

JEAN SILVA RAMOS

**Haptoglobina como biomarcador de doenças em bezerras  
Holandesas**

São Paulo  
2018

JEAN SILVA RAMOS

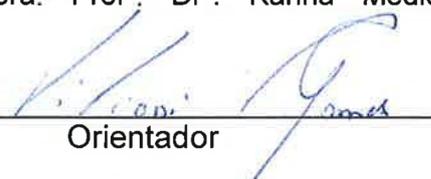
**Haptoglobina como biomarcador de doenças em bezerras Holandesas**

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:**  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviani Gomes  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Medici  
Madureira

De acordo:   
Orientador

São Paulo  
2018

**Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP**

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. 3691 FMVZ	Ramos, Jean Silva Haptoglobina como biomarcador de doenças em bezerras holandesas / Jean Silva Ramos. – 2018. 83f. : il.
	Mestrado (Dissertação) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2018.
	Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária. Área de concentração: Clínica Veterinária. Orientadora: Profa. Dra. Viviani Gomes. Coorientadora: Profa. Dra. Karina Medici Madureira.
	1. Diarreia. 2. Doença respiratória. 3. Pré-desmame. 4. Inflamação. 5. Proteína de fase aguda. I. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "HAPTOGLOBINA SÉRICA COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE DOENÇAS EM BEZERRAS HOLANDESAS", protocolada sob o CEUA nº 5132061217 (ID 004585), sob a responsabilidade de **Viviani Gomes e equipe; JEAN SILVA RAMOS** - 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 28/02/2018.

We certify that the proposal "Serum Haptoglobin as a biological marker of diseases in Holstein calves", utilizing 600 Bovines (600 females), protocol number CEUA 5132061217 (ID 004585), under the responsibility of **Viviani Gomes and team; JEAN SILVA RAMOS** - 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 02/28/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **12/2017** a **03/2017**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **1 a 150 dias**

N: **600**

Linhagem: **Holandesa**

Peso: **30 a 200 kg**

Local do experimento: **Fazenda Colorado - Araras/SP**

São Paulo, 04 de agosto de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RAMOS, Jean Silva

Título: **Haptoglobina como biomarcador de doenças em bezerras Holandesas**

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

*Dedico este trabalho aos meus pais Sebastião Cruz Ramos e Eliene Pereira Silva, aos meus irmãos Marcos Henrique Silva Ramos e Ellen Silva Ramos e ao querido padrinho Millen Castro Medeiros de Moura, pessoas que sempre me apoiaram.*

*Às professoras Viviani Gomes e Karina Medici Madureira por todo apoio, aprendizado, paciência e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, por guiar os meus caminhos.*

*Ao meu pai Sebastião Cruz Ramos, por todo apoio que tive ao longo de toda esta trajetória acadêmica. Por me mostrar como ser uma pessoa melhor, honesta, inteligente, perseverante e batalhadora, pois estas são as suas qualidades. Agradeço toda a confiança ao longo de todo este período.*

*A minha mãe Eliene Pereira Silva, além de mãe uma grande amiga, que me ajudou nos momentos difíceis e que acreditou e acredita em todos os sonhos que tenho, que me motiva e me concede forças para os grandes desafios. Aos meus irmãos Marcos e Ellen e sua esposa Priscila. Grandes amigos que trago no peito.*

*À Millen Castro, um amigo, um padrinho, uma excelente pessoa, humilde e inteligente que tem me ajudado constantemente. Sou muito grato pela confiança que deposita em mim.*

*Às professoras Viviani Gomes e Karina Madureira. Sou muito grato pelas oportunidades cedidas, desde os primeiros passos nas iniciações científicas, assim como no mestrado. Foi um crescimento incalculável. Neste período pude me tornar uma pessoa melhor, além de agregar um excelente aprendizado na medicina de produção. Como dizia o filósofo Isaac Newton, “Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.*

*Ao Prof. José Eugênio Guimarães, um grande amigo. Sou grato a todos os conselhos, e por sempre estar presente.*

*À Fabricio Dias Torres, pelos bons churrascos, e sem dúvidas pela indicação aos professores Gustavo Zamberlam e Gilles Fecteau. Oportunidade única que irá agregar muito no meu desenvolvimento pessoal e profissional.*

*À equipe GeCria: Uma equipe fantástica, com excelentes pessoas e profissionais. Aqui pude aprender, crescer e ter ótimas amizades. Faltam palavras para descrever todas as coisas boas que aconteceram ao longo destes dois anos. À Camila Baccili, por todos os ensinamentos, uma pessoa admirável, pela sabedoria que carrega, assim como pela inteligência e toda a dedicação. À Natália Sobreira, por todos o aprendizado neste período, admiro muito a sua experiência e a forma com que lida com o trabalho, agradeço todo apoio e incentivo. À Camila Cecília Martin, uma das pessoas mais determinadas que conheci, sou muito grato por tudo que fez por mim em São Paulo, sempre apoiando e incentivando, aprendi muito com você. À*

*Karen Nascimento, por me mostrar como ser uma pessoa calma, paciente e sem dúvidas perseverante, te admiro demais. À Daniela Tardón, foi uma ótima experiência poder trabalhar com uma Chilena, ou melhor a Chilena da equipe. À Laila Morita, o maior contato foi no experimento, e a primeira coisa que me vem à cabeça sobre você é a eficiência, sou muito grato por tudo. À Fernanda Ramos, Karine Ávila, Natália Decaris, Filipe, Raquel, Tais Pinheiro, João, Bruna Paes, por todo o aprendizado, todo apoio, todos os conselhos, sou grato por tudo. Ao olhar para a equipe GeCria vejo uma equipe com muita dedicação, união e que tem amor pelo que faz. Um agradecimento especial para Karen, Laila e Karine, não é todo dia que se examina 216 bezerras ao longo de oito momentos, parabéns pelo trabalho feito e muito obrigado.*

*Ao ilustre diretor da FMVZ/USP Prof. Dr. José Antonio Visintin e aos admirados professores do Departamento de Clínica Médica: Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior, Profa. Dra. Carla Bargi Belli, Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, Profa. Dra. Denise Saretta Schwartz, Prof. Dr. Enrico Lippi Otolani, Prof. Dr. Fábio Celidonio Pogliani, Prof. Dr. Fernando José Benesi, Profa. Dra. Lílian Gregory, Profa. Dra. Márcia de Oliveira Sampaio Gomes, Profa. Dra. Marcia Mery Kogika, Profa. Dra. Maria Cláudia Araripe Sucupira, Profa. Dra. Maria Helena Matiko Akao Larsson, Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, Profa. Dra. Raquel Yvona Arantes Baccarin, Profa. Dra. Silvia Regina Ricci e Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes.*

*Aos colegas do programa de pós-Graduação em Clínica Veterinária.*

*Às boas amigas que tive aqui na USP, Diego, Hélio, Rafael e Alhen.*

*À toda equipe dos Laboratórios da FMVZ/USP, Clara Mori, Cláudia, Maria Helena da Silva e Dinha. Obrigado por todo apoio.*

*À toda equipe da Fazenda Colorado, pelo apoio frente a realização do projeto, e por abrir as portas para a realização do estágio supervisionado.*

*A todos os funcionários da FMVZ/USP meus sinceros agradecimentos.*

*À Bayer por financiar todo o projeto de pesquisa e por proporcionar um crescimento científico no meio acadêmico.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado (2016-2018).*

Agradeço ao mundo por mudar as coisas,  
por nunca fazê-las serem da mesma forma,  
pois assim não teríamos o que pesquisar, o  
que descobrir e o que fazer, pois através  
disso conseguimos desvendar cada passo  
da ciência.

(Autor Desconhecido)

## RESUMO

RAMOS, J. S. **Haptoglobina como biomarcador de doenças em bezerras Holandesas**. [Haptoglobin as a biomarker of diseases in Holstein heifers]. 2018. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O presente estudo avaliou a dinâmica da onfalite, diarreia e Doença Respiratória Bovina (DRB), além do comportamento da haptoglobina (Hp) em bezerras Holandesas nos primeiros 41 dias de vida. Ainda, foi possível determinar os parâmetros de performance da Hp frente à detecção de doenças. Para tanto, foram avaliadas 216 bezerras nos momentos D2-6; D7-13; D14-20; D21-27 e D31-41. A haptoglobina (Hp) foi mensurada por técnica espectrofotométrica, enquanto a sanidade das bezerras foi avaliada segundo o *Calf Health Scoring Criteria*, da *University of Wisconsin – Madison*. A diarreia foi monitorada pela avaliação da consistência das fezes, sendo adotada a seguinte classificação: escore 0 – fezes com consistência normal; escore 1- fezes pastosas e semi-formada; escore 2- fezes pastosas com maior quantidade de água e conteúdo fecal aderido ao períneo e cauda; escore 3- fezes líquidas com conteúdo fecal aderido no períneo e cauda. Escores 2 e 3 foram considerados positivos para diarreia. A matéria seca das fezes também foi determinada para avaliação da saúde intestinal, sendo os animais com valores  $\leq 15\%$  classificados como positivos para diarreia. A DRB foi determinada adotando-se os seguintes parâmetros: tosse, secreção nasal, secreção ocular, posicionamento de orelhas e temperatura corpórea, sendo pontuados de 0 a 3 de acordo com a intensidade da sintomatologia. Soma das pontuações escore  $\geq 5$  foi adotada para classificar os animais positivos para DRB. As onfalites foram determinadas pela inspeção e palpação das estruturas umbilicais externas. O período de maior prevalência da onfalite foi no D7-13 (8,8%; 19/216), seguida pelas diarreias no D14-20 (42,9%; 76/177) e DRB no D31-41 (26,4%; 55/208). A média da concentração de Hp durante o experimento foi de  $0,03 \pm 0,05$  g/L, com valores mínimo e máximo de 0,00 e 0,52 g/L, respectivamente. Os picos de haptoglobina foram detectados nos momentos D7-13 ( $0,04 \pm 0,07$ ) e D14-20 ( $0,04 \pm 0,05$  g/L). Em relação às diarreias (escore fecal 2 e 3), a Hp apresentou sensibilidade de 56,9% e especificidade 74,07%, sendo o ponto de corte estabelecido equivalente a 0,02 g/L. Resultados semelhantes foram observados para diarreias determinadas pelo teor de matéria seca:

sensibilidade 58,1; especificidade 76,2; e ponto de corte 0,02 g/L. Em relação a DRB, a sensibilidade e especificidade foi de 72,7 e 81,2%, respectivamente, quando utilizado a soma do escore respiratório  $\geq 5$  associado à temperatura retal  $>39,5^{\circ}\text{C}$ , com ponto de corte de 0,02 g/L. O ciclo de doenças foi caracterizado cronologicamente pelas onfalites, diarreias e DRB nos primeiros 41 dias de vida. A haptoglobina pode ser usada como biomarcador para a detecção da DRB. Por outro lado, a proteína apresentou baixa sensibilidade para detecção de diarreia usando dois padrões-ouro. Palavras-chave: Diarreia. Doença respiratória. Pré-desmame. Inflamação. Proteína de fase aguda.

## ABSTRACT

RAMOS, J. S. **Haptoglobin as a biomarker of diseases in Holstein heifers** [Haptoglobina como biomarcador de doenças em bezerras Holandesas]. 2018. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

This research evaluated the dynamic of navel inflammation, diarrhea and Bovine Respiratory Disease (BRD), besides the haptoglobin (Hp) profile in Holstein heifers in the first 41 days of life. Moreover, it was possible to determine the development of haptoglobin to detect diseases. For this, it was evaluated 216 Holstein heifers in the following moments D2-6; D7-13; D14-20; D21-27 e D31-41. Haptoglobin was measured using spectrophotometric, and the health status of calves were assessed in accordance with the Calf Health Scoring Criteria from The University of Wisconsin (Madison). Diarrhea was monitored according to fecal consistency, using the following classification: score 0- normal consistency, score 1- pasty, semi-formed, score 2- pasty with largest amount of water, score 3- liquid with fecal content adhered in the perineum and tail. Calves were assessed having diarrhea when the score were 2 or 3. Fecal dry matter also was determined to evaluate the gut health, so animals with values  $\leq 15\%$  were classified such as positive for diarrhea. BRD was assessed using the following parameters: rectal temperature, nasal secretion, ocular secretion, cough and ear/head position with score of 0-3 based on severity of each. Calves were assessed having BRD when the sum of these scores was  $\geq 5$ . Omphalitis was evaluated by inspection and palpation of navel external structures. The highest prevalence of omphalitis was observed on D7-D13 (8.8%; 19/216), followed diarrhea on D14-D20 (42.9%, 76/177) and BRD on D31-D41 (26.4%; 55/208). The mean of Hp along this research was  $0.03 \pm 0.05$  g/L, with minimum and maximum values of 0.00 e 0.52 g/L, respectively. The peak of haptoglobin was detected on D7-13 ( $0.04 \pm 0.07$ ) e D14-20 ( $0.04 \pm 0.05$  g/L). In relation to diarrhea (fecal score 2 and 3), the haptoglobin had sensibility of 56.9% and specificity of 74.07%, and the cut-off established was 0.02 g/L. Similar results was observed for diarrhea determined using fecal dry matter: sensibility of 58.1; specificity of 76.2; and cut-off of 0.02 g/L. In relation to BRD, sensibility and specificity detected was 72.7 and 81.2%, respectively, when the sum of score was  $\geq 5$  associated with rectal temperature  $> 39.5^\circ\text{C}$ , with cut-off equal 0.02 g/L. The cycle of diseases was characterized by omphalitis, diarrhea and BRD in the first

41 days of life. Haptoglobin can be used as a biomarker to detect BRD. On the other hand, this protein had low sensibility to detect diarrhea using two gold standard.

Key-words: Diarrhea. Respiratory disease. Prewearing. Inflammation. Acute phase protein.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desencadeamento da resposta de fase aguda, com os diferentes tipos de estimulação – São Paulo – 2018.....	33
Figura 2 - Estrutura molecular da Hp, com as respectivas subunidades e receptores – São Paulo – 2018 .....	34
Figura 3 - Importância da Hp na modulação das respostas imunológicas – São Paulo – 2018 .....	36
Figura 4 - Layout do preenchimento das amostras na placa de Elisa com 96 poços – São Paulo – 2018 .....	51
Figura 5 - Representação gráfica dos valores de haptoglobina da curva padrão, com concentração de 0,59 g/L – São Paulo – 2018 .....	52
Figura 6 - Coeficiente de variação intra-teste de amostras com baixa, média e alta concentração de Hp em bezerras Holandesas – São Paulo – 2018 .....	53
Figura 7 - Coeficiente de variação inter-teste de amostras com baixa, média e alta concentração de Hp em bezerras Holandesas – São Paulo – 2018 .....	54
Figura 8 - Ocorrência de onfalite, diarreia e DRB em bezerras durante os primeiros dias de vida (N=816) – São Paulo – 2018 .....	59
Figura 9 - Média da concentração de Hp em bezerras da raça Holandesa nos primeiros dias de vida (N= 796 observações) – São Paulo – 2018 .....	60
Figura 10 - Análise de sensibilidade e especificidade da Hp no período de maior manifestação da diarreia (D7-13) em bezerras da raça Holandesa – São Paulo – 2018 .....	61
Figura 11 - Análise de sensibilidade e especificidade da Hp no período de maior manifestação da diarreia (D14-20) em bezerras da raça Holandesa – São Paulo – 2018 .....	62
Figura 12 - Análise de sensibilidade e especificidade da Hp no período de maior manifestação da diarreia (D14-20) para os quatro padrões-ouro utilizados – São Paulo – 2018 .....	63
Figura 13 - Análise de sensibilidade e especificidade da Hp no período de maior manifestação da DRB (D31-41) em bezerras da raça Holandesa – São Paulo – 2018 .....	64
Figura 14 - Análise de sensibilidade e especificidade da Hp no período de maior manifestação da DRB (D14-20) utilizando-se diferentes padrões-ouro – São Paulo – 2018 .....	65

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Escores de fezes para a detecção de diarreia – São Paulo – 2018 .....	25
Quadro 2 - Escore para a detecção da Doença Respiratória Bovina – São Paulo – 2018 .....	29
Quadro 3 - Escores da DRB – São Paulo – 2018 .....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coeficiente de variação (CV) intra-teste de amostras com baixa, média e alta concentração de Hp em bezerras Holandesas – São Paulo – 2018 .....	54
Tabela 2 - Coeficiente de variação (CV) inter-teste de amostras com baixa, média e alta concentração de Hp em bezerras Holandesas – São Paulo – 2018 .....	55
Tabela 3 - Ocorrência de onfalite, diarreia e DRB %(número de casos positivos/número total de animais) em bezerras Holandesas durante os primeiros dias de vida (N=816) – São Paulo – 2018 .....	58
Tabela 4 - Concentração da haptoglobina (média±desvio-padrão) em bezerras durante os primeiros dias de vida (N=816) – São Paulo – 2018 .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{M/L}$	Micromol por litro
AAS	Amilóide A sérica
AGA	Apha-1 glicoproteína ácida
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico intracelular
ANOVA	Análise de variância
AUC	Area under the curve
BHV-1	Rinotraqueite Infecciosa Bovina
BRSV	Vírus Respiratório Sincicial Bovino
BVDV	Vírus da Diarreia Viral Bovina
CA	California
COX	Cicloxygenase
Cp	Ceruloplasmina
CV	Coeficiente de variação
DRB	Doenças respiratória bovina
EDTA-K2	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETEC	Escherichia coli enterotoxigênica
g/L	gramas por litro
Hb	Hemoglobina
Hp	Haptoglobina
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
kDa	Kilodaltons
L3	Estágio das larvas
LOX	Lipoxigenase
LR+	Likelihood ratio test positive
LT-	Likelihood ratio test negative
T	Tempos
MS	Materia seca
NF-Kb	Fator de transcrição kappa beta
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PC-R	Proteína C reativa
PFA	Proteínas de fase aguda
PI3	Vírus da Parainfluenza tipo 3
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
ROC	Receiver Operating Characteristic
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
WI	Winscosin

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
≥	Maior ou igual que
>	Maior que
°C	Graus Celsius
≤	Menor ou igual que
<	Menor que
+	Mais
*	Diferença estatística
α	Alfa
=	Igual
±	Mais ou menos
β	Beta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
2.1 Aspectos Gerais da Diarreia.....	23
2.2 Aspectos Gerais da Doença Respiratória.....	26
2.3 Proteínas de fase aguda: estímulo, mecanismo de ativação e funções.....	31
2.4 Hp como biomarcador de doenças.....	36
<b>2.4.1 Haptoglobina como biomarcador de diarreia</b> .....	36
<b>2.4.2 Haptoglobina como biomarcador de DRB</b> .....	38
<b>2.4.3 Haptoglobina como proteína preditora ou biomarcador de outras enfermidades</b> .....	40
<b>2.4.4 Otimização do uso da haptoglobina como biomarcador</b> .....	42
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	44
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
4.1 Local do experimento .....	45
4.2 Manejo das vacas pré-parto e bezerras .....	45
4.3 Animais e momentos de avaliações .....	47
<b>4.3.1 Colheita e armazenamento das amostras</b> .....	49
4.4 Análises laboratoriais .....	50
<b>4.4.1 Dosagem da Haptoglobina (Hp)</b> .....	50
<b>4.4.1.1 Determinação da repetibilidade da Hp por técnica espectrofotométrica</b> .....	52
<b>4.4.2 Matéria seca das fezes (MS)</b> .....	55
4.5 Análise estatística .....	55
<b>5 RESULTADOS</b> .....	58
5.1 Ocorrência e prevalência de onfalite, diarreia e doença respiratória.....	58
5.2 Comportamento da Hp em bezerras da raça Holandesa .....	60

5.3 Determinação dos parâmetros de performance da Hp em relação aos momentos de maior prevalência da onfalite, diarreia e DRB .....	61
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
6.1 Prevalência de doenças (onfalite, diarreia e DRB).....	66
6.1 Comportamento da Hp nos primeiros dias de vida.....	68
6.2 Avaliação da sensibilidade, especificidade e ponto de corte da Hp frente a onfalite diarreia e DRB.....	69
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>73</b>
REFERÊNCIAS.....	74

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente o rebanho bovino brasileiro concentra aproximadamente 218,23 milhões de cabeças (IBGE, 2016). O número de vacas ordenhadas é estimado em 23 milhões e a produção média anual é de 1154 litros de leite/vaca. O Brasil ocupa a posição de quinto maior produtor mundial de leite (SABBAG; COSTA, 2015; FAO 2016).

O crescimento do rebanho nacional e produtividade de leite dependem da excelência na fase de cria que precisa ser visualizada como um investimento e não custo ao sistema de produção. A eficiência na criação de bezerras depende da gestão dos desafios sanitários, especialmente diarreias e doença respiratória, pois esses fatores exercem uma influência significativa na vida futura, principalmente em relação à produção de leite (LINDEN; BICALHO; NYDAM, 2009).

Diferentes patógenos promovem diferentes respostas imunológicas. Após a quebra da barreira física nas mucosas, estas respostas têm início com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) por principalmente células dendríticas, macrófagos e monócitos. Após o reconhecimento, são sintetizadas citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e o fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) responsáveis pela sinalização celular. Estas glicoproteínas estimulam a síntese de Hp pelo fígado (TIZARD, 2008; BODE et al., 2012).

A Hp é uma das principais proteínas de fase aguda (PFA) dos bovinos, utilizada como um biomarcador para a detecção de processos inflamatórios, especialmente em animais adultos (ECKERSALL; BELL, 2010). A Salmonela causa diarreia em bezerros e promove alterações significativas sobre a concentração de Hp (0,2 g/L) comparado a um grupo placebo (0,0 g/L) (DEIGNAN et al., 2000), assim como diarreia causadas pelo *Cryptosporidium* com concentração de 0,27 g/L em relação ao controle 0,09 g/L (HAJIMOHAMMADI et al., 2013). A DRB promove aumentos significativos sobre a concentração de Hp (ANGEN et al., 2009; TÓTHOVÁ et al., 2012; JOSHI et al., 2018). Alguns agentes estão envolvidos com os aumentos na concentração sérica desta proteína, como em infecções respiratórias por *Manhemmia* e BVDV (GÂNHEIM et al., 2003), BRSV (HEEGAARD et al., 2000) e *Dictyocaulus viviparus* (GÂNHEIM; HÖGLUND; WALLER, 2004). A DRB, detectada por escores, tem

mostrado associação significativa com os aumentos séricos da Hp (JOSHI et al., 2018).

Em bezerras ainda existe uma limitação de estudos sobre a validade da Hp como biomarcador, considerando-se o perfil imunológico imaturo do recém-nascido, além da escassez de pesquisas sobre o uso da Hp para a detecção de doenças. Outros aspectos necessários em estudos com a Hp e a sua associação com as doenças é a avaliação da precisão da técnica utilizada (ABDALLAH et al., 2016) e a acurácia da utilização desta proteína frente a diferentes padrões-ouro, avaliando parâmetros de performance, como a sensibilidade e especificidade (ALBAYRAK; KABU, 2016; ABDALLAH et al., 2016).

Diante deste cenário, faz-se necessário a elaboração de estudos utilizando a Hp como biomarcador de doenças em bezerras. O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar o uso da haptoglobina como biomarcador de doenças em bezerras Holandesas nos primeiros 41 dias de vida.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste tópico estão apresentados dados nacionais e internacionais sobre a ocorrência das principais doenças que acometem as bezerras no período inicial de vida. O comportamento da Hp, mecanismos de ativação, funções fisiológicas, a sua associação com a onfalite, diarreia e DRB, assim como a utilização desta proteína na medicina veterinária com foco no diagnóstico, prognóstico e monitoramento de enfermidades.

### 2.1 Aspectos Gerais da Diarreia

A diarreia representa a principal causa de morbidade e mortalidade em bezerras no período neonatal (WINDEYER et al., 2014). No Brasil, foram observadas prevalências de 62,75% e 68,9% em bezerras com sete e 14 dias de vida, respectivamente (NOVO et al., 2017). Em outro rebanho, Martin (2017) detectou prevalência de 92,8% em bezerras com idade entre 13 e 15 dias de vida.

A etiologia das diarreias é multifatorial, incluindo bactérias, vírus e protozoários. Os principais agentes causadores são *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Salmonella* spp. (COURA et al., 2015), *Rotavírus*, *Coronavírus* (AMMAR et al., 2014) e *Cryptosporidium parvum* (FAGUNDES et al., 2016).

A identificação do grupo etário apresentando diarreia pode apontar para a etiologia da enfermidade. Em um trabalho realizado na Nova Zelândia, os autores observaram que *C. parvum*, *Rotavírus* e infecções mistas estavam associados com o maior grau de aquosidade das fezes em bezerras com idade entre nove e 21 dias de vida (AL MAWLY et al., 2015). Em outro estudo realizado na Argélia, os autores verificaram que em bezerros com menos de 30 dias de vida a prevalência foi de 14,63% de infecções causadas por *Rotavírus* e 20,73% de infecções causadas pelo *Coronavírus* (AMMAR et al. 2014). Já as bactérias *Escherichia coli* e a *Salmonella* apresentaram associação com a diarreia em bezerros com até 70 dias de vida (COURA et al., 2015), sendo a *E. coli* um dos principais agentes causadores da enfermidade (HASHISH et al., 2016).

Descrita como o microrganismo que mais causa diarreia na primeira semana de vida, a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) consegue adentrar o organismo no período de colonização intestinal, que começa logo após o nascimento. As bactérias conseguem seguir para as porções mais caudais de acordo com o caminho realizado pela ingesta. Um dos antígenos mais associados com a diarreia em bezerras por ETEC é o K99 (MYERS; GUINÉE, 1976). Algumas características são fundamentais para entender a patogênese, a exemplo da necessidade de um pH menor que 6,5 para a expressão do antígeno K99, como ocorre no intestino delgado (FOSTER; SMITH, 2009).

Apesar de não ser uma causa comum, o fungo *Candida albicans* foi descrito como agente causador de diarreia em bezerras com 15 dias de vida (AZIMPOUR; POURTAGHI, 2016). Os mesmos autores relataram que tais agentes se apresentaram como patógenos oportunistas.

Além dos agentes etiológicos citados acima, os fatores de risco para a diarreia também são importantes, como a falha na transferência de imunidade passiva (FAGUNDES et al., 2016); tipo de alojamento; frequência de limpeza da área do parto; presença de doença respiratória (KLEIN-JÖBSTL; IWERSEN; DRILLICH, 2014). Em estudo realizado na Noruega, a diarreia na primeira semana de vida e entre oito e 30 dias de vida aumentou o risco de morte de bezerras em 2,4 e 2,9 vezes, respectivamente (GULLIKSEN et al., 2009).

A alteração na consistência das fezes, desidratação e desequilíbrios eletrolíticos e acidobásicos são os principais achados clínicos em bezerras com diarreias, sendo a causa mais comum de desidratação, devido à perda excessiva de fluido intersticial e nos espaços intracelulares, resultando em ressecamento e perda da elasticidade da pele, ressecamento de mucosas e enoftalmia. Animais desidratados podem apresentar-se ainda com sinais de depressão mental, decorrente da perda de volume sanguíneo, porém outros fatores podem estar associados com esta alteração, como a toxemia (CONSTABLE et al., 2016).

Além do mais, em animais com diarreia é comum observar a região perineal com coloração amarelo-esverdeada em decorrência do ressecamento das fezes liquefeitas. Nos órgãos, alterações como múltiplas hemorragias, presença de gases, gânglios linfáticos mesentéricos aumentados de volume, mucosa hiperêmica de órgãos como o abomaso, além de erosões e ulcerações (KALKANOV et al., 2016).

Como a desidratação e a alteração na consistência das fezes são as principais manifestações clínicas de bezerras com diarreia, é importante que os animais sejam monitorados e avaliados periodicamente, buscando identificar os casos iniciais e reduzindo assim as complicações ou mortes decorrentes da doença. Assim, a avaliação do escore das fezes para detecção da diarreia (Quadro 1) é um método prático, de baixo custo e que pode ser inserido na rotina da fazenda e que norteia o protocolo terapêutico a ser instituído (McGUIRK, 2008).

Durante a avaliação da consistência, amostras de fezes das bezerras são analisadas e classificadas como: normal (escore 0); pastosa/semi-formada (escore 1); pastosa com maior quantidade de água (escore 2) e líquida (escore 3). Os escores 0 e 1 são utilizados para classificar a ausência e os escores 2 e 3 para a presença de diarreia (McGUIRK, 2008).

Quadro 1 - Escores de fezes para a detecção de diarreia – São Paulo – 2018

<b>Escores das fezes</b>			
0	1	2	3
			
<b>Consistência das fezes</b>			
Normal: firme, coloração amarronzada, períneo e cauda limpos e secos	Pastosa/semi-formada	Pastosa com maior quantidade de água: conteúdo fecal aderido ao períneo e cauda	Líquida: aquosa, conteúdo fecal aderido ao períneo e cauda

Fonte: Escore GeCria adaptado de McGuirk (2008).

Em relação aos distúrbios osmóticos, as toxinas estáveis que também são apresentadas pela ETEC possuem relação direta com a adenosina monofosfato intracelular cíclico (AMPc). O aumento do AMPc está associado com a secreção de cloreto, que por sua vez, retira água para o lúmen intestinal, desencadeando a diarreia (FOSTER; SMITH, 2009).

O exame clínico e o histórico da fazenda são os principais métodos para o diagnóstico rápido da diarreia, no entanto testes laboratoriais são necessários para a confirmação dos agentes etiológicos. Os agentes etiológicos podem ser identificados

pelo exame microscópico das fezes em casos de infecção por *C. parvum* e coccídeos; cultura bacteriana; reação em cadeia da polimerase (PCR), principalmente na detecção de viroses e ELISA para a detecção de anticorpos específicos para determinados agentes. Para a identificação do *rotavírus*, pode-se utilizar o ELISA sanduíche, pois existem testes comerciais disponíveis (CHO; YOON, 2013).

Alguns testes rápidos auxiliam na detecção de determinados agentes como o teste 5 BIO K 306 para a detecção de *Rotavírus*, *Coronavírus*, *E. coli* F5, *Cryptosporidium* e *Clostridium perfringens* (BIOX Diagnostics, Bélgica).

## 2.2 Aspectos Gerais da Doença Respiratória

A Doença Respiratória Bovina (DRB) causa perdas significativas nos sistemas de produção. Poucos trabalhos apresentaram a prevalência de DRB em bovinos leiteiros no Brasil, no entanto, em bovinos confinados, esta enfermidade foi o maior problema em relação a morbidade e mortalidade, com taxas de 6,13% (11.577/188.862 animais) e 0,21% (397/188.862 animais), respectivamente. Em relação aos bovinos doentes, 86,9% (11.577/13.315) foram positivos para DRB (BAPTISTA et al., 2017).

Trabalhos realizados no sul do Brasil apresentaram maiores porcentagens de surtos de doença respiratória em bovinos de leite (54,5%, 18/33), quando comparado com os bovinos de corte (39,3%, 13/33) entre os anos 2000 a 2011 (BRASIL et al., 2013). Em outro estudo avaliando as principais enfermidades diagnosticadas na região sul do Rio Grande do Sul em bezerros com até um ano de vida e de diferenças raças, foi possível observar 16,8% (37/220) de afecções do sistema respiratório. Em bezerros com idade entre um e 90 dias de vida, a doença mais frequente foi a broncopneumonia (19,3%, 17/88); em bezerros com idade entre quatro a seis meses a prevalência foi de 16,5% (7/42); em bezerros com sete a nove meses foi de 9,3% (3/32) e entre 10 a 12 meses de vida a frequência foi de 9% (4/44) (ASSIS-BRASIL et al., 2013).

Os principais agentes primários da DRB são os Vírus da Rinotraqueite Infeciosa Bovina (BHV-1), Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), Vírus da Parainfluenza tipo 3 (PI3), Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) e Coronavírus.

Já as infecções secundárias são causadas pelas bactérias *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, e *Mycoplasma bovis* (WOOLUMS; AMES; BAKER, 2009). Em estudo com bezerros leiteiros, o *M. bovis* promoveu impacto significativo sobre a saúde e crescimento dos animais (FRANCOZ et al., 2015).

Alguns fatores de risco para DRB em bezerros foram descritos na literatura, tais como: época do nascimento, inadequada cura do umbigo, doenças manifestadas nas duas primeiras semanas de vida, falha na transferência da imunidade passiva e falta de controle térmico no alojamento pré-desmama (WINDEYER et al., 2014). Após a infecção e aquisição da doença os bezerros apresentam risco de óbito. A presença da DRB em bezerros na primeira semana de vida aumentou o risco de morte em 6,4 vezes, e o risco se mantém alto ao longo de todo o primeiro ano de vida dos animais (GULLIKSEN, et al., 2009).

Bezerros nascidos no inverno apresentaram maior chance de morte (*Odds Ratio* = 1,2). Além disso, o tipo de alojamento do nascimento (*Free stalls em relação ao tie stalls*) e a criação das bezerras em grupo promoveram maior risco de morte quando comparado às bezerras criadas em baias individuais. O tamanho da criação também pode ser um fator determinante; no trabalho realizado na Noruega por Gulliksen et al. (2009), verificou-se que quanto maior o tamanho do rebanho leiteiro, maior foi a taxa de mortalidade.

Os bezerros após o nascimento passam por um constante desafio de adaptação do sistema imunológico. A imunidade predominante nos primeiros dias de vida, considerando um bezerro com adequada colostragem, é a humoral via anticorpos maternos, denominada de imunidade passiva (CHASE, 2018). A meia vida destes anticorpos depende de fatores como a concentração de colostro ingerida e absorvida, variando de 21,2 a 35,9 dias após o nascimento para os diferentes vírus - BVDV1a, BVDV1b, BVDV2, BoHV-1, PI-3V, e BRSV (FULTON et al., 2004).

Após a diminuição da concentração sanguínea dos anticorpos colostrais maternos, o sistema imune do bezerro é desafiado para uma produção própria de anticorpos, deixando de ser passiva e passando a ser uma imunidade ativa. A transição entre a imunidade passiva e ativa é considerada como uma janela imunológica, devido à imaturidade do sistema imunológico dos bezerros frente ao reconhecimento de patógenos. Neste período observa-se maior número de casos de DRB, entre 1 a 90 dias de vida (ASSIS-BRASIL et al., 2013).

A observação de taquipneia, dispneia mista, tosse, sons submaciços ou maciços à percussão do campo pulmonar e a auscultação de áreas aumentadas de ruído traqueobrônquico, broncobronquiolar rude e área de silêncio pulmonar são as manifestações clínicas mais específicas de comprometimento do parênquima pulmonar (GONÇALVES, 2001). A secreção nasal pode ou não estar presente conforme a quantidade de exsudato nos bronquíolos e a existência ou não de inflamação do trato respiratório superior (GONÇALVES, 2001).

Os achados clínicos incluem ainda inapetência, depressão, febre, relutância em se movimentar e evidência de dor torácica que pode estar associada à pleurite concomitante (RADOSTITIS et al., 2000).

Alguns métodos de diagnóstico de DRB foram descritos na literatura. Os métodos descritos levaram em consideração os sinais clínicos apresentados pelas bezerras quando doentes. Parâmetros como a tosse, secreção nasal e ocular, posicionamento de orelhas e temperatura corpórea foram categorizados em escala de 0 (zero) a quatro, de acordo com a severidade das alterações. Após a avaliação de todos os parâmetros, realiza-se um somatório, sendo que a soma  $\geq 5$  é considerada positiva para a DRB, somatório 4 é considerado suspeito e menor que 4 negativo para DRB (Quadro 2). Este escore foi classificado como Escore de Wisconsin - WI (McGUIRK, 2008).

Em outro sistema de avaliação de doença respiratória, denominado Escore da Califórnia - CA, os autores analisaram os seguintes parâmetros: tosse espontânea, presença de secreção nasal, secreção ocular, posicionamentos de orelhas e cabeça alterados, temperatura retal  $> 39,2^{\circ}\text{C}$ , padrão respiratório anormal. Para cada parâmetro usou-se a classificação positivo ou negativo, atribuindo-se uma pontuação. Após a realização do somatório, bezerras com pontuação  $\geq 5$  são consideradas como portadoras de doença pulmonar e  $\leq 4$  como negativas.

Quadro 2 - Escore para a detecção da Doença Respiratória Bovina – São Paulo – 2018

Escore	0	1	2	3
Temperatura retal	37,7-38,2°C	38,3-38,8°C	38,9-39,3°C	≥39,4°C
Tosse	Ausente	Presente e única quando estimulada	Presente e repetidas, estimuladas ou ocasionais	Presente, repetidas e espontâneas
Secreção Nasal	Serosa 	Seromucosa, unilateral 	Mucopurulenta, bilateral 	Purulenta, bilateral 
Secreção Ocular	Serosa 	Pouca quantidade 	Moderada quantidade 	Intensa quantidade 
Posição de orelhas e cabeça	Normal 	Balançar das orelhas ou cabeça 	Ligeiramente pendente, unilateral 	Pendente intensamente, bilateral ou torção da cabeça 

Fonte: Escore GeCria adaptado de Poulsen; McGuirk, (2009).

O índice de concordância entre os escores de WI e CA foi de 0,85, indicando uma excelente concordância (ALY et al., 2014). A acurácia do escore WI foi testada ainda com base na ultrassonografia dos pulmões em bezerras da raça Holandesa antes do desmame. Os autores observaram sensibilidade de 62,4% e especificidade de 74,1%, e ressaltaram que tais valores deveriam ser levados em consideração no momento do diagnóstico da DRB em bezerras, uma vez que poderiam ocorrer resultados falsos negativos (BUCZINSKI; OLLIVETT; DENDUKURI, 2015).

Outras metodologias para a detecção de DRB foram destacadas frente ao diagnóstico precoce em bovinos confinados, tais como: uso da haptoglobina (WOLFGER et al., 2015), monitoramento contínuo automático da tosse (VANDERMEULEN et al., 2016), temperatura retículo ruminal (TIMSIT et al., 2011), medições do consumo de ração, mudanças no comportamento do gado e termografia infravermelha (SCHAEFER et al., 2012; WOLFGER et al., 2015).

Alguns autores descreveram que nos casos confirmados de DRB, as bezerras apresentaram sinais clínicos de doença respiratória e temperatura  $>39,5^{\circ}\text{C}$  (WOLFGER et al., 2015). Para outros autores, animais com DRB apresentavam valores  $\geq 5$  no sistema de escore de WI, contagem de células sanguíneas indicando leucocitose e auscultação torácica com alterações no padrão pulmonar (JOSHI et al., 2018). Schaefer et al. (2007) seguindo metodologia descrita por Humblet et al. (2004), definiram casos positivos quando os animais apresentaram duas ou mais alterações nos seguintes sintomas: temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  ou mais, leucócitos totais abaixo de 7.000 ou maior que 11.000 céls/ $\text{mm}^3$ , um escore clínico de 3 ou mais (Usando a letargia, sinais respiratórios e diarreia) e uma razão de neutrófilos/linfócitos menos que 0.1 ou maior que 0.8.

A falta de um padrão-ouro para a detecção de DRB tem sido um problema no desenvolvimento de pesquisas nessa área (ABDALLAH et al., 2016; BUCZINSKI et al., 2018). O diagnóstico *post-mortem* foi sugerido como uma metodologia de potencial para um padrão-ouro, no entanto, altos custos e restrições do comitê de ética limitaram esta metodologia (WOLFGER et al., 2015). Outra avaliação de grande importância na detecção dos quadros de DRB foi a ultrassonografia dos pulmões (BUCZINSKI et al., 2015; BUCZINSKI et al., 2018).

As diferentes metodologias podem refletir em diferentes resultados e, pesquisas futuras poderão estabelecer parâmetros de fácil diagnóstico e com melhor acurácia na identificação dos casos de DRB em bovinos (ABDALLAH et al., 2016; JOSHI et al., 2018; WOLFGER et al., 2015).

### 2.3 Proteínas de fase aguda: estímulo, mecanismo de ativação e funções

Nas últimas décadas tem se intensificado os estudos com as proteínas de fase aguda (PFA), sendo consideradas como biomarcadoras úteis no diagnóstico, prognóstico e monitoramento de enfermidades (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2001).

As PFA podem ser classificadas como positivas e negativas. A haptoglobina (Hp), ceruloplasmina (Cp), alpha1-glicoproteína ácida (AGA), amiloide A sérica (AAS) e a proteína C reativa (PCR) são proteínas de fase aguda positivas. As suas concentrações aumentam diante de enfermidades (alterações inflamatórias e infecciosas). Já a albumina e a transferrina são consideradas PFA negativas, com diminuição da concentração sérica nos episódios descritos anteriormente (MURATA et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 2007; ECKERSALL; BELL, 2010; TÓTHOVÁ et al., 2011). A concentração é diretamente proporcional ao grau de lesão tecidual e/ou de inflamação (CERÓN; ECKERSALL; MARTYNEZ-SUBIELA, 2005).

Dependendo do processo instalado, as PFA positivas são classificadas de acordo com a intensidade de elevação da concentração plasmática, tempo para elevação máxima e período para retorno aos valores basais, como sendo de intensidade elevada ou altamente sensíveis, moderadas ou fracas, sendo estas variações também dependentes da espécie animal.

Por definição, uma proteína de fase aguda sensível deve ter concentrações baixas em animais saudáveis, aumentando rapidamente para valores superiores a dez vezes em relação ao basal e diminuindo o mais rápido possível frente a uma melhora do quadro clínico. As proteínas de fase aguda moderadas, dependendo do tipo de ativação se elevam de 1 a 10 vezes de seus níveis basais, porém levam de 24 a 48 horas para atingir sua concentração máxima e demoram para retornar aos níveis basais de normalidade. Para as PFA de fraca intensidade, o seu valor basal eleva de 50 a 100 vezes, com tempo de resposta de 48 a 72 horas e diminui mais lentamente do que as outras PFA após a remissão do processo. Na espécie bovina a amiloide a sérica (AAS) e Hp são citadas como as PFA mais sensíveis (CRAY et al., 2009; ECKERSALL; BELL, 2010).

Em muitos trabalhos verificou-se que a AAS apresentou maior sensibilidade quando comparada com a Hp. Em casos de DRB em bezerras, a concentração da Hp

pode aumentar cerca de 18 vezes quando comparada ao grupo de animais saudáveis, enquanto a AAS apresentou aumento de três vezes (TÓTHOVÁ et al., 2012).

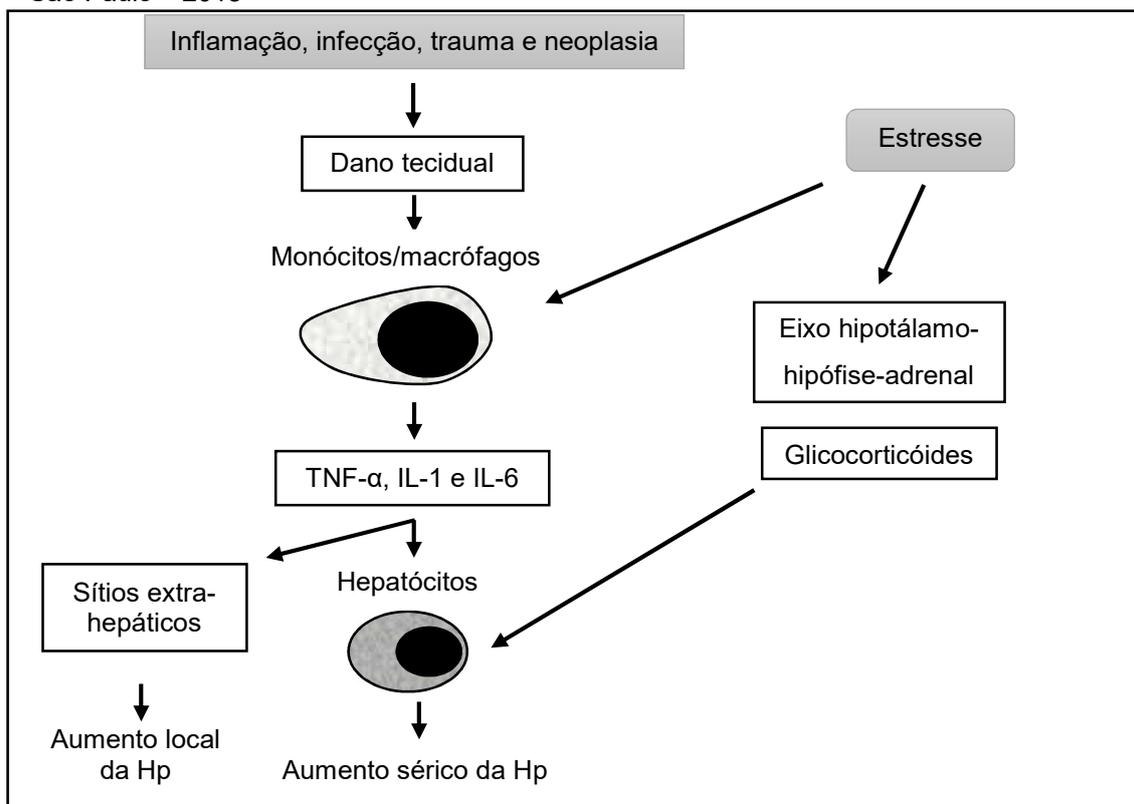
Em alguns estudos, a Hp foi descrita como a PFA mais importante na detecção de doenças em bovinos, em relação à outras proteínas (TÓTHOVÁ et al., 2012; JOSHI et al., 2018), podendo ser um marcador preditor de doenças (GÂNHEIM; ALENIUS; WALLER, 2007). Já a AAS, proteína com grande sensibilidade à estimulação, fica sujeita à variações por fatores diversos como o estresse (ALSEMGEEST et al., 1995; GÂNHEIM; ALENIUS; WALLER, 2007), enquanto que a Hp não apresentou variações na presença de estresse físico ou ambiental (ALSEMGEEST et al., 1995).

A ativação das proteínas de fase aguda (PFA) está intimamente relacionada com o mecanismo de reconhecimento de patógenos pelo sistema imune inato. Este evento de ativação ocorre após a quebra da barreira física de proteção, muco protetor, mucosas e pele (TIZARD, 2008).

Após a quebra desta barreira, o sistema imune é ativado. Os diferentes microrganismos possuem diferentes moléculas que por sua vez diferenciam os tipos de respostas imunológicas, tais moléculas são denominadas de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). O reconhecimento dos padrões é feito principalmente por células dendríticas, monócitos e macrófagos, células mononucleares, por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), moléculas localizadas na membrana celular destas células. Um dos mais importantes receptores é o da família "Toll-like" (TIZARD, 2008).

Após a ligação dos PAMPs com os PRRs, ocorre a expressão intracelular do fator de transcrição (NF-Kb), importante via de sinalização para respostas imunológicas que constitui uma família de cinco fatores de transcrição fundamentais na inflamação e na imunidade. Estes fatores de transcrição estimulam a síntese das citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Estas citocinas estimulam o fígado a produzir as PFA (Figura 1), especialmente haptoglobina nos bovinos (TIZARD, 2008; BODE et al., 2012). O estresse também pode estimular a síntese de Hp por duas vias, estimulando os macrófagos e/ou o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, ocasionando na produção de glicocorticóides, que por sua vez estimulam os hepatócitos na síntese de PFA (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

Figura 1 - Desencadeamento da resposta de fase aguda, com os diferentes tipos de estimulação – São Paulo – 2018



Fonte: adaptado de Martínez-Subiela et al., (2001); Murata, Shimada, Yoshioka (2004), por Ramos (2018).

O fígