadamente 18°C. Os resultados estão apresentados no apêndice A.

Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 1057 x g durante 10 minutos para separação do soro. Após este processo o soro foi aliquotado em microtubos e armazenados em freezer a -40°C para posterior determinação da haptoglobina e ferro.

14.6 ANÁLISES LABORATORIAIS

14.6.1 Hemograma

Os componentes hematológicos (hemácias - He, hemoglobina - Hb, hematócrito - Hto, Volume Corpuscular Médio - VCM, Hemoglobina Corpuscular Média - HCM, Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média - HCM e leucócitos totais - Leu foram obtidos por sistema automático²¹.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por metodologia manual observando-se as características morfológicas das células a partir dos esfregaços sanguíneos por microscopia óptica no aumento de 1.000x.

14.6.2 Eletroforese das proteínas séricas

Para análise das frações protéicas do soro sanguíneo, utilizou-se a técnica de eletroforese em fitas de acetato de celulose. Para isso, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e na eventualidade de soro sanguíneo lipêmico, realizou-se centrifugação a 1057 x g por 5 minutos a 25°C.

Para o preparo das fitas, realizou-se a hidratação em solução tampão Tris-veronal por 10 minutos, secagem por meio de papel filtro e aplicação das amostras em cada fita, colocando-as na cuba, ligada ao aparelho BioSystems²², composta com a mesma solução tampão, havendo a corrida das proteínas por 35 minutos. Após este tempo, as fitas foram retiradas do aparelho e colocadas em meio com corante Ponceau S, permanecendo por 15 minutos. Em seguida, realizou-se a lavagem das fitas para retirada do corante (permanecendo apenas as proteínas coradas). Utilizou-se, para tanto, água destilada e ácido acético 5%, seguindo a seguinte ordem: 1º água destilada, 2º ácido acético 5%, 3º água destilada, 4º ácido acético, 5º água destilada. Após a retirada da água destilada, as fitas receberam

²¹BC 2800Vet®

²²BTS-100 – Eletrophoresispowersupply

uma solução de ácido acético 100% com metanol (16 mL de ácido acético para 84 mL de metanol), na qual permaneceram por 3 minutos, sendo colocadas então em uma placa de vidro e permanecendo na estufa a 60°C por 7 minutos, indo para a capela logo após, onde secavam por 24 horas. As fitas de acetato de celulose foram analisadas posteriormente no computador.

14.6.3 Haptoglobina

A concentração da haptoglobina sérica foi feita em quadruplicada. Foi avaliada a sua capacidade de ligação às moléculas de meta-hemoglobina. Foi utilizada a técnica de Jones & Mould (1984) adaptada por Bastos et al. (2013). Para tanto, foi utilizado um soro controle com concentração conhecida de haptoglobina (59 mg/dL), sendo a curva padrão preparada em diluição seriada (1:20 a 1:1280, partindo do volume inicial de 20 µL). As amostras de soro (10 µL) foram diluídas em 90 µL de solução fisiológica, sendo adicionados posteriormente 50 µL de solução de meta-hemoglobina bovina (30 mg/dL). A placa foi mantida em temperatura ambiente e protegida da luz durante 10 minutos, onde foram adicionados 150 µL do substrato guaiacol e 50 µL de peróxido de hidrogênio a 0,02 molar, aguardando-se novamente dez minutos para a reação. A determinação da concentração da haptoglobina sérica foi calculada por regressão linear, após leitura espectrofotométrica da absorbância em leitor de microplacas e comprimento de onda de 450 nm (Figura 30).

Figura 30 - Placa de 96 poços demonstrando as reações obtidas na prova da haptoglobina - São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: As duas primeiras colunas se referem a diluição seriada com soro padrão (59mg/dL), sendo os demais poços preenchidos pelos soros em quadruplicatas. A cada teste é realizado o branco da amostra. As bezerras positivas apresentam uma maior turbidimetria como pode ser observado na linha D colunas 3, 5, 7 e 9.

14.6.4 Ferro

Alíquotas de soro foram descongeladas em geladeira (overnight), homogeneizadas em homogeneizador automático para posterior realização do teste em analisador bioquímico automático²³. Para a dosagem da concentração de ferro foi utilizado kit comercial²⁴ empregando-se a metodologia descrita pelo fabricante.

14.6.5 Imunofenotipagem

As subpopulações de granulócitos CH138 expressando o marcador CD62L foram determinadas pela técnica de citometria de fluxo.

O fenótipo dos leucócitos foi avaliado utilizando anticorpos monoclonais bovinos específicos para receptores de superfície celular associados à diferenciação

²³ Modelo Daytona, RandoxLaboratoriesLtd., Co. Antrium, UK

²⁴ Ferro UIBC, Randox®, nº cat. 357599

e função celular inata. As concentrações de anticorpos foram padronizadas utilizando uma série de diluições, sendo que a maior diluição que apresenta uma boa intensidade do sinal de saturação (pico) foi utilizada para cada anticorpo (1:400 para CH138 e CD62-L e 1:200 para PE e APC). Os anticorpos monoclonais de ratos utilizados foram CH138 (um isotipo IgM para identificação de neutrófilos - número do catálogo CH138A) e CD62L (um isotipo IgG1 para identificação da L-selectina número do catálogo CC32).

Primeiramente foram transferidos 100 µL de sangue total de cada bezerro obtido em tubos com EDTA para tubos de citometria de fluxo²⁵ (12 x 75 mm de poliestireno), para cada teste de coloração. A lise dos eritrócitos foi realizada com a adição de 900 µL de solução comercial²⁶ (*Facslysing*) de acordo com a recomendação do fabricante. As amostras foram centrifugadas a 4°C, 290 x g durante 8 min, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” de leucócitos foi ressuspensionado em 1 mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Anexo A) e lavadas duas vezes por centrifugação como descrito acima. Após a última lavagem as células foram co-incubadas com 100 µL de cada anticorpo monoclonal primário *mouse anti-bovine* (Washington State University) por 30 min a 4°C para a marcação celular. As células foram lavadas três vezes com PBS como já descrito acima. Em seguida as amostras foram incubadas com 100 µL de anticorpo secundário específico de isotipo conjugado durante 30 min a 4°C no escuro. O anticorpo de detecção específico IgM foi conjugado com APC²⁷ (Allophycocyanin) e o anticorpo de detecção específico de IgG1 foi conjugado com rPE²⁸ (Phycoerythrin). Finalmente, as células foram lavadas duas vezes como descrito acima, e ressuspensionadas em 300 µL de PBS estéril frio e reservadas para avaliação das fluorescências emitidas nos comprimentos de onda 650-660 nm (APC) e 480 nm (PE) em citômetro de fluxo.

Para minimizar as reações cruzadas de cores entre os pares de anticorpos de detecção foram utilizadas configurações de compensação com o uso de amostras coradas com saturação de cor única CH138 e CD62L. A compensação foi definida em FL4 contra FL2 para CH138 e em FL2 contra FL4 para CD62L.

²⁵Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA

²⁶ BD Biosciences, San Jose, CA, EUA, nº cat. 349202

²⁷Invitrogen®, U.S.A.

²⁸Bencton Dickinson, U.S.A.

As amostras foram analisadas usando o citômetro FACS Calibur^{®29}. Os eventos foram adquiridos no citômetro utilizando o software CellQuest³⁰, a dispersão da luz foi estabelecida para permitir a inclusão das células de interesse com base em tamanho – *forward scatter* (FSC) e granulosidade – *side scatter* (SSC).

O software de análise da Flowjo³¹ versão 7.2.5 foi utilizado para analisar as populações dentro de cada amostra. Pelo menos 10.000 células foram analisadas por amostra. A população de polimorfonucleares foi analisada utilizando o *gate* e confirmada pela expressão de fluorescência específica para células marcadas com CH138. Apesar de não termos utilizado marcadores específicos para diferenciar a população de células mononucleares utilizamos o *gate* considerando o tamanho e granulosidade das células imagina-se que a maior proporção de monócitos e linfócitos grandes (ativados) pertencem a população com maior tamanho e granulosidade que chamamos de mononuclear 1, enquanto a população que chamamos de mononuclear 2 possivelmente apresenta maior proporção de linfócitos.

A análise foi realizada utilizando o *gate* para os granulócitos e mononuclear 2 em todos os momentos do estudo e para a população mononuclear 1 do D3-5 ao D27-30, devido a baixa quantidade de monócitos em bezerros logo após o nascimento. A população de polimorfonucleares foi analisada para a expressão de fluorescência específica para células marcadas com CH138 e CD62L, enquanto as células mononucleares foram analisadas para a expressão de fluorescência específica para células marcadas apenas com CD62L (Figuras 31 a 36).

²⁹Becton Dickinson Immunocytometry Systems[®], San Jose, Calif., USA

³⁰Becton Dickinson Immunocytometry Systems[®]

³¹Treestar Inc., San Carlos, EUA

Figura 31 – Distribuição das populações de leucócitos sanguíneos de acordo com o seu tamanho (FSC- FowardScatter) e granulosidade (SSC- SideScatter) – São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C. C., 2016).

Legenda: (a) Distribuição dos leucócitos sanguíneos; (b) seleção da população de granulócitos; (c) seleção da população mononuclear 1; (d) seleção da população mononuclear 2.

Figura 32 – Compensação das fluorescências FL2 vs. FL4 utilizando-se o anticorpo monoclonal *mouse anti-bovine* CH138 – São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C. C., 2016).

Figura 33 - Compensação das fluorescências FL2 vs. FL4 utilizando-se o anticorpo monoclonal *mouse anti-bovine* CD62L – São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C. C., 2016).

Figura 34- Ensaio para a determinação da proporção de granulócitos CH138⁺ expressando o receptor CD62L⁺ – São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C. C., 2016).

Legenda: (a) histograma demonstrando a população de granulócitos positiva para o marcador CH138 (FL4⁺); (b) histograma demonstrando a população de granulócitos CH138⁺ expressando o receptor CD62L⁺ (FL2⁺); (c) plotagem dos granulócitos expressando os marcadores CD62L⁺CH138⁺ no quadrante duplo positivo (Q2).

Figura 35 – Proporção de células da população mononuclear 1 expressando da L-selectina (CD62L⁺) – São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C. C., 2016).

Legenda: (a) histograma demonstrando a população de células mononucleares 1 CD62L⁺ (FL2⁺); (b) seleção da população de células mononucleares 1 positivas para CD62L⁺ (FL2⁺).

Figura 36 – População células da população mononuclear 2 expressando o receptor L-selectina (CD62L⁺) presente nos linfócitos – São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C. C., 2016).

Legenda: (a) histograma demonstrando a população de células mononucleares 2 CD62L⁺ (FL2⁺); (b) seleção da população de células mononucleares 2 positivas para CD62L⁺ (FL2⁺).

14.6.6 Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's)

A avaliação da função de neutrófilos foi realizada técnica de quimioluminescência. Foram adicionados 3 mL de sangue com EDTA em tubos estéreis, o sangue foi lisado pela adição de 6 mL da solução de lise Tris-cloreto amônia, e posteriormente incubadas durante 30 minutos em estufa a 37°C. Após a incubação, os tubos foram centrifugados em 290 × g por 10 minutos, em seguida, as células foram lavadas em 5 mL de PBS por duas vezes a 290 × g por 5 minutos. Após a última lavagem, o "pellet" de leucócitos celular foi diluído em 1 mL de meio de cultivo celular RPMI1640 sem fenol vermelho³² suplementado com 10% de soro fetal³³ inativado pelo calor e 2 mM L-glutamina sendo posteriormente avaliadas quanto a sua viabilidade pela prova de exclusão de Azul de Tripán (Anexo B) (Figura 37). Posteriormente, foram pipetados 50 µL da suspensão celular mais 450 µL de Azul de Tripán solução uso (1:10). Foram pipetados 10 µL desta mistura na câmara de Neubauer, contando-se o número de células vivas e mortas em um quadrante da

³²Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, catálogo nº cat. 7509

³³Hyclone, Logan, UT, nº cat. G6392

câmara³⁴. Posteriormente, a suspensão celular foi ajustada para 3×10^6 células/mL.

Figura 37 - Avaliação da viabilidade celular pela prova de exclusão de Azul de Trypan - São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: Setas pretas representam leucócitos não corados com Azul de Trypan e considerados vivos; as setas vermelhas mostram leucócitos impregnados com o corante e considerados mortos.

Foram adicionados na coluna 1 e 2 da placa estéril de 96 poços³⁵, em quadruplicatas, 100 μ L de meio de cultivo celular (RPMI-1640 sem fenol vermelho suplementado), nas colunas 3 e 4 foram adicionados 100 μ L da suspensão celular ajustada da primeira amostra, as outras colunas foram sendo preenchidas com as amostras seguintes. Foram adicionados 10 μ L de PMA³⁶ (*Phorbol12-Myristate 13-Acetate*) nas colunas pares, exceto na coluna número dois. Por fim, foram adicionados 10 μ L de DHR-123³⁷ (*Dihydrorhodamine-123*) em todos os poços, exceto na coluna contendo apenas meio de cultivo celular (Quadro 6).

³⁴ Número de células vivas/quadrante x Fator de diluição x fator da Câmara de Neubauer (10^4) x diluição Azul Trypan

³⁵ 96-well flat bottomplate, Corning® Costar®, nº cat. 3585

³⁶ P8139, Merck Millipore, Darmstadt, Germany, Sigma®

³⁷ R22420, Molecular Probes®

Quadro 6 – Layout da placa usada para a realização dos ensaios para a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) pelos fagócitos do sangue - São Paulo - 2016

	1	2	3	4	5 - 12
A	Meio	Meio + DHR123	Célula1 + DHR123	Célula1 + PMA + DHR123	-
B	Meio	Meio + DHR123	Célula1 + DHR123	Célula1 + PMA + DHR123	-
C	Meio	Meio + DHR123	Célula1 + DHR123	Célula1 + PMA + DHR123	-
D	Meio	Meio + DHR123	Célula1 + DHR123	Célula1 + PMA + DHR123	-
E	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: Meio: 100µL de RPMI-1640 sem fenol vermelho suplementado; Meio + DHR123: 100µL de RPMI-1640 sem fenol vermelho suplementado + 10µL de DHR-123 (*Dihydrorhodamine-123*); Célula + DHR123: 100µL de suspensão celular + 10µL de DHR-123 (*Dihydrorhodamine-123*); Célula + PMA + DHR123: 100µL de suspensão celular + 10µL de DHR-123 (*Dihydrorhodamine-123*) + 10µL de PMA (*Phorbol Myristate Acetate*).

As placas foram mantidas em estufa de CO₂³⁸ por 2 horas a 37°C e posteriormente avaliadas quanto a emissão da fluorescência em aparelho de quimioluminescência³⁹ no Laboratório de Farmacologia dos Peptídeos Intracelulares do Instituto de Ciências Biomédicas I.

14.7 ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS 19.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

As variáveis que apresentaram valores quantitativos foram avaliadas quanto à distribuição em relação à curva gaussiana pelo teste de Shapiro-Wilk. Alguns dados não apresentaram distribuição normal e foram submetidos a uma transformação por log₁₀, raiz quadrada ou inversa para verificar a possibilidade de realizar uma análise paramétrica.

Os dados paramétricos estão representados pelas medidas de média e desvio padrão e foi utilizado o teste *T* de *Student* para amostras independentes na

³⁸Sanyo CO₂ Incubator; Sanyo, Osaka, Japan

³⁹*SpectraMax® M5*, Molecular Devices, Sunnyvale, CA USA

comparação dos valores obtidos no grupo ATB- e grupo ATB+ em cada momento. A análise no tempo ($\leq 12h$ ao D27-30) foi avaliada por cálculos de one-way ANOVA para medidas repetidas no tempo dentro do mesmo grupo com teste post hoc de Tukey. No caso onde ocorreram as transformações, o p apresentado nas tabelas diz respeito aos testes relacionados com os valores transformados, enquanto os valores descritos são reais. As variáveis não paramétricas foram representadas pela mediana, intervalo quartiliano, valores mínimos e máximos, a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney.

Os dados qualitativos (escores e presença de doenças) foram apresentados em valores absolutos e frequências e a comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se o teste de Qui-quadrado.

As análises foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$ (*) e tendência quando p estava entre $>0,05$ e $< 0,1$ (†).

15 RESULTADOS

Este trabalho avaliou a influência da utilização precoce de antibiótico na resposta imune inata de bezerras Holandesas durante o primeiro mês de vida.

15.1 ERITROGRAMA

Os valores médios e desvios padrão para os componentes do eritrograma estão apresentados na tabela 13 e figura 38.

Os valores médios de He foram semelhantes entre os grupos ATB- e ATB+ ($P \geq 0,236$), de acordo com o teste *T* de *Student*. A análise no tempo detectou tendência para diminuição no número de hemácias das 12 após o nascimento ao D7-9, observando-se aumento gradual nos momentos subsequentes apenas nas bezerras ATB- ($P=0,070$). Oscilações semelhantes foram observadas no grupo ATB+, porém sem diferenças detectáveis ($P=0,222$).

Os valores médios de Hb foram semelhantes entre os grupos ATB- e ATB+, exceto no D3-5, onde observou-se uma tendência no teste *T* de *Student* para maiores valores no sangue das bezerras que receberam uma dose tulatromicina ao nascimento ($P=0,071$). O perfil no tempo revelou diminuição gradual dos teores de Hb nos grupos ATB+ ($P=0,005$) e ATB- ($P=0,011$).

Os valores médios de Hto foram semelhantes entre os grupos ATB- e ATB+ ($P \geq 0,359$), segundo o teste *T* de *Student*. A análise no tempo revelou queda gradual dos valores no 1º mês de vida no grupo ATB+ ($P=0,001$) e ATB- ($P=0,001$).

Não foi possível observar diferenças na comparação entre os grupos para os índices hematimétricos, exceto para maiores valores de CHCM no ATB+ em relação ao ATB- no D3-5 ($P=0,057$). A análise no tempo demonstrou diminuição progressiva dos valores médios do VCM e HCM em ambos os grupos no 1º mês de vida. Os valores médios do CHCM também apresentaram variações no tempo detectadas pela ANOVA no grupo ATB+ ($P=0,001$) e ATB- ($P=0,000$), observando-se aumento gradual nos valores das 12 após o nascimento até o D27-30 em ambos os grupos experimentais.

Tabela 13 - Valores médios e desvios-padrão para as variáveis hemácias (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Hto), volume corpuscular médio (VCM) (fl), para hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL) em bezerras ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

Parâmetros	Grupos	≤12h	D3-5	D7-9	D13-15	D20-23	D27-30	P
He (x10 ⁶ /μL)	ATB -	6,8±1,1	6,1±1,8	6,0±1,1	6,2±0,9	6,8±0,9	6,7±0,9	0,070 [†]
	ATB +	7,2±1,3	6,4±1,2	6,3±1,2	6,7±1,1	6,7±1,0	7,0±0,8	0,222
	P	0,590	0,307	0,367	0,236	0,852	0,431	
Hb (g/dL)	ATB -	10,0±1,5 ^a	8,1±2,3 ^{ab}	8,4±1,7 ^{ab}	7,8±1,9 ^b	7,67±1,5 ^b	7,6±1,5 ^b	0,011 [*]
	ATB +	10,4±1,9 ^a	9,4±2,3 ^{ab}	8,9±2,0 ^{ab}	8,4±2,1 ^b	8,1±1,8 ^b	8,0±1,5 ^b	0,005 [*]
	P	0,469	0,071 [†]	0,394	0,293	0,393	0,540	
Hto (%)	ATB -	31,8±4,9 ^a	26,7±9,2 ^{ab}	25,1±5,4 ^{ab}	23,3±5,3 ^b	22,9±4,4 ^b	22,3±4,8 ^b	0,001 [*]
	ATB +	32,6±6,0 ^a	27,7±6,5 ^{ab}	26,6±6,1 ^{ab}	25,3±6,3 ^b	24,1±5,5 ^b	23,2±4,6 ^b	0,001 [*]
	P	0,660	0,384	0,473	0,359	0,542	0,567	
VCM (fl)	ATB -	47,0±5,2 ^a	43,5±4,8 ^{ab}	42,1±2,6 ^b	37,4±4,1 ^c	33,8±3,1 ^c	32,9±3,5 ^c	0,000 [*]
	ATB +	45,7±3,0 ^a	43,0±2,7 ^{ab}	41,8±1,9 ^b	37,5±3,9 ^c	35,6±3,0 ^{cd}	32,9±3,6 ^d	0,000 [*]
	P	0,452	0,759	0,786	0,985	0,143	0,986	
HCM (pg)	ATB -	14,8±1,4 ^a	14,3±1,7 ^a	14,1±0,7 ^a	12,3±1,7 ^b	11,2±1,2 ^b	11,1±1,1 ^b	0,000 [*]
	ATB +	14,6±1,2 ^a	14,5±1,0 ^a	14,1±0,7 ^a	12,5±1,6 ^b	11,9±0,9 ^{bc}	11,1±1,1 ^c	0,000 [*]
	P	0,741	0,743	0,906	0,758	0,088 [†]	0,962	
CHCM (g/dL)	ATB -	31,5±1,1 ^a	32,8±1,3 ^{ab}	33,5±0,8 ^b	32,8±1,2 ^{ab}	33,3±1,3 ^b	33,9±1,1 ^b	0,000 [*]
	ATB +	32,0±2,0 ^a	33,7±1,1 ^b	33,8±0,9 ^b	33,4±1,2 ^{ab}	33,7±1,0 ^b	34,0±0,6 ^b	0,001 [*]
	P	0,496	0,057 [†]	0,523	0,260	0,430	0,877	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos (p<0,05), † Indica tendência entre os grupos (p>0,05 e < 0,1) pelo teste T de *student* ou diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA. Letras minúsculas na mesma linha demonstram diferença entre os momentos dentro de cada grupo pelo teste de Tukey.

Figura 38 - Valores médios para hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume corpuscular médio (VCM) (fl), para hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL) em bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de student.

As frequências de anemias e as suas classificações morfo-tintórias nos grupos ATB+ e ATB- estão apresentadas na tabela 14 e figura 39. A avaliação individual dos eritogramas nos diferentes momentos foi realizada para a detecção das anemias, de acordo com os valores de referência estabelecidos por Brun-Hansen; Kampen; Lund (2006). A frequência de anemias foi maior no grupo ATB- (61,5%) que o ATB+ (15,4%) no D3-5 ($P=0,016$).

O tipo de anemia apresentada pelos animais do experimento variou entre os momentos e entre os grupos. Até as 12 após o nascimento foi possível observar apenas uma bezerra de cada grupo apresentando anemia normocítica normocrômica, entretanto no D3-5 observou-se maior frequência de anemias predominantemente normocítica normocrômica (38,5%) e normocítica hipocrômica (23,1%) no ATB- em relação ao grupo ATB+ que apresentou apenas animais com anemia normocítica normocrômica (15,4%) ($P=0,038$). Nos momentos entre D7-9 ao D20-23, as bezerras de ambos os grupos apresentaram frequências de anemias semelhantes ($P\geq 0,185$). No D27-30, observou-se frequências de anemias semelhantes, porém com diferentes perfis morfo-tintoriais, no qual as bezerras anêmicas do ATB- e ATB+ apresentaram microcítica normocrômica (23,1%) e microcítica hipocrômica (23,1%), respectivamente ($P=0,050$).

Tabela 14 – Valores relativos (absolutos) da interpretação individual dos eritogramas de bezerras Holandesas recém-nascidas ATB- e ATB+, de acordo com os valores estabelecidos para bezerras por faixa etária por BRUN-HANSEN; KAMPEN; LUND (2006) - São Paulo – 2016

Anemia	≤12h		D3-5		D7-9		D13-15		D20-23		D27-30	
	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +
Ausente	92,3% (12/13)	92,3% (12/13)	38,5% (5/13)	84,6% (11/13)	53,8% (7/13)	76,9% (10/13)	61,5% (8/13)	61,5% (8/13)	69,2% (9/13)	84,6% (11/13)	76,9% (10/13)	76,9% (10/13)
Presente	7,7% (1/13)	7,7% (1/13)	61,5% (8/13)	15,4% (2/13)	46,2% (6/13)	23,1% (3/13)	38,5% (5/13)	38,5% (5/13)	30,8% (4/13)	15,4% (2/13)	23,1% (3/13)	23,1% (3/13)
P	1,000		0,016*		0,216		1,000		0,352		1,000	
Classificação das anemia	≤12h		D3-5		D7-9		D13-15		D20-23		D27-30	
	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +	ATB -	ATB +
Normocítica normocrômica	7,7% (1/13)	7,7% (1/13)	38,5% (5/13)	15,4% (2/13)	7,7% (1/13)	7,7% (1/13)	7,7% (1/13)	15,4% (2/13)	0,0% (0/13)	7,7% (1/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)
Normocítica hipocrômica	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	23,1% (3/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	15,4% (2/13)	7,7% (1/13)	0,0% (0/13)	7,7% (1/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)
Macroscítica normocrômica	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	38,5% (5/13)	15,4% (2/13)	0,0% (0/13)	7,7% (1/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)
Microscítica normocrômica	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	15,4% (2/13)	0,0% (0/13)	23,1% (3/13)	0,0% (0/13)
Microscítica hipocrômica	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	15,4% (2/13)	7,7% (1/13)	15,4% (2/13)	0,0% (0/13)	0,0% (0/13)	23,1% (3/13)
P	1,000		0,038*		0,404		0,736		0,185		0,050*	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste de Qui-quadrado.

Figura 39 – Frequência de bezerras Holandesas anêmicas dos grupos ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento. * diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste de Qui-quadrado.

15.2 FERRO

Os valores médios e desvio padrão da concentração de ferro sérico para bezerras ATB- e ATB+ estão dispostos na tabela 15 e figura 40.

As concentrações médias de ferro apresentaram tendência para maiores valores no ATB + em relação ao ATB- no D3-5 ($P=0,051$). A análise no tempo pela ANOVA e post hoc Tukey demonstrou variações semelhantes entre os grupos no tempo. Observou-se pico máximo de ferro para ambos os grupos até as 12 horas após o nascimento (ATB- = $14,43 \pm 8,82 \mu\text{M/L}$ e ATB+ = $15,06 \pm 8,88 \mu\text{M/L}$), observando-se diminuição gradual dos valores até o D27-30 (ATB- = $3,9 \pm 2,01 \mu\text{M/L}$, $P=0,000$; ATB+ = $3,95 \pm 2,52 \mu\text{M/L}$, $P=0,000$).

Tabela 15 - Valores médios de ferro ($\mu\text{M/L}$) no soro de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

M(s)	Ferro ($\mu\text{M/L}$)		
	ATB -	ATB +	P
≤12h	$14,43 \pm 8,82^a$	$15,06 \pm 8,88^a$	0,570
D3-5	$5,13 \pm 1,61^{ab}$	$7,68 \pm 3,68^{ab}$	0,051†
D7-9	$4,45 \pm 2,21^b$	$5,07 \pm 3,44^{bc}$	0,735
D13-15	$4,26 \pm 2,93^b$	$6,39 \pm 6,71^{bc}$	0,603
D20-23	$4,46 \pm 3,32^b$	$5,33 \pm 4,83^{bc}$	0,594
D27-30	$3,9 \pm 2,01^b$	$3,95 \pm 2,52^c$	0,781
P	0,000*	0,000*	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student* ou diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA. Letras minúsculas na mesma linha demonstram diferença entre os momentos dentro de cada grupo pelo teste de Tukey.

Figura 40 - Valores médios de ferro ($\mu\text{M/L}$) no soro de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student*.

15.3 LEUCOGRAMA

Os valores médios e desvios padrão dos valores absolutos de leucócitos totais (Leu), neutrófilos (Neu) e linfócitos (Linf) estão apresentados na tabela 16 e figura 41.

Os valores absolutos de leucócitos foram semelhantes entre os grupos experimentais ($P \geq 0,171$). As bezerras ATB- e ATB+ apresentaram pico máximo de leucócitos totais até as 12 horas após o nascimento, observando-se diminuição dos valores nos momentos subsequentes. No D13-15 e D20-23 detectou-se os menores valores médios para os leucócitos nos grupos ATB- e ATB+, respectivamente.

Em relação aos valores relativos (%), pôde-se observar maiores valores de Neu no grupo ATB- até 12 horas após o nascimento ($P = 0,005$) e D7-9 ($P = 0,009$). Ao

contrário, os valores de Linf (%) foram menores no ATB- quando comparados ao ATB+ até 12 horas após o nascimento ($P=0,005$) e D7-9 ($P=0,018$).

Os valores absolutos de Linf ($\times 10^3/\mu\text{L}$) foram semelhantes entre os grupos ATB- e ATB+, entretanto as bezerras ATB- apresentaram maiores valores médios de Neu no D7-9 ($P=0,013$). Foi possível observar também uma tendência no primeiro momento ($\leq 12\text{h}$) para maiores valores de Neu ($P=0,057$) e menores valores de Linf absolutos ($P=0,083$) no grupo ATB- em relação ao ATB+. O grupo ATB+ também apresentava tendência para maiores valores absolutos de linfócitos no D13-15 ($P=0,061$).

A análise no tempo pela ANOVA e post hoc Tukey demonstraram diminuição no número de Leu das $\leq 12\text{h}$ ao D20-23, seguida por aumento no D27-30 ($P=0,023$) apenas no ATB+. O número de Leu no ATB- não apresentaram oscilações ($P=0,257$). O número de neutrófilos e linfócitos absolutos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) mostrou padrão inverso ao longo do tempo, observando-se diminuição dos Neu e aumento dos Linf do primeiro momento ($\leq 12\text{h}$) ao último (D27-30) no ATB- e $\leq 12\text{h}$ ao D20-23 no ATB+. O grupo ATB+ apresentou aumento no número absoluto de Neu do D20-23 ao D27-30.

Tabela 16 - Valores médios e desvios-padrão dos valores de leucócitos totais ($10^3/\mu\text{L}$), valores relativos (%) e absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) de neutrófilos e linfócitos de bezerras ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

Parâmetros	Grupos	≤12h	D3-5	D7-9	D13-15	D20-23	D27-30	P
Leucócitos Totais ($10^3/\mu\text{L}$)	ATB -	9,9±2,9	7,7±2,7	9,4±2,5	7,6±2,5	8,7±3,9	8,2±2,7	0,257
	ATB +	9,0±2,8 ^{ab}	6,3±2,1 ^a	7,9±2,1 ^{ab}	8,9±2,6 ^{ab}	7,1±2,3 ^a	9,3±3,1 ^b	0,023*
	P	0,394	0,300	0,290	0,171	0,331	0,686	
Neutrófilos (%)	ATB -	74,4±6,4 ^a	46,7±18,5 ^b	54,2±16,1 ^b	37,6±12,6 ^b	39,2±13,9 ^b	46,3±15,1 ^b	0,000*
	ATB +	61,4±12,9 ^a	48,2±18,8 ^{ab}	37,3±13,8 ^b	37,3±15,5 ^b	36,5±10,8 ^b	43,1±16,8 ^b	0,000*
	P	0,005*	0,835	0,009*	0,962	0,584	0,622	
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	ATB -	7,5±2,4 ^a	3,9±1,6 ^b	5,2±2,3 ^{ab}	2,7±1,6 ^b	3,7±3,0 ^b	4,1±3,3 ^b	0,000*
	ATB +	5,6±2,6 ^a	3,2±2,1 ^{ab}	3,0±1,3 ^a	3,5±2,0 ^a	2,6±1,1 ^b	4,3±2,6 ^a	0,023*
	P	0,057 [†]	0,159	0,013*	0,313	0,457	0,668	
Linfócitos (%)	ATB -	23,0±7,4 ^a	44,2±14,6 ^b	43,6±16,4 ^b	61,6±13,0 ^c	59,1±12,6 ^{bc}	52,0±14,4 ^{bc}	0,000*
	ATB +	36,5±13,4 ^a	47,6±19,3 ^{ab}	56,2±6,9 ^b	61,2±14,7 ^b	62,1±12,6 ^b	54,5±18,3 ^b	0,000*
	P	0,005*	0,619	0,018*	0,950	0,558	0,702	
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	ATB -	2,4±0,9 ^a	3,3±1,6 ^b	3,7±1,7 ^{ab}	4,2±0,8 ^b	4,7±1,4 ^b	4,0±1,9 ^b	0,007
	ATB +	3,2±1,2 ^{ac}	2,9±1,2 ^a	4,5±1,4 ^{abc}	5,3±1,8 ^{bd}	4,4±1,6 ^{ad}	4,8±1,5 ^{cd}	0,000*
	P	0,083 [†]	0,469	0,360	0,061 [†]	0,582	0,268	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student* ou diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA. Letras minúsculas na mesma linha demonstram diferença entre os momentos dentro de cada grupo pelo teste de Tukey.

Figura 41 - Valores médios dos valores de leucócitos totais ($10^3/\mu\text{L}$), valores relativos (%) e absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) de neutrófilos e linfócitos de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student*.

Os variáveis monócitos, eosinófilos e basófilos apresentaram valores reduzidos nos diferentes momentos avaliados, além disso, não apresentaram distribuição normal (dados não paramétricos). Assim, optou-se pela apresentação descritiva dos dados em mediana e valores mínimos e máximos (Tabela 17).

Não foi possível observar diferença estatística entre os grupos para nenhum dos parâmetros avaliados em nenhum dos momentos do estudo.

Tabela 17 - Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) e relativos (%) das medianas, valores mínimos e máximos das variáveis monócitos, eosinófilos e basófilos no sangue de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

Valores absolutos (10 ³ /μL)													
Variáveis		≤12h		D3-5		D7-9		D13-15		D20-23		D27-30	
		ATB-	ATB+	ATB-	ATB+	ATB-	ATB+	ATB-	ATB+	ATB-	ATB+	ATB-	ATB+
Monócitos	Mediana	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,08	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	0,14	0,15	0,40	0,34	0,30	3,63	0,17	0,27	0,18	0,07	0,15	0,30
	P	0,875		0,762		0,710		0,713		0,266		0,451	
Eosinófilos	Mediana	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	0,62	0,11	0,20	0,13	0,15	0,16	0,23	0,00	0,50	0,12	0,18	0,12
	P	0,875		0,628		0,131		0,133		0,945		0,862	
Basófilos	Mediana	0,12	0,04	0,09	0,14	0,00	0,05	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	0,31	0,42	0,99	0,60	0,23	0,50	0,30	0,41	0,13	0,15	0,15	0,21
	P	0,540		0,623		0,820		0,178		0,225		0,786	
Valores relativos (%)													
Monócitos	Mediana	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,50	0,00
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	1,00	3,00	4,00	5,00	5,00	7,00	3,00	2,00	1,00	1,00	2,00	2,00
	P	0,879		0,764		0,574		0,852		0,337		0,857	
Eosinófilos	Mediana	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	5,00	2,00	2,00	3,00	2,00	2,00	3,00	0,00	10,00	1,00	3,00	1,00
	P	0,353		0,885		0,149		0,133		0,826		0,743	
Basófilos	Mediana	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	3,00	4,00	5,00	7,00	3,00	4,00	4,00	3,00	1,00	2,00	2,00	3,00
	P	0,629		0,268		0,552		0,163		0,211		0,726	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste de Mann-Whitney.

15.4 BIOQUÍMICA E ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS

Os valores médios e desvios padrão da proteína total, albumina, alfa-globulina, beta-globulina e gama-globulina durante o primeiro mês de vida estão dispostas na tabela 18 e figura 42.

Os valores da proteína total apresentaram perfil semelhante nos dois grupos com pico máximo no D3-5 (ATB- $=11,60\pm2,64$; ATB+ $=11,37\pm2,17$ g/dL) e os menores valores até 12 horas após o nascimento (ATB- $=6,01\pm1,43$; ATB+ $=5,52\pm1,13$ g/dL). Não foi possível detectar diferença estatística entre os grupos, no entanto observamos diferenças entre os momentos em ambos os grupos ($P=0,000$).

Com relação a albumina também observamos um perfil semelhante entre os grupos, desta forma não foi possível detectar diferença estatística entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados. Os valores máximos foram observados no D3-5 (ATB- $=2,73\pm0,72$; ATB+ $=2,79\pm0,54$ g/dL) e os menores valores detectados no D13-15 (ATB- $=1,49\pm0,19$; ATB+ $=1,51\pm0,13$ g/dL). A análise no tempo pela ANOVA e post hoc Tukey demonstrou variações entre os momentos em ambos os grupos ($P=0,000$).

A análise no tempo detectou diferenças para os valores de alfa-globulina no grupo ATB+ ($P=0,000$) e ATB- ($P=0,001$). Observou-se pico no D3-5, seguida por queda até o D13-15 e aumento até o D27-30 no ATB-. O grupo ATB+ apresentou aumento do primeiro momento de coleta ($\leq 12h$) ao D3-5, seguido de queda no D7-9 ao D13-15, pico no D20-23 e uma leve diminuição no D27-30. Não foi possível detectar diferença estatística entre os grupos em nenhum dos momentos estudados.

O grupo ATB+ apresentou maiores concentrações séricas ($1,38\pm0,16$ g/dL) de beta-globulina no D13-15 ($P=0,057$) em relação ao ATB- ($1,17\pm0,33$ g/dL). A análise no tempo revelou diferença entre os momentos para os dois grupos ($P=0,000$) com maiores valores médios para a beta-globulina no D3-5 em ambos os grupos (ATB- $=2,32\pm0,41$ g/dL e ATB+ $=2,46\pm0,76$ g/dL) enquanto os menores valores foram observados até 12 horas após o nascimento para o grupo ATB+ ($1,21\pm0,33$ g/dL) e no D13-15 para o grupo ATB- ($1,17\pm0,33$ g/dL).

Com relação a gama-globulina foi possível observar uma tendência ($P=0,069$) no D13-15 com maiores valores nos animais do grupo ATB+ ($2,25\pm0,28$ g/dL) quando comparado ao grupo ATB- ($1,95\pm0,47$ g/dL). A análise no tempo demonstrou

variações entre os momentos em ambos os grupos ($P=0,000$), sendo que os maiores valores foram observados para ambos os grupos no D3-5 (ATB- $=4,71\pm1,35$ g/dL e ATB+ $=4,68\pm1,12$ g/dL) e os menores até 12 horas após o nascimento para o grupo ATB+ ($1,53\pm0,60$ g/dL) e no D27-30 para o grupo ATB- ($1,63\pm0,46$ g/dL).

Tabela 18 - Valores médios e desvios-padrão dos teores séricos de proteína total (g/dL), albumina (g/dL), alfa-globulina (g/dL), beta-globulina (g/dL) e gama-globulina (g/dL) de bezerras ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

Parâmetros	Grupos	≤12h	D3-5	D7-9	D13-15	D20-23	D27-30	P
Proteína Total	ATB -	6,01±1,43 ^a	11,60±2,64 ^b	9,64±2,01 ^b	6,37±0,79 ^a	6,60±0,47 ^a	6,51±0,52 ^a	0,000*
	ATB +	5,52±1,13 ^a	11,37±2,17 ^b	8,41±2,68 ^b	6,44±0,45 ^a	6,59±0,36 ^a	6,70±0,44 ^a	0,000*
	P	0,345	0,811	0,737	0,953	0,963	0,460	
Albumina	ATB -	1,96±0,58 ^{ac}	2,73±0,72 ^b	2,30±0,51 ^{ab}	1,49±0,19 ^c	1,77±0,23 ^{ac}	1,86±0,33 ^{ac}	0,000*
	ATB +	1,94±0,60 ^{ac}	2,79±0,54 ^b	2,12±0,67 ^a	1,51±0,13 ^c	1,70±1,15 ^{ac}	1,96±0,19 ^{ac}	0,000*
	P	0,919	0,816	0,478	0,745	0,359	0,332	
Alfa	ATB -	0,95±0,33 ^a	1,83±0,74 ^b	1,50±0,50 ^{ab}	1,21±0,28 ^{ac}	1,43±0,25 ^{ab}	1,55±0,55 ^{bc}	0,001*
	ATB +	0,77±0,25 ^a	1,44±0,57 ^b	1,31±0,37 ^b	1,27±0,23 ^b	1,57±0,26 ^b	1,51±0,28 ^b	0,000*
	P	0,128	0,141	0,319	0,588	0,163	0,805	
Beta	ATB -	1,27±0,43 ^a	2,32±0,41 ^b	2,04±0,63 ^b	1,17±0,33 ^a	1,44±0,27 ^a	1,47±0,19 ^a	0,000*
	ATB +	1,21±0,33 ^a	2,46±0,76 ^b	1,76±0,60 ^c	1,38±0,16 ^{ac}	1,49±0,20 ^{ac}	1,54±0,20 ^{ac}	0,000*
	P	0,713	0,581	0,273	0,057 [†]	0,603	0,375	
Gama	ATB -	1,83±0,81 ^a	4,71±1,35 ^b	3,80±0,86 ^b	1,95±0,47 ^a	1,86±0,53 ^a	1,63±0,46 ^a	0,000*
	ATB +	1,53±0,60 ^a	4,68±1,12 ^b	3,22±1,30 ^c	2,25±0,28 ^a	1,83±0,42 ^a	1,68±0,22 ^a	0,000*
	P	0,307	0,954	0,233	0,069 [†]	0,892	0,718	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p<0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p>0,05$ e $<0,1$) pelo teste T de *student* ou diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA. Letras minúsculas na mesma linha demonstram diferença entre os momentos dentro de cada grupo pelo teste de Tukey.

Figura 42 - Valores médios e desvios-padrão dos teores séricos de proteína total (g/dL), albumina (g/dL), alfa-globulina (g/dL), beta-globulina (g/dL) e gama-globulina (g/dL) de bezerras ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student*.

15.5 HAPTOGLOBINA

Os valores médios e desvios padrão da haptoglobina sérica durante o primeiro mês de vida estão dispostas na tabela 19 e figura 43.

O grupo ATB+ apresentou maiores concentrações séricas de Hp no D13-15 ($P=0,032$) em relação ao ATB-. A análise no tempo revelou maiores valores médios para a haptoglobina no D27-30 em ambos os grupos (ATB-= $2,5\pm 1,83$ mg/dL e ATB+= $2,87\pm 1,89$ mg/dL).

Tabela 19 - Valores médios e desvios-padrão para os valores de haptoglobina (mg/dL) em bezerras ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo - 2016

M(s)	Haptoglobina (mg/dL)		
	ATB -	ATB +	P
≤12h	1,52±0,15 ^a	1,49±0,22 ^{ac}	0,519
D3-5	1,50±0,42 ^a	1,37±0,23 ^{ac}	0,465
D7-9	1,53±2,2 ^{bc}	0,87±0,37 ^b	0,289
D13-15	0,81±0,23 ^b	1,31±0,96 ^c	0,032*
D20-23	1,53±0,9 ^{ac}	1,54±0,74 ^{ac}	0,580
D27-30	2,5±1,83 ^a	2,87±1,89 ^a	0,504
P	0,000*	0,000*	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p<0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p>0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student* ou diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA. Letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os momentos dentro de cada grupo pelo teste de Tukey.

Figura 43 - Valores médios de haptoglobina (mg/dL) no soro de bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student*.

15.6 SUBPOPULAÇÕES E ATIVAÇÃO DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES E MONONUCLEARES

As proporções de células e marcadores dos polimorfonucleares e mononucleares estão dispostos na tabela 20 e figuras 44 e 45.

Os granulócitos apresentaram pico máximo em ambos os grupos até as 12 horas após o nascimento (ATB-= $75,8 \pm 12,8\%$; ATB+= $74,5 \pm 7,2\%$), o grupo ATB- apresentou pico mínimo no D13-15 ($39,1 \pm 10,7\%$) e posterior aumento até o D27-30 ($41,4 \pm 14,1\%$). Os animais do grupo ATB+ apresentaram redução na proporção de granulócitos até o D20-23 ($37,2 \pm 9,6\%$) onde foram observados os menores valores com posterior aumento no D27-30 ($40,3 \pm 16,4\%$). Foi possível detectar uma tendência entre os grupos no D7-9 ($P=0,059$) (ATB-= $53,1 \pm 9,6\%$; ATB+= $44,0 \pm 9,5\%$) e diferença estatística entre os momentos em ambos os grupos ($P=0,000$).

O perfil apresentado pelos grupos experimentais em relação à proporção de

granulócitos CH138⁺ expressando o receptor CD62L⁺ não apresentou diferença estatística em nenhum dos momentos avaliados. Os animais de ambos os grupos apresentaram perfil semelhante, foram observadas as menores proporções de granulócitos CH138⁺ expressando L-selectina em ambos os grupos no D13-15 (ATB-= 94,2±4,1%; ATB+=94,0±4,7%). A partir deste momento, observou-se aumento gradual das proporções destas células com pico máximo no D27-30 (ATB-= 97,3±2,0%; ATB+=97,6±1,1%) em ambos os grupos. Foi possível observar tendência entre os momentos para o grupo ATB- (P=0,091) e diferença para o grupo ATB+ (P=0,026).

Em relação à fluorescência dos granulócitos expressando o receptor CD62L⁺ observamos os menores valores em ambos os grupos até as 12 horas após o nascimento (ATB-=499,4±253,1; ATB+=553,1±316,6) e o maior valor no D3-5 para o grupo ATB- (1134,1±549,8) e D7-9 para o grupo ATB+ (1253,9±532,6). Observamos diferença estatística entre os grupos no D20-23 (P=0,043) (ATB-=523,6±226,8; ATB+=871,5±398,1) e entre os momentos para o grupo ATB- (P=0,000) e ATB+ (0,004).

Em relação a população mononuclear 1 (monócitos) observamos os menores valores em ambos os grupos no D7-9 (ATB-=8,2±2,6%; ATB+=8,8±2,7%), o grupo ATB- apresentou o maior valor médio no D20-23 (15,2±3,1%), para o grupo ATB+ observamos o maior valor médio no D3-5 (16,2±8,4%). Não foi possível detectar diferença estatística entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados, mas observamos diferenças entre os momentos para o grupo ATB- (P=0,017) e ATB+ (P=0,049).

Observamos que as células mononucleares 1 expressando o receptor CD62L⁺ apresentaram os menores valores para o grupo ATB- no D20-23 (91,1±4,8%) e no D13-15 (89,4±15,0%) para o grupo ATB+, os maiores valores foram observados no D3-5 para ambos os grupos (ATB-=96,7±1,7%; ATB+=97,8±1,0%). Foi possível observar uma tendência entre os grupos (P=0,083) no D7-9 (ATB-=93,1±3,7%; ATB+=95,3±1,7%) e diferença entre os momento (P=0,007) no grupo ATB-.

A maior intensidade de fluorescência dos mononucleares 1 expressando o receptor CD62L⁺ foi observada para o grupo ATB- no D3-5 (1006,6±379,3) e o menor valor no D20-23 (402,5±158,3), para o grupo ATB+ o maior valor médio foi observado no D7-9 (967,7±482,0) e o menor valor no D13-15 (453,1±208,4). Detectamos uma tendência entre os grupos no D20-23 (P=0,089) (ATB-

=402,5±158,3; ATB+=512,9±135,3) e diferença entre os momentos em ambos os grupos (P=0,000).

As células mononucleares 2 (linfócitos) apresentaram perfil semelhante nos dois grupos com pico máximo no D20-23 (ATB-=36,2±12,1%; ATB+=38,2±11,8%), e os menores valores até 12 horas após o nascimento (ATB-=15,6±10,6%; ATB+=19,5±7,8%). Não foi possível detectar diferença estatística entre os grupos em nenhum dos momentos estudados, no entanto observamos diferenças entre os momentos em ambos os grupos (P=0,000).

A proporção de células mononucleares 2 expressando o receptor CD62L⁺ foi menor para o grupo ATB- no primeiro momento de avaliação (82,4±13,4%) com pico máximo no D7-9 (90,4±3,4%), no grupo ATB+ observamos um perfil diferente com maiores valores médios em D3-5 (89,4±8,0%) e posterior queda até o D27-30 (85,27±7,81%). Observar uma tendência entre os grupos (P=0,098) no D3-5 (ATB-=82,7±11,5%; ATB+=89,4±8,0%), os grupos não apresentaram diferença entre os momentos.

Em relação à fluorescência das células mononucleares 2 expressando o receptor CD62L⁺ observamos os menores valores em ambos os grupos no D27-30 (ATB-=238,0±21,0; ATB+=234,5±28,3) e o maior valor no D3-5 para o grupo ATB- (764,3±460,4) e D7-9 para o grupo ATB+ (754,9±383,7). Não detectamos diferença estatística entre os grupos em nenhum dos momentos, mas foi possível observar diferenças entre os momentos em ambos os grupos (P=0,000).

Tabela 20 - Médias e desvios-padrão para as proporções de granulócitos CH138+, células mononuclear 1 (monócitos) e 2 (linfócitos) expressando o receptor CD62-L em bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016

Parâmetros	Grupos	≤12h	D3-5	D7-9	D13-15	D20-23	D27-30	P
Granulócitos (%)	ATB -	75,8±12,8 ^a	47,4±15,3 ^b	53,1±9,6 ^b	39,1±10,7 ^b	40,3±10,3 ^b	41,4±14,1 ^b	0,000*
	ATB +	74,5±7,2 ^a	49,7±18,0 ^b	44,0±9,5 ^b	44,5±13,8 ^b	37,2±9,6 ^b	40,3±16,4 ^b	0,000*
	P	0,901	0,804	0,087 [†]	0,284	0,452	0,881	
CH138+CD62L+ (%)	ATB -	94,7±4,2	95,5±2,7	96,7±1,8	94,2±4,1	97,0±1,2	97,3±2,1	0,091 [†]
	ATB +	95,2±2,5 ^a	95,0±3,4 ^a	97,2±1,9 ^b	94,0±4,7 ^a	96,3±1,2 ^b	97,6±1,1 ^b	0,026*
	P	0,947	0,672	0,490	0,885	0,179	0,736	
CH138+CD62L+ (GeoMean)	ATB -	499,4±253,1 ^a	1134,1±549,8 ^{bc}	1056,2±496,2 ^{bd}	640,7±288,6 ^{ad}	523,6±226,8 ^a	693,0±183,7 ^{acd}	0,000*
	ATB +	553,1±316,6 ^a	1052,7±544,5 ^{ab}	1253,9±532,6 ^b	749,5±356,2 ^a	871,5±398,1 ^a	1087,0±511,9 ^a	0,004*
	P	0,638	0,708	0,340	0,401	0,043*	0,284	
Mononuclear 1 (%)	ATB -	-	14,2±7,4 ^{ab}	8,2±2,6 ^a	13,9±4,0 ^a	15,2±3,1 ^b	14,4±7,5 ^a	0,017*
	ATB +	-	16,2±8,4 ^a	8,8±2,7 ^b	11,5±4,9 ^{ab}	14,0±6,4 ^{ab}	12,5±3,1 ^{ab}	0,049*
	P	-	0,584	0,561	0,172	0,563	0,467	
Mononuclear 1 - CD62L+ (%)	ATB -	-	96,7±1,7 ^a	93,1±3,7 ^{ab}	93,4±3,1 ^{ab}	91,1±4,8 ^b	93,0±2,9 ^{ab}	0,007*
	ATB +	-	97,8±1,0	95,3±1,7	89,4±15,0	91,0±7,2	89,8±10,0	0,254
	P	-	0,126	0,083 [†]	0,360	0,971	0,372	
Mononuclear 1- CD62L+ (GeoMean)	ATB -	-	1006,6±379,3 ^a	809,2±369,5 ^{ac}	439,2±197,3 ^b	402,5±158,3 ^b	448,3±101,1 ^{bc}	0,000*
	ATB +	-	928,4±425,4 ^{ac}	967,7±482,0 ^a	453,1±208,4 ^{bd}	512,9±135,3 ^{cd}	575,0±45,2 ^{ad}	0,000*
	P	-	0,685	0,372	0,863	0,089 [†]	0,207	
Mononuclear 2 (%)	ATB -	15,6±10,6 ^a	24,4±7,8 ^{ab}	24,5±7,5 ^{ab}	36,1±10,0 ^b	36,2±12,1 ^b	28,3±6,3 ^{ab}	0,000*
	ATB +	19,5±7,8 ^a	25,5±13,1 ^{ac}	31,2±6,7 ^{acd}	35,2±12,0 ^{bc}	38,2±11,7 ^{bd}	33,5±10,7 ^{bc}	0,000*
	P	0,857	0,798	0,131	0,833	0,694	0,223	
Mononuclear 2 - CD62L+ (%)	ATB -	82,4±13,4	82,7±11,5	90,4±3,4	87,±6,3	85,8±2,6	88,5±4,4	0,212
	ATB +	86,0±11,0	89,4±8,0	87,0±11,6	87,8±7,3	85,7±6,1	85,3±7,8	0,908
	P	0,633	0,098 [†]	0,328	0,925	0,892	0,281	
Mononuclear 2 - CD62L (GeoMean)	ATB -	312,8±198,4 ^{ac}	764,3±460,4 ^b	559,±231,7 ^{abc}	323,5±161,0 ^c	283,5±137,6 ^c	238,0±21,0 ^c	0,000*
	ATB +	443,5±226,3 ^{ab}	748,7±360,1 ^{ad}	754,9±383,7 ^{ac}	355,5±185,6 ^b	344,3±78,6 ^b	234,5±28,3 ^{bcd}	0,000*
	P	0,131	0,924	0,141	0,642	0,273	0,865	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student* ou diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA. Letras minúsculas na mesma linha demonstram diferença entre os momentos dentro de cada grupo pelo teste de Tukey.

Figura 44 - Proporções degranulócitos CH138+ expressando o receptor CD62-L e médias geométricas da intensidade da fluorescência em bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida - São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student*.

Figura 45 – Proporções de células mononuclear 1 (monócitos) e 2 (linfócitos) expressando o receptor CD62-L e médias geométricas da intensidade da fluorescência em bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student*.

15.7 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO'S)

A produção de espécies reativas de oxigênio foi monitorada pelo uso do mesmo número de células em cada poço. Como resultado, as mudanças relatadas refletem a atividade de uma célula típica em vez de uma medida direta da atividade total em um bezerro. Os valores médios e desvio padrão da produção de ERO's pelos leucócitos das bezerras dos grupos ATB- e ATB+ estão dispostos na tabela 21 e figura 46.

A produção de espécies reativas de oxigênio (AFU) pelos leucócitos sanguíneos não estimulados foi semelhante entre grupos ATB- e ATB+, exceto no D7-9 onde as células das bezerras ATB- apresentaram maior ($470,46 \pm 118,15$ AFU) liberação de ERO's, quando comparadas com o grupo ATB+ ($387,27 \pm 139,67$ AFU) ($P = 0,038$).

A estimulação de leucócitos com o PMA foi usado para determinar a capacidade total dos leucócitos para produzir o ERO's. A produção de ERO's pelas células estimuladas não foi significativamente diferente entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados.

A análise no tempo detectou diferenças para ambos os grupos para a intensidade da fluorescência (AFU) emitida nos ensaios contendo leucócitos sanguíneos estimulados com o PMA no grupo ATB+ ($P = 0,000$) e ATB- ($P = 0,000$). Observou-se pico máximo até 12 horas após o nascimento, seguida por queda no D3-5 e aumento no D7-9 no ATB-. Já o grupo ATB+ apresentou queda do primeiro momento de coleta ($\leq 12h$) ao D7-9, seguido de aumento no D13-15. A partir destes momentos, os valores tornaram-se menores e constantes.

Tabela 21 - Produção de espécies reativas de oxigênio pelos granulócitos mediante liberação espontânea (CEL) ou estimulados (CEL+PMA) em bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016

M(s)	CEL (AFU)			CEL+PMA (AFU)		
	ATB -	ATB +	P	ATB -	ATB +	P
≤12h	634,57±685,56	482±198,03	0,906	3698,01±1215,96 ^a	3702,15±1062,58 ^a	0,993
D3-5	446,85±199,60	588,17±526,95	0,464	2029,80±595,33 ^b	2164,35±1276,13 ^b	0,733
D7-9	470,46±118,15	387,27±139,67	0,038*	2908,69±784,27 ^{ab}	2608,22±633,29 ^b	0,293
D13-15	516,84±344,62	630,57±490,01	0,362	2316,04±865,27 ^b	2794,73±1036,49 ^{at}	0,225
D20-23	594,66±305,71	435,80±134,17	0,134	2439,66±969,28 ^b	2024,06±369,23 ^b	0,161
D27-30	534,98±322,99	530,46±276,29	0,907	2454,21±777,53 ^b	2530,75±887,75 ^b	0,817
P	0,588	0,286		0,000*	0,000*	

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student* ou diferenças entre os momentos pelo teste de one-way ANOVA. Letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferença entre os momentos dentro de cada grupo pelo teste de Tukey.

Figura 46 - Produção de espécies reativas de oxigênio pelos granulócitos mediante liberação espontânea e após estimulação com PMA em bezerras Holandesas ATB- e ATB+ no primeiro mês de vida- São Paulo – 2016

Fonte: (MARTIN, C.C, 2016).

Legenda: ATB+: animais que receberam tulatromicina (2,5 mg/Kg) até doze horas após o nascimento; ATB-: animais que receberam solução fisiológica até doze horas após o nascimento.* Indica diferença entre os grupos ($p < 0,05$), † Indica tendência entre os grupos ($p > 0,05$ e $< 0,1$) pelo teste T de *student*.

16 DISCUSSÃO

Esta pesquisa avaliou a influencia da administração de tulatromicina até 12 horas após o nascimento no desenvolvimento da resposta imune inata em bezerras nos primeiros 28 dias de vida, por meio da análise do hemograma, dosagem de ferro, bioquímica e eletroforese das proteínas séricas, dosagem da haptoglobina, proporção de células polimorfonucleares e mononucleares expressando CD62L e mensuração da produção espontânea e estimulada de espécies reativas de oxigênio.

As bezerras deste estudo foram incluídas até 12 horas após o nascimento, devido à distância entre a FMVZ e fazenda, além da otimização do tempo necessário para a obtenção desses animais. Apesar da distribuição aleatória das bezerras entre os grupos, a maioria das bezerras ATB- (76,9%) foram incluídas neste estudo entre 6 e 12 horas pós-nascimento, enquanto que a adição dos animais do grupo ATB+ ocorreu um pouco mais precoce. Isto culminou em algumas diferenças entre grupos em relação aos parâmetros estudados no 1º momento de avaliação devido à maior adaptação neonatal no grupo ATB-.

Os componentes do eritrograma apresentaram perfil semelhante entre os grupos ao longo do estudo, exceto pelas menores concentrações de hemoglobina e CHCM no D3-5 nas bezerras que não receberam uma dose de tulatromicina ao nascimento. Esses dados são condizentes com os menores teores de ferro e maior frequência de anemia no grupo ATB-, no qual foi observado o predomínio de anemia normocítica normocrômica e normocítica hipocrômica. Estes dados sugerem o efeito do processo inflamatório crônico oriundo das inflamações umbilicais no grupo ATB-.

As diferenças observadas entre os grupos, em relação às variáveis presentes no eritrograma, provavelmente são decorrentes da proteção conferida pelo antimicrobiano administrado entre o nascimento e as primeiras 12 horas de vida. Este protocolo impediu a instalação e proliferação de bactérias nas estruturas umbilicais, culminando em um menor número de animais com inflamações umbilicais no grupo ATB+.

As inflamações umbilicais são causadas principalmente por bactérias que necessitam de ferro para as suas funções vitais como a síntese de DNA e transporte de elétrons, assim o organismo ativa mecanismos que indisponibilizam esse

elemento (CARVALHO et al. 2006). Nas infecções bacterianas observa-se a ativação de células T e monócitos, que culmina com a produção das citocinas INF γ , TNF α , IL1, IL6 e IL10. O IFN γ produzido pelas células T estimula a expressão da proteína transportadora de ferro que promove o influxo desse elemento para o interior do macrófago, além disso, essa citocina inibe a ferroportina responsável pelo transporte do ferro no intestino, diminuindo a sua captação. A IL6 é responsável pela indução da produção hepática de hepcidina que inibe a absorção duodenal e a saída do ferro presente nos macrófagos. A liberação de IL10 promove aumento na expressão do receptor da transferrina na membrana do macrófago, aumentando a ligação do complexo ferro-transferrina. As citocinas IL1, IL6, IL10 e TNF α também estimulam o estoque de ferritina o que retém o ferro nos macrófagos e o INF γ e TNF α inibe a produção de eritropoetina. Todos estes mecanismos resultam na diminuição do ferro circulante, da atividade da eritropoetina, levando o animal a apresentar anemia (WEINSTEIN et al., 2002; WEISS; GOODNOUGH, 2005; CARVALHO et al. 2006; LEMOS et al., 2010).

Em relação aos momentos, observou-se as variações clássicas decorrentes da faixa etária. Os valores de hemoglobina, hematócrito, VCM e HCM diminuíram ao longo do tempo. As hemácias diminuíram até o D7-9, observando-se aumento progressivo a partir desse momento até o final do experimento. A diminuição da maioria dos parâmetros do eritrograma tem sido associada a ingestão de colostro por aumentar significativamente a proteína plasmática total e pressão oncótica, resultando na diluição do sangue total pelo aumento do plasma (NOVO et al., 2015).

Os altos valores de hemoglobina observados logo após o nascimento são compatíveis com a menor concentração de oxigênio na placenta, enquanto os maiores valores do hematócrito são decorrentes da hemoconcentração (NOVO et al., 2015). O decréscimo nos valores de VCM ao longo do tempo parece ocorrer pela substituição das hemácias contendo hemoglobina fetal por hemácias menores (BRUN-HANSEN; KAMPEN; LUND, 2006). Os menores valores de VCM são compensados pela elevação do número de hemácias para manter a concentração de hemoglobina normal, fenômeno observado neste trabalho.

O CHCM foi à única variável do eritrograma que apresentou aumento progressivo até o final do experimento. Brun-Hansen; Kampen; Lund, (2006) também mostraram aumento nos valores de CHCM em bezerros desde o nascimento até a vigésima quinta semana de idade.

A dinâmica dos leucócitos totais refletiu principalmente as variações observadas para os neutrófilos. No D7-9, detectamos maiores valores relativos e absolutos de neutrófilos sanguíneos no ATB-, enquanto as bezerras ATB+ apresentaram maiores valores relativos de linfócitos. Provavelmente estes achados não estão associados aos efeitos imunes do antimicrobiano, pois Czyżewska-Dors et al. (2016) não observaram variações na populações de linfócitos em suínos após a administração de doses terapêuticas de tulatromicina.

No D13-15, o grupo ATB+ continuou com maior número de linfócitos circulantes. Neste momento, detectou-se pico máximo de diarreia para ambos os grupos, porém o grupo ATB+ apresentou menores teores de matéria seca nas fezes e maior número de animais com diarreia. Desta forma o grupo ATB+ apresentou processo inflamatório mais intenso quando desafiado pelos microorganismos causadores da diarreia.

A análise das variáveis ao longo do tempo para os componentes do leucograma revelou diferenças entre grupos. Os leucócitos e neutrófilos apresentaram pico máximo nas primeiras 12 horas de vida observando-se diminuição nos momentos posteriores. O perfil de linfócitos foi oposto aos neutrófilos observando-se aumento com o avançar da idade. Estas variações são classicamente descritas para neonatos devido ao efeito das elevadas concentrações de cortisol observadas nos primeiros dias de vida. O aumento dos neutrófilos ocorre por alterações nas moléculas de migração e adesão tal como L-selectina (CD62-L) e β 2-integrina, aumentando o número dos neutrófilos na circulação com redução no compartimento marginal (HULBERT et al., 2011; ROCHA et al., 2013; HULBERT; MOISA, 2016). No primeiro momento de colheita, os animais apresentaram baixas proporções de células CH138⁺ expressando L-selectina quando comparado com os tempos subsequentes.

Os menores valores de monócitos foram observados até as 12 horas após o nascimento, este achado está de acordo com Brun-Hansen; Kampen e Lund (2006). Os valores referentes à eosinófilos e basófilos permanecerem baixos durante todo o período de estudo.

O perfil apresentado entre os grupos em relação às proteínas de fase aguda foi diferente. A alfa-globulina apresentou pico máximo no D3-5 no grupo ATB- momento onde foi observada maior frequência de infecções umbilicais nesse grupo de bezerras. No D13-14 detectou-se maiores valores de beta-globulina e gama-

globulina no grupo ATB+, coincidindo com as maiores concentrações de haptoglobina e maiores valores de linfócitos. Como já citado anteriormente este grupo apresentou neste momento maior porcentagem de animais com diarreia e menor quantidade de matéria seca nas fezes.

As proteínas de fase aguda são produzidas em resposta ao estímulo bacteriano e podem ser usadas como um indicador quantitativo da infecção, inflamação, lesão tecidual e estresse (MURRATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004). Um alto nível de proteína total no sangue geralmente está associado aos processos inflamatórios, quando ocorre o aumento da síntese de proteínas de fase aguda e a produção de imunoglobulinas (NAGYOVÁ et al., 2015).

As globulinas são um grupo heterogêneo de proteínas, tipicamente classificado como alfa, beta ou gama com base na sua mobilidade eletroforética. A fração de alfa-globulina contém proteínas de fase aguda como a haptoglobulina, ceruloplasmina, α 1- glicoproteína ácida, α 1- antitripsina e amilóide sérico, sendo assim, o aumento nessa fração proteica indica inflamação. A fração beta-globulina inclui também várias proteínas de fase aguda como proteína C-reativa, complemento e ferritina, que se elevam durante a inflamação aguda. Já as proteínas que compõem a fração gama-globulina são principalmente as imunoglobulinas (TRRALL, 2006; NAGYOVÁ et al., 2015; TÓTHOVÁ et al., 2016).

Um trabalho realizado por Pardon et al. (2015) mostrou que animais apresentando diarreia tinham maiores valores de alfa-globulinas e beta-globulinas em comparação a animais que não apresentavam fezes diarreicas. Nagyová et al. (2015) também observaram aumento das globulinas em bezerros apresentando diarreia. Estes resultados concordam com os achados desta pesquisa para o perfil eletroforético observado no grupo ATB+.

A análise ao longo do tempo mostrou perfil semelhante entre a proteína total e frações eletroforéticas do 1º ao 30º dia de vida. Em geral, os menores valores foram observados no 1º momento de avaliação, observando-se pico máximo após a colostragem no D3-5. A partir deste momento, os valores apresentaram queda gradual até D13-15, observando-se teores constantes nos momentos subsequentes.

Ao nascimento, as concentrações de proteínas no soro eram baixas devido às quantidades mínimas de imunoglobulinas, com posterior aumento durante as primeiras 24 horas de vida. Isto reflete a absorção intestinal de proteínas, particularmente IgG, do colostro a permeabilidade intestinal dos bezerros nas

primeiras 24 horas de vida (TÓTHOVÁ et al., 2016). Durante o primeiro mês de vida observou-se decréscimo nos valores de gama-globulina, apresentando baixos valores aos 30 dias de vida. Essas alterações ocorrem devido utilização e distribuição dos anticorpos no organismo e baixa síntese autógena de imunoglobulinas devido à imaturidade do sistema imunológico, não havendo, dessa forma, uma compensação proporcional às rápidas e intensas perdas observadas (FEITOSA et al., 2001; ELKHAIR; HARTMANN, 2014; LISBOA et al., 2016; TÓTHOVÁ et al., 2016).

Apesar da alfa e beta-globilinas estarem mais associadas à inflamação, o aumento após a ingestão do colostro é natural, não sendo necessariamente um sinal de doença. O feto pode sintetizar α 1-fetoproteína e após o nascimento esta é sintetizada pelas células do fígado, com o objetivo de proteger o recém-nascido logo nos períodos iniciais da vida pós-natal, portanto os maiores valores observados de alfa-globulina nos bezerros deste estudo após o nascimento podem refletir o acúmulo de α 1-fetoproteína no soro sanguíneo de animais jovens. O aumento das beta-globulinas após a ingestão de colostro pode ser decorrente da absorção de lactoferrina (TÓTHOVÁ et al., 2016).

Os menores valores de proteína total e albumina foram observados no D13-15. A perda de proteínas nas fezes nos processos de diarreia pode justificar a diminuição das concentrações séricas no pico das diarreias (PARDON et al., 2015). A diarreia leva ao aumento do catabolismo, redução da absorção de proteína e a liberação de proteínas de volta ao intestino culminando na hipoproteïnemia (NAGYOVÁ et al., 2015). Geralmente, a perda de albumina nas enteropatias ocorre de forma simultânea com a resposta imune, resultando em um aumento nos teores séricos de globulinas (TRRALL, 2006).

A haptoglobina é a proteína de fase aguda mais indicada para a mensuração da inflamação em bovinos (MURRATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004). No presente estudo observou-se maiores concentrações de haptoglobina nos animais do grupo ATB+ no D13-15, no qual foi detectada maior frequência e intensidade de diarreias. Rocha et al. (2016) também encontraram maiores concentrações de haptoglobina em bezerros apresentando diarreia por rotavírus.

Hajimohammadi et al. (2013) avaliaram o perfil das proteínas de fase aguda em bezerros de 1 dia a 4 meses de idade com ou sem diarreia. Estes autores observaram que bezerros com manifestações clínicas intensas apresentaram

aumento significativo nas concentrações de haptoglobina em comparação aos animais que apresentaram alterações clínicas sistêmicas ausentes ou moderadas. As concentrações de haptoglobina também foram maiores em bezerras diarreicas com hipertermia em comparação com bezerras diarreicas sem febre. Com base nesta pesquisa pode-se dizer que as bezerras ATB+ apresentaram maior comprometimento sistêmico que aquelas ATB-.

No primeiro momento de colheita, os animais apresentaram baixas proporções de granulócitos CH138⁺ expressando L-selectina quando comparado aos dois tempos subsequentes. Vários autores sugerem que o aumento do cortisol sanguíneo que ocorre naturalmente no processo do parto pode levar a diminuição da expressão de moléculas de migração e adesão tal como L-selectina e β 2-integrina nas superfícies dos neutrófilos (NAGAHATA et al., 2000; HULBERT et al., 2011).

O perfil de granulócitos, assim como as suas subpopulações, expressando ou não o receptor L-selectina foram semelhantes entre grupos e refletiram as variações encontradas para os neutrófilos no leucograma. Observou-se aumento gradativo entre as primeiras 12 horas de vida até D7-9 e queda brusca no momento subsequente (D13-15), que coincidiu com o pico de diarreias. A partir deste momento, as bezerras ATB+ apresentaram maior intensidade da fluorescência para o marcador L-selectina nos granulócitos CH138⁺. A queda dos granulócitos ativados no pico de diarreias pode ser justificada pela migração dessas células para a mucosa intestinal devido às infecções causadas pelo *Cryptosporidium*.

As populações de células mononucleares 1 e 2 apresentaram perfis diferentes entre si, o que indica composições por diferentes tipos celulares. Apesar de não termos utilizado marcadores específicos para diferenciar a população mononuclear 1 e 2, o tamanho e granulosidade das células indicam que a maior proporção de monócitos e linfócitos grandes (ativados) pertencem a população mononuclear 1, enquanto a população mononuclear 2 apresenta maior proporção de linfócitos pequenos e médios.

A população total de células mononucleares da população 1 não foi claramente visualizada na primeira avaliação imunitária das bezerras realizada até 12 horas de vida. Esta população apareceu claramente a partir do D3-5, esse fenômeno é compatível com o número reduzido de monócitos no leucograma das bezerras. Além disso, esta população de mononuclear pode ter aumentado pelo processo de ativação de linfócitos naïve após a exposição aos microrganismos do

ambiente extra-uterino. Os linfócitos ativados são maiores e mais granulosas que as células não ativadas. Reber et al. (2008) reportaram duas populações de linfócitos em bezerras recém-nascidos, sendo denominadas linfócitos e linfócitos ativados. A população de linfócitos ativados observada pelos autores era relativamente baixa ao nascimento e aumentou ligeiramente ao longo das primeiras 4 semanas de vida.

Em relação às populações de mononucleares 1, observou-se queda acentuada na proporção dessas células entre D3-5 e D7-9 em ambos os grupos experimentais, enquanto as células mononucleares 2 apresentaram aumento gradual ao longo do tempo. A maioria das células circulantes pertencentes aos mononucleares 1 e 2 expressavam o marcador de ativação L-selectina, porém a intensidade da fluorescência diminuiu muito entre D3-5 para D7-9 para ambas as populações celulares, indicando que as células com maior potencial de ativação haviam migrado aos tecidos. Este perfil precoce dos mononucleares em momento anterior aos granulócitos CH138 expressando L-selectina pode ser explicada por eventos imunes ocorridos antes da migração dos neutrófilos. Em função do tamanho e granulosidade acredita-se que os monócitos encontram-se na população mononuclear 1. Os monócitos são células especializadas na apresentação de antígenos aos linfócitos Th0, que diferenciam-se em linfócitos Th1 e/ou Th17, responsáveis pela liberação de citocinas que atraem os neutrófilos para o foco inflamatório. Esta dinâmica celular pode ter culminado com o pico de granulócitos expressando L-selectina em momento subsequente (D13-15).

Outro evento ocorrido entre o D3-5 e D7-9 foi a mochação das bezerras, manejo que consiste na retirada e destruição das células queratogênicas impedindo a formação do tecido córneo e seu crescimento, este procedimento era realizado na fazenda utilizando pasta cáustica que causa uma queimadura no local de aplicação e necrose tecidual (STILWELL et al., 2009; BOND et al., 2012). Desta forma os menores valores na proporção de mononuclear 1 e intensidade de fluorescência para as células mononucleares 1 e 2 pode ter sido decorrente do processo inflamatório oriundo da mochação.

As diferenças encontradas para as células mononucleares entre grupos experimentais também são condizentes com o hemograma das bezerras, no qual foi observada maior proporção de linfócitos no D7-9 das bezerras ATB+. As bezerras ATB+ apresentaram maior proporção de células mononucleares 1 ou 2 expressando L-selectina nos momentos D3-5 e D7-9. Após o pico de diarreias (D20-30), a

intensidade da expressão de L-selectina nas células CH138⁺ e população mononuclear 1 foi maior no grupo ATB⁺. O aumento da reatividade das células provenientes das bezerras ATB⁺ após o D20 pode ser justificada pela maior proporção de bactérias do gênero *Escherichia coli*. A *Escherichia coli* é frequentemente associada à diarreia em bezerros, seu potencial patogênico ocorre pela sua capacidade de adesão e invasão as células intestinas e produção de toxinas. No D27-30, detectou-se menores teores de matéria seca e maiores quantidades de infecções por rotavírus nas bezerras ATB⁺ (COSTA et al., 2014; MANZOOR et al., 2015; PICCO et al., 2015; EI-SEEDY et al., 2016).

A segunda hipótese está ligada a dificuldade das bezerras que receberam tulatromicina ao nascimento em controlar a resposta inflamatória intestinal, devido a menor proporção e/ou ativação das células T reguladoras. As células Treg suprimem a resposta inflamatória que ocorre no intestino após a invasão microbiana, porém a ativação dessa população celular está associada a exposições prévias pelas bactérias da microbiota que estimulam o seu desenvolvimento no intestino, tecido linfóide associado à mucosa e linfonodos mesentéricos (KOBOZIEV et al., 2014; KOCK et al., 2016). A tulatromicina administrada até 12 horas após o nascimento teve efeitos significativos na população de *Bifidobacterium* no D3-5 e D7-9 e na população de *Lactobacillus* no D3-5, e provavelmente muitas outras populações de bactérias simbióticas não pesquisadas também sofreram alterações. Um estudo realizado por Arvonen et al. (2015) mostrou que crianças tratadas com antibióticos apresentam disbiose intestinal que leva a menores níveis de expressão de TLR2 e TLR4 e de mediadores anti-inflamatórios como FoxP3 e IL-10 na mucosa intestinal.

A metodologia empregada para a mensuração da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO'S) foi testada e comprovada por Donovan et al. (2007).

As bezerras do grupo ATB⁻ apresentaram maiores valores absolutos e relativos de neutrófilos no D7-9 e maior produção de radicais livres neste momento nas células não estimuladas. Já nos momentos da diarreia a produção espontânea e estimulada de ERO'S foi maior nas bezerras ATB⁺, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas. Os animais desse grupo apresentaram neste momento menores valores de matéria seca nas fezes esses achados são condizentes com os resultados observados na concentração de haptoglobina e eletroforese de proteínas no D13-15 que também estavam maiores neste grupo.

O perfil de produção de espécies reativas de oxigênio induzido por PMA ao longo do tempo foi diferente. Observamos diferença estatística principalmente entre o primeiro momento de coleta e os demais momentos, sendo que a coleta realizada até 12 horas após o nascimento apresentou os maiores valores com acentuado decréscimo no D3-5.

Os neonatos são especialmente predispostos ao estresse oxidativo celular, pois imediatamente após o nascimento, devido à rápida perfusão sanguínea para os tecidos, são expostos a grandes concentrações de oxigênio (FRANK, 1985). Além disso, possuem as defesas antioxidantes do organismo reduzidas, menores concentrações de SOD (superóxido dismutase) nas hemácias e de antioxidantes plasmáticos; sistema imune imaturo que facilita infecções e inflamações e elevada produção de radicais livres tóxicos (SAUGSTAD, 2003). Todas essas condições, somadas a maior atividade metabólica nesta fase, causam aumento na produção de EROS, levando ao quadro de estresse oxidativo (DAVIS; AUTEN, 2010; YIN et al., 2013).

A partir dos dados apresentados para o perfil de ATB- e ATB+ foi possível notar que inicialmente os animais do grupo ATB- apresentaram mais respostas inflamatórias provavelmente em decorrência da falta de proteção contra os agentes infecciosos conferida pela ação do antimicrobiano que dura cerca de 10 dias, culminando em alterações hematológicas decorrentes da anemia do processo inflamatório crônico. No entanto, as bezerras que não receberam tulatromicina imediatamente após o nascimento desenvolveram microbiota intestinal que favoreceu o desenvolvimento da resposta imune de mucosas. Este fato impactou na intensidade e restrição do processo inflamatório às mucosas caracterizado pelos menores valores das proteínas de fase aguda e dinâmica das populações celulares avaliadas pelo leucograma e imunofenotipagem.

17 CONCLUSÃO

Os animais que receberam uma dose metafilática de tulatromicina (2,5 mg/Kg) não desenvolveram anemia do processo inflamatório crônico em decorrência da proteção conferida pelo antibiótico para as infecções umbilicais, enquanto as bezerras que receberam tulatromicina apresentaram maior intensidade de processo inflamatório, o que sugere retardo no desenvolvimento do sistema imune devido a menor quantidade de bactérias simbióticas no intestino.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOTAL, S. M.; SHAMS, G. A.; EDRESS, N. E.; ANWER, A. M.; MOHAMED, G. A. Immunomodulatory Effects of Tulathromycin in Rabbits. **Zagazig Veterinary Journal**, v. 45, n. 1, 2017.
- ARVONEN, M.; VIRTÄ, L. J.; POKKA, T.; KRÖGER, L.; VÄHÄSALO, P. Repeated exposure to antibiotics in infancy: a predisposing factor for juvenile idiopathic arthritis or a sign of this group's greater susceptibility to infections?. **The Journal of rheumatology**, v. 42, n. 3, p. 521-526, 2015.
- BARRINGTON, G. M.; PARISH, S. M. Bovine Neonatal Immunology. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 17, n. 3. p. 463-476, 2001.
- BASTOS, B. L.; LOUREIRO, D.; RAYNAL, J. T.; GUEDES, M. T.; VALE, V. L.; MOURA-COSTA, L. F.; MEYER, R. Association between haptoglobin and IgM levels and the clinical progression of caseous lymphadenitis in sheep. **BMC veterinary research**, v. 9, n. 1, p. 254, 2013.
- BATISTA, C. F.; BLAGITZ, M.G.; BERTAGNON, H. G.; GOMES, R. C.; SANTOS, K. R.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Evolution of phagocytic function in monocytes and neutrophils blood cells of healthy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 8882-8888, 2015.
- BENESI, F. J.; TEIXEIRA, C. M. C.; LEAL, M. L. R.; LISBOA, J. A. N.; MIRANDOLA, R. M. S.; SHECAIRA, C. L.; GOMES, V. Leukograms of healthy Holstein calves within the first month of life. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 352-356, 2012.
- BOND, G. B.; DE ALMEIDA, R.; OSTRENSKY, A.; MOLENTO, C. F. M. Métodos de diagnóstico e pontos críticos de bem-estar de bovinos leiteiros. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1286-1293, 2012.
- BRUN-HANSEN, H. C.; KAMPEN, A. H.; LUND, A. Hematologic values in calves during the first 6 months of life. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, n. 2, p. 182-187, 2006.
- CARVALHO, M. C.; BARACAT, E. C. E.; SGARBIERI, V. C. Anemia ferropriva e anemia de doença crônica: distúrbios do metabolismo de ferro. **Segurança alimentar e nutricional**, v. 13, n. 2, p. 54-63, 2006.
- CHASE, C.C.L.; HURLEY, D.J.; REBER, A.J. Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.24, n.1, p.87–104, 2008.
- CORTESE, V. S. Neonatal immunology. **Veterinary Clinics North America: food animal practice**, v. 25, n.1, p. 221-227, 2009.
- COSTA, K.; FILHO, F. A.; COSTA, J. N.; AMORIM, C. R. N.; YANO, T.; CONCEIÇÃO, R. A. Fatores de virulência das amostras de Escherichia coli isoladas

de bezerros com diarreia na região de Feira de Santana, Bahia. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 4, p. 430-436, 2014.

ČULIĆ, O.; ERAKOVIĆ, V.; PARNHAM, M. J. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. **European journal of pharmacology**, v. 429, n. 1, p. 209-229, 2001.

CZYŻEWSKA-DORS, E.; KWIT, K.; PEJSK, Z.; POMORSKA-MÓL, M. Changes in circulating lymphocyte subpopulations in pigs receiving therapeutic doses of ceftiofur and tulathromycin. **Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 4, p. 481-487, 2016.

DAVIS, J. M.; AUTEN, R. L. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v.15, p.191-195, 2010.

DONOVAN, D. C.; JACKSON, C. A.; COLAHAN, P. T.; NORTON, N. N.; CLAPPER, J. L.; MOORE, J. N.; HURLEY, D. J. Assessment of exercise-induced alterations in neutrophil function in horses. **American journal of veterinary research**, v. 68, n. 11, p. 1198-1204, 2007.

EDRINGTON, T. S.; DOWD, S. E.; FARROW, R. F.; HAGEVOORT, G. R.; CALLAWAY, T. R.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J. Development of colonic microflora as assessed by pyrosequencing in dairy calves fed waste milk. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 8, p. 4519-4525, 2012.

ELKHAIR, N. M.; HARTMANN, H. Influence of Age on Serum Protein Capillary Electrophoretic Pattern in Clinically Healthy Calves with Special Emphasis on Serum Globulins. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Production**, v. 5, n. 2, 2014.

EL-SEEDY, F. R.; ABED, A. H.; YANNI, H. A.; EL-RAHMAN, S. A. Prevalence of Salmonella and E. coli in neonatal diarrheic calves. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 45-51, 2016.

FEITOSA, F. L. F.; BIRGEL, E. H.; MIRANDOLA, R. M. S.; PERRI, S. H. V. Proteinograma sérico de bezerros holandeses do nascimento até um ano de vida. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 8, n. 2, 2001.

FERNÁNDEZ, L.; LANGA, S.; MARTÍN, V.; MALDONADO, A.; JIMÉNEZ, E.; MARTÍN, R.; RODRÍGUEZ, J. M. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 1-10, 2013.

FRANK, L. Effects of oxygen on the newborn. **Fed Proc.** v.44, p. 2328–2334, 1985.

GOMEZ, D. E.; ARROYO, L. G.; COSTA, M. C.; VIEL, L.; WEESE, J. S. Characterization of the Fecal Bacterial Microbiota of Healthy and Diarrheic Dairy Calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 3, p. 928-939, 2017.

GRONLUND, M-M.; ARVILOMMI, H.; KERO, P.; LEHTONEN, O-P.; ISOLAURI, E. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal**, v. 83, p. 186-192, 2000.

HAJIMOHAMMADI, A.; NAZIFI, S.; ANSARI-LARI, M.; KHOSHMANZAR, M. R.; BIGDELI, S. M. Identifying relationships among acute phase proteins (haptoglobin, serum amyloid A, fibrinogen, ceruloplasmin) and clinical findings in dairy calf diarrhea. **Comparative Clinical Pathology**, p. 1-6, 2013.

HEINRICHS, A. J.; JONES, C. M.; HEINRICHS, B. S. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 12, p. 4064-4069, 2003.

HULBERT, L. E.; COBB, C. J.; CARROLL, J. A.; BALLOU, M. A. The effects of early weaning on innate immune responses of Holstein calves. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 5, p. 2545-2556, 2011.

HULBERT, L. E.; MOISÁ, S. J. Stress, immunity, and the management of calves. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 4, p. 3199-3216, 2016.

IVES, S. E.; RICHESON, J. T. Use of antimicrobial metaphylaxis for the control of bovine respiratory disease in high-risk cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 31, n. 3, p. 341-350, 2015.

JONES G.E. & MOULD D.L. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobulins to a microtitration plate system. **Research Veterinary Science**.v.37, p. 87- 92, 1984.

KOBOZIEV, I.; WEBB, C. R.; FURR, W. B. K.; GRISHAM, M. B. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. **Free Radical Biology and Medicine** **G8**, p. 122-133, 2014.

KOCH, M. A.; REINER, G. L.; LUGO, K. A.; KREUK, L. S.; STANBERY, A. G.; ANSALDO, E.; BARTON, G. M. Maternal IgG and IgA antibodies dampen mucosal T helper cell responses in early life. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 827-841, 2016.

LEMOS, A. D. R.; ISMAEL, L. A. S.; BOATO, C. C. M.; BORGES, M. T. F.; RONDÓ, P. H. D. C. A hepcidina como parâmetro bioquímico na avaliação da anemia por deficiência de ferro. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 5, p. 596-599, 2010.

LISBÔA, J. A. N.; STURION, T. T.; DOS ANJOS, M. C.; DA COSTA FLAIBAN, K. K. M. Transferência de imunidade passiva e proteinograma sérico até os 35 dias de vida em bezerros da raça Nelore concebidos naturalmente ou produtos da fecundação in vitro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 01-07, 2016.

MANZOOR, R.; SHAH, M. I.; ASMA-UL-HUSNA, S. A. W.; PANDIT, F.; DAR, P. A.; MIR, M. I. Prevalence, serodiversity and antibiogram of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in diarrhoeic calves and lambs of Kashmir valley (J&K), India. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 7, n. 1, p. 477-481, 2015.

MARTIN, V.; BARRAGÁN, A. M.; MOLES, L.; BANOS, M. R.; CAMPO, R.; FERNANDEZ, L.; RODRIGUEZ, J. M.; JIMENEZ, E. Sharing of bacterial strains

between breast milk and infants feces. **Journal of Human Lactation**, v. 28, n. 1, p. 36-44, 2012.

MAWLY, J.; GRINBERG, A.; PRATTLE, D.; MOFFAT, J.; MARSHALL, J.; FRENCH, N. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. **The Veterinary Journal**, v. 203, n. 2, p. 155-160, 2015.

MEGANCK, V.; HOFLACK, G.; PIEPERS, S.; OPSOMER, G. Evaluation of a protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhoea on dairy herds. **Preventive veterinary medicine**, v. 118, n. 1, p. 64-70, 2015.

MEGANCK, V.; HOFLACK, G.; OPSOMER, G. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. **Acta Veterinaria Scandinavica**, p. 56-75, 2014.

MURRATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. *The Veterinary Journal*. v.168, p. 28–40, 2004.

NAGAHATA, H.; HIGUCHI, H.; YAMASHIKI, N.; YAMAGUCHI, M. Analysis of the functional characteristics of L-selectin and its expression on normal and CD18-deficient bovine neutrophils. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 3, p. 264-271, 2000.

NAGYOVÁ, V.; ŠOLTÉSOVÁ, H.; TÓTHOVÁ, C.; NAGY, O. The impact of respiratory disease and diarrhoea on protein profiles in calves. **FOLIA**, v. 59, n. 1, p. 5-11, 2015.

NOVO, S. M. F.; FREITAS, R. L.; COSTA E SILVA, C. P. D.; BALDACIM, V. A. P.; BACCILI, C. C.; REIS, J. F. D.; KAGIWARA, M. K.; GOMES, V. Hematological adaptation in Holstein calves during the neonatal period. **Braz. j. vet. res. anim. sci.**, v. 52, n. 3, p. 212-216, 2015.

OULTRAM, J.; PHIPPS, E.; TEIXEIRA, A. G.; FODITSCH, C.; BICALHO, M. L.; MACHADO, V. S.; OIKONOMOU, G. Effects of antibiotics (oxytetracycline, florfenicol or tulathromycin) on neonatal calves' faecal microbial diversity. **The Veterinary Record**, v.177, n.23, p.598, 2015.

PARDON, B.; ALLIËT, J.; BOONE, R.; ROELANDT, S.; VALGAEREN, B.; DEPREZ, P. Prediction of respiratory disease and diarrhea in veal calves based on immunoglobulin levels and the serostatus for respiratory pathogens measured at arrival. **Preventive veterinary medicine**, v. 120, n. 2, p. 169-176, 2015.

PEREIRA, R. V. V.; LIMA, S.; SILER, J. D.; FODITSCH, C.; WARNICK, L. D.; BICALHO, R. C. Ingestion of milk containing very low concentration of antimicrobials: Longitudinal effect on fecal microbiota composition in preweaned calves. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0147525, 2016.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary research**, v. 35, n. 2, p. 163-187, 2004.

PICCO, N. Y.; ALUSTIZA, F. E.; BELLINGERI, R. V.; GROSSO, M. C.; MOTTA, C. E.; LARRIESTRA, A. J.; VIVAS, A. B. Molecular screening of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from dairy neonatal calves in Cordoba province, Argentina. **Revista argentina de microbiología**, v. 47, n. 2, p. 95-102, 2015.

QUIGLEY, J.V.D.; LAGO., A.; CHAPMAN, C.; ERICKSON, P.; POLO, J. Evaluation of the BRIX refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. **Journal Dairy Science**, v.96, n.2, p.1148-1155, 2013.

REBER, A. J.; DONOVAN, D. C.; GABBARD, J.; GALLAND, K.; ACEVES-AVILA, M.; HOLBERT, K. A.; MARSHALL, L.; HURLEY, D. J. Transfer of maternal colostral leukocytes promotes development of the neonatal immune system Part I. Effects on monocyte lineage cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3-4, p. 186–196, 2008.

ROCHA, T. G.; NOCITI, R. P.; SAMPAIO, A. A.; FAGLIARI, J. J. Hemograma e proteínas de fase aguda de bezerros sadios do nascimento aos 30 dias de idade. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 25-31, 2013.

SATOKARI, R.; GRÖNROOS, T.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 1, p. 8-12, 2009.

SAUGSTAD, O. D. Bronchopulmonary dysplasia – oxidative stress and antioxidants. **Semin Neonatol**, v.8, p.39–49, 2003.

STANTON, A. L.; KELTON, D. F.; LEBLANC, S. J.; MILLMAN, S. T.; WORMUTH, J.; DINGWELL, R. T.; LESLIE, K. E. The effect of treatment with long-acting antibiotic at postweaning movement on respiratory disease and on growth in commercial dairy calves. **Journal Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 574–581, 2010.

STILWELL, G.; DE CARVALHO, R. C.; LIMA, M. S.; BROOM, D. M. Effect of caustic paste disbudding, using local anaesthesia with and without analgesia, on behaviour and cortisol of calves. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 116, n. 1, p. 35-44, 2009.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8. ed. São Paulo: Roca, 2008.

TÓTHOVÁ, C.; NAGY, O.; KOVÁČ, G.; NAGYOVÁ, V. Changes in the concentrations of serum proteins in calves during the first month of life. **Journal of applied animal research**, v. 44, n. 1, p. 338-346, 2016.

ZALEWSKA-KASZUBSKA, J.; GÓRSKA, D. Anti-inflammatory capabilities of macrolides. **Pharmacological research**, v. 44, n. 6, p. 451-454, 2001.

WEINSTEIN, D. A.; ROY, C. N.; FLEMING, M. D.; LODA, M. F.; WOLFSDORF, J. I.; ANDREWS, N. C. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. **Blood**, v. 100, n. 10, p. 3776-3781, 2002.

WEISS, G.; GOODNOUGH, L. T. Anemia of chronic disease. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 1011-1023, 2005.

YIN, J.; REN, W.; LIU, G.; DUAN, J.; YANG, G.; WU, L.; LI, T.; YIN, Y. Birth oxidative stress and the development of an antioxidant system in newborn piglets. **Free Radical Research**. v.47(12), p.1027–1035, 2013.

18 CONCLUSÃO GERAL

A administração de uma dose metafilática de tulatromicina (2,5 mg/Kg) preveniu os animais de desenvolverem infecções umbilicais, porém influenciou negativamente o estabelecimento da população de bactérias simbióticas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) nos primeiros dias de vida levando a um retardo no desenvolvimento do sistema imune, com maior intensidade de processo inflamatório, devido a menor quantidade de bactérias simbióticas no intestino. A administração de tulatromicina não influenciou no ganho de peso e na prevalência de diarreias nos momentos de avaliação, porém corroborou com a presença de doença gastrointestinal mais intensa.

REFERÊNCIAS

- ABDELFATTAH, E. M.; KAROUSA, M. M.; SCHUTZ, M. M.; LAY, D. C.; MARCHANT-FORDE, J. N.; EICHER, S. D. Acute phase cytokines, TAC1, and toll-like receptor4 mRNA expression and health associated with group size in veal calves. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 164, n. 3, p. 118-126, 2015.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.
- ANTONPOULOS, D. A.; HUSE, S. M.; MORRISON, H. G.; SCHMIDT, T. M.; SOGIN, M. L.; YOUNG, V. B. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. **Infection and immunity**, v. 77, n. 6, p. 2367-2375, 2009.
- ARVONEN, M.; VIRTÄ, L. J.; POKKA, T.; KRÖGER, L.; VÄHÄSALO, P. Repeated exposure to antibiotics in infancy: a predisposing factor for juvenile idiopathic arthritis or a sign of this group's greater susceptibility to infections?. **The Journal of rheumatology**, v. 42, n. 3, p. 521-526, 2015.
- AZIZ, Q.; DORÉ, J.; EMMANUEL, A.; GUARNER, F.; QUIGLEY, E. M. M. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n. 1, p. 4-15, 2013.
- BARTELS, C. J.; HOLZHAUER, M.; JORRITSMA, R.; SWART, W. A.; LAM, T. J. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive veterinary medicine**, v. 93, n. 2, p. 162-169, 2010.
- BERGE, A. C. B.; MOORE, D. A.; BESSER, T. E.; SISCHO, W. M. Targeting therapy to minimize antimicrobial use in preweaned calves: Effects on health, growth, and treatment costs. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 9, p. 4707-4714, 2009.
- BRIYNE, N.; ATKINSON, J.; POKLUDOVÁ, L.; BORRIELLO, S. P.; PRICE, S. Factors influencing antibiotic prescribing habits and use of sensitivity testing amongst veterinarians in Europe. **The Veterinary Record**, v. 173, n. 19, p. 475, 2013.
- CHARDAVOYNE, J. R.; IBEAWUCHI, J. A.; KESLER, E. M.; BORLAND, K. M. Waste Milk from Antibiotic Treated Cows as Feed for Young Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 8, p. 1285-1289, 1979.
- CHASE, C. C. L.; HURLEY, D. J.; REBER, A. J. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 24, p. 87-104, 2008.
- CORTESE, V. S. Neonatal immunology. **Veterinary Clinics North America: food animal practice**, v. 25, n.1, p. 221-227, 2009.

COSTA, J. F. R. **Influência dos leucócitos do colostro no desenvolvimento da microbiota intestinal, resposta imune inata e incidência de diarreias em bezerras recém-nascidas.** São Paulo, 2016. 157 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

DIRKSEN, G; GRÜNDER, H D; STÖBER, M R. **Exame clínico dos bovinos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

DONOVAN, D. C.; FRANKLIN, S. T.; CHASE, C. C. L.; HIPPEN, A. R. Growth and Health of Holstein Calves Fed Milk Replacers Supplemented with Antibiotics or Enteroguard1, 2. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 4, p. 947-950, 2002.

EDRINGTON, T. S.; DOWD, S. E.; FARROW, R. F.; HAGEVOORT, G. R.; CALLAWAY, T. R.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J. Development of colonic microflora as assessed by pyrosequencing in dairy calves fed waste milk. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 8, p. 4519-4525, 2012.

ELKJAER, K.; ANCKER, M. L.; GUSTAFSSON, H.; FRIGGENS, N. C.; WALDMANN, A.; MOLBAK, L.; CALLESEN, H. Uterine bacterial flora in postpartum Danish Holstein dairy cows determined using DNA-based fingerprinting: correlation to uterine condition and calving management. **Animal reproduction science**, v.138, n. 1, p. 39-48, 2013.

FERNÁNDEZ, L.; LANGA, S.; MARTÍN, V.; MALDONADO, A.; JIMÉNEZ, E.; MARTÍN, R.; RODRÍGUEZ, J. M. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 1-10, 2013.

FINK, L. N.; FRØKIÆR, H. Dendritic cells from Peyer's patches and mesenteric lymph nodes differ from spleen dendritic cells in their response to commensal gut bacteria. **Scandinavian journal of immunology**, v. 68, n. 3, p. 270-279, 2008.

FUNKHOUSER, L. J.; BORDENSTEIN, S. R. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. **PLoS Biol**, v. 11, n. 8, p. e1001631, 2013.

GABORIAU-ROUTHIAU, V.; RAKOTOBÉ, S.; LÉCUYER, E.; MULDER, I.; LAN, A.; BRIDONNEAU, C.; EBERL, G. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. **Immunity**, v. 31, n. 4, p. 677-689, 2009.

GOSALBES, M. J.; LLOP, S.; VALLES, Y.; MOYA, A.; BALLESTER, F.; FRANCINO, M. P. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 43, n. 2, p. 198-211, 2013.

GRONLUND, M-M.; ARVILOMMI, H.; KERO, P.; LEHTONEN, O-P.; ISOLAURI, E. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal**, v. 83, p. 186-192, 2000.

HEINRICHS, A. J.; JONES, C. M.; HEINRICHS, B. S. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 12, p. 4064-4069, 2003.

HILL, M. J.; DRASAR, B. S. The normal colonic bacterial flora. **Gut**, v. 16, n. 4, p. 318, 1975.

HOOPER, L. V.; BRY, L.; FALK, P. G.; GORDON, J. I. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. **Bioessays**, v. 20, n. 4, p. 336-343, 1998.

IVANOV, I. I.; ATARASHI, K.; MANEL, N.; BRODIE, E. L.; SHIMA, T.; KARAOZ, U.; TANOUE, T. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 485-498, 2009.

IVES, S. E.; RICHESON, J. T. Use of antimicrobial metaphylaxis for the control of bovine respiratory disease in high-risk cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 31, n. 3, p. 341-350, 2015.

JACOBS, J. P.; BRAUN, J. Jonathan. Immune and genetic gardening of the intestinal microbiome. **FEBS letters**, v. 588, n. 22, p. 4102-4111, 2014.

JERNBERG, C.; LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; JANSSON, J. K. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. **Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 3216, 2010.

JIANG, X.; YANG, H.; DETTMAN, B.; DOYLE, M. P. Analysis of fecal microbial flora for antibiotic resistance in ceftiofur-treated calves. **Foodborne Pathogens & Disease**, v. 3, n. 4, p. 355-365, 2006.

JIMÉNEZ, E.; FERNÁNDEZ, L.; MARÍN, M. L.; MARTÍN, R.; ODRIÓZOLA, J. M.; NUENO-PALOP, C.; RODRÍGUEZ, J. M. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. **Current microbiology**, v. 51, n. 4, p. 270-274, 2005.

KANEENE, J. B.; WARNICK, L. D.; BOLIN, C. A.; ERSKINE, R. J.; MAY, K.; MILLER, R. Changes in tetracycline susceptibility of enteric bacteria following switching to nonmedicated milk replacer for dairy calves. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1968-1977, 2008.

KOBOZIEV, I.; WEBB, C. R.; FURR, W. B. K.; GRISHAM, M. B. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. **Free Radical Biology and Medicine** **G8**, p. 122-133, 2014.

KELLY, D.; COUTTS, A. G. P. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, n. 2, p. 177-185, 2000.

KLEIN-JÖBSTL, D.; SCHORNSTEINER, E.; MANN, E.; WAGNER, M.; DRILLICH, M.; SCHMITZ-ESSER, S. Pyrosequencing reveals diverse fecal microbiota in Simmental calves during early development. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 2014.

KOCH, M. A.; REINER, G. L.; LUGO, K. A.; KREUK, L. S.; STANBERY, A. G.; ANSALDO, E.; BARTON, G. M. Maternal IgG and IgA antibodies dampen mucosal T helper cell responses in early life. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 827-841, 2016.

KNUDSEN, L. R. V.; SCHOU, K. K.; JENSEN, T. K.; ANGEN, O. Molecular characterisation of the uterine microbiome of dairy cows suffering from endometritis, metritis and pyometra. Kgs. **Lyngby: Technical University of Denmark**, 2014.

LAGUARDIA-NASCIMENTO, M.; BRANCO, K. M. G. R.; GASPARINI, M. R.; GIANNATTASIO-FERRAZ, S.; LEITE, L. R.; ARAUJO, F. M. G.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Vaginal microbiome characterization of Nellore cattle using metagenomic analysis. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0143294, 2015.

LANGFORD, F. M.; WEARY, D. M.; FISHER, L. Antibiotic resistance in gut bacteria from dairy calves: a dose response to the level of antibiotics fed in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 12, p. 3963-3966, 2003.

LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 776-788, 2008.

LUKÁŠ, F.; KOPPOVÁ, I.; KUDRNA, V.; KOPEČNÝ, J. Postnatal development of bacterial population in the gastrointestinal tract of calves. **Folia microbiologica**, v. 52, n. 1, p. 99-104, 2007.

MACPHERSON, A. J.; GEUKING, M. B.; MCCOY, K. D. Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. **Immunology**, v. 115, n. 2, p. 153-162, 2005.

MACPHERSON, A. J.; SLACK, E. The functional interactions of commensal bacteria with intestinal secretory IgA. **Current opinion in gastroenterology**, v. 23, n. 6, p. 673-678, 2007.

MALMUTHUGE, N.; CHEN, Y.; LIANG, G.; GOONEWARDENE, L. A. Heat-treated colostrum feeding promotes beneficial bacteria colonization in the small intestine of neonatal calves. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 11, p. 8044-8053, 2015.

MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P. J. Taxonomic identification of commensal bacteria associated with the mucosa and digesta throughout the gastrointestinal tracts of preweaned calves. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 6, p. 2021-2028, 2014.

MALMUTHUGE, N.; LI, M.; CHEN, Y.; FRIES, P.; GRIEBEL, P. J.; BAURHOO, B.; GUAN, L. L. Distinct commensal bacteria associated with ingesta and mucosal epithelium in the gastrointestinal tracts of calves and chickens. **FEMS microbiology ecology**, v. 79, n. 2, p. 337-347, 2012.

MARTIN, V.; BARRAGÁN, A. M.; MOLES, L.; BANOS, M. R.; CAMPO, R.; FERNANDEZ, L.; RODRIGUEZ, J. M.; JIMENEZ, E. Sharing of bacterial strains between breast milk and infants feces. **Journal of Human Lactation**, v. 28, n. 1, p. 36-44, 2012.

MATAMOROS, S.; GRAS-LEGUEN, C.; LE VACON, F.; POTEL, G.; DE LA COCHETIERE, M. F. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 4, p. 167-173, 2013.

MAWLY, J.; GRINBERG, A.; PRATTLE, D.; MOFFAT, J.; MARSHALL, J.; FRENCH, N. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. **The Veterinary Journal**, v. 203, n. 2, p. 155-160, 2015.

MAYER, M.; ABENTHUM, A.; MATTHES, J. M.; KLEEBERGER, D.; EGE, M. J.; HÖLZEL, C.; BAUER, J.; SCHWAIGER, K. Development and genetic influence of the rectal bacterial flora of newborn calves. **Veterinary microbiology**, v. 161, n. 1-2, p. 179, 2012.

NOVO, S. M. F.; DOS REIS COSTA, J. F.; BACCILI, C. C.; SOBREIRA, N. M.; SILVA, B. T.; DE OLIVEIRA, P. L.; HURLEY, D. J.; GOMES, V. Effect of maternal cells transferred with colostrum on the health of neonate calves. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p. 97-104, 2017.

OIKONOMOU, G.; TEIXEIRA, A. G. V.; FODITSCH, C.; BICALHO, M. L.; MACHADO, V. S.; BICALHO, R. C. Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of Faecalibacterium species with health and growth. *PLoS One*, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2015.

OULTRAM, J.; PHIPPS, E.; TEIXEIRA, A. G.; FODITSCH, C.; BICALHO, M. L.; MACHADO, V. S.; OIKONOMOU, G. Effects of antibiotics (oxytetracycline, florfenicol or tulathromycin) on neonatal calves' faecal microbial diversity. **The Veterinary Record**, v.177, n.23, p.598, 2015.

PANDA, S.; CASELLAS, F.; VIVANCOS, J. L.; CORS, M. G.; SANTIAGO, A.; CUENCA, S.; Guarner, F.; MANICHANH, C. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. 95476, 2014.

PEREIRA, R. V. V.; LIMA, S.; SILER, J. D.; FODITSCH, C.; WARNICK, L. D.; BICALHO, R. C. Ingestion of milk containing very low concentration of antimicrobials: Longitudinal effect on fecal microbiota composition in preweaned calves. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0147525, 2016.

RADISSON, J. J.; SMITH, C. K.; WARD, G. M. The Mode of Action of Antibiotics in the Nutrition of the Dairy Calf. I. Effect of Terramycin Administered Orally on the Performance and Intestinal Flora of Young Dairy Calves1. **Journal of Dairy Science**, v. 39, n. 9, p. 1260-1267, 1956.

RAMIREZ, C. R.; HARDING, A. L.; FORTEGUERRI, E. B. R.; ALDRIDGE, B. M.; LOWE, J. F. Limited efficacy of antimicrobial metaphylaxis in finishing pigs: A randomized clinical trial. **Preventive veterinary medicine**, v. 121, n. 1, p. 176-178, 2015.

REZENDE, L. G. **Avaliação de parâmetros clínicos e hematológicos e viabilidade econômica do uso de florfenicol na metafilaxia das doenças respiratórias inespecíficas de bovinos confinados no estado de Goiás**. Goiânia, 2010. 58 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

RESCIGNO, M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. **Trends in Immunology**, v.32, n. 6, p. 256-264, 2011.

RESCIGNO, M.; URBANO, M.; VALZASINA, B.; FRANCOLINI, M.; ROTTA, G.; BONASIO, R.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nature immunology**, v. 2, n. 4, p. 361-367, 2001.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary parasitology**, v. 122, n. 2, p. 103-117, 2004.

SATOKARI, R.; GRÖNROOS, T.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 1, p. 8-12, 2009.

SHARMA, R.; MUNNS, K.; ALEXANDER, T.; ENTZ, T.; MIRZAAGHA, P.; YANKE, L. J.; MCALLISTER, T. Diversity and distribution of commensal fecal *Escherichia coli* bacteria in beef cattle administered selected subtherapeutic antimicrobials in a feedlot setting. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 20, p. 6178-6186, 2008.

SILVA, N.; IGREJAS, G.; GONÇALVES, A.; POETA, P. Commensal gut bacteria: distribution of *Enterococcus* species and prevalence of *Escherichia coli* phylogenetic groups in animals and humans in Portugal. **Annals of microbiology**, v. 62, n. 2, p. 449-459, 2012.

SILVERLÅS, C.; DE VERDIER, K.; EMANUELSON, U.; MATTSSON, J. G.; BJÖRKMAN, C. *Cryptosporidium* infection in herds with and without calf diarrhoeal problems. **Parasitology research**, v. 107, n. 6, p. 1435-1444, 2010.

SMITH, G. Antimicrobial decision making for enteric diseases of cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 47-60, 2015.

STANTON, A. L.; KELTON, D. F.; LEBLANC, S. J.; MILLMAN, S. T.; WORMUTH, J.; DINGWELL, R. T.; LESLIE, K. E. The effect of treatment with long-acting antibiotic at postweaning movement on respiratory disease and on growth in commercial dairy calves. **Journal Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 574–581, 2010.

TASCHUK, R.; GRIEBEL, P. J. Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, n. 1, p.129-141, 2012.

TIZARD, I. R. *Imunologia Veterinária*, New York, v. 199, n. 1, p. 19-48, 2010.

VAZIRI, N. D.; ZHAO, Y. Y.; PAHL, M. V. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 31, n. 5, p. 737-746, 2015.

VENDRIG, J. C.; FINK-GREMMELES, J. Intestinal barrier function in neonatal foals: Options for improvement. **The Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 32-37, 2012.

VERHASSELT, V. Neonatal tolerance under breastfeeding influence. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 623-630, 2010.

UHDE, F. L.; KAUFMANN, T.; SAGER, H.; ALBINI, S.; ZANONI, R.; SCHELLING, E.; MEYLAN, M. Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. **The Veterinary record**, v. 163, n. 12, p. 362-366, 2008.

URSELL, L. K.; METCALF, J. L.; PARFREY, L. W.; KNIGHT, R. Defining the human microbiome. **Nutrition reviews**, v. 70, n. suppl. 1, p. S38-S44, 2012.

UYENO, Y.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y. rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n. 5, p. 570-577, 2010.

WANG, S.; ZHU, H.; LU, C.; KANG, Z.; LUO, Y.; FENG, L.; LU, X. Fermented milk supplemented with probiotics and prebiotics can effectively alter the intestinal microbiota and immunity of host animals. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 9, p. 4813-4822, 2012.

WEN, K.; AZEVEDO, M. S.; GONZALEZ, A.; ZHANG, W.; SAIF, L. J.; LI, G.; YUAN, L. Toll-like receptor and innate cytokine responses induced by lactobacilli colonization and human rotavirus infection in gnotobiotic pigs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 127, n. 3, p. 304-315, 2009.

WERLING, D.; PIERCY, J.; COFFEY, T. J. Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells — Potential role in pathogen discrimination? **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 112, n. 1, p. 2-11, 2006.

APÊNDICE A

Quadro 7 - Avaliação da viabilidade, número de células vivas, número de células mortas, produção espontânea e estimulada com PMA de espécies reativas de oxigênio no sangue de bovinos até 30 minutos após a coleta, 24 horas de armazenamento em geladeira (4°C) e 24 horas de armazenamento em isopor (18°C).

Tempos	Células	Células + PMA	Viabilidade	Células vivas	Células mortas
Até 30 minutos	1137,25375	2022,53875	88,2	202	27
	1257,52125	2925,67	90,95	191	19
	389,79675	1232,35325	95,26	201	10
	397,30175	1164,951	88,35	167	22
	425,056	1209,482	93,33	224	16
24h - geladeira	206,69475	1248,29075	86,26	289	46
	1018,2825	2838,761	91,52	216	20
	240,974	1036,9795	89,28	175	21
	145,88875	983,24225	88,23	165	22
	261,62475	1951,36075	89,5	179	21
24h - isopor	456,0495	1408,98775	85,71	216	36
	250,50575	1004,311	88,16	149	20
	352,87425	958,0615	86,39	127	20
	245,6355	1083,33975	87,43	160	23
	269,55125	1306,856188	86,04	130	21
P	0,155	0,374	0,023	0,138	0,405

ANEXO A - PBS 10x (Concentrado)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	26,79g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4,14g
NaCl	82g
Água destilada.....	1000mL
PBS uso: 1 PBS 10x: 9 de água destilada	

ANEXO B - Azul de Trypan (0,4%)

Azul de Trypan.....	2g
PBS.....	50mL

Solução de uso

1mL da solução estoque para 4mL de PBS - acondicionar geladeira e proteger da luz solar.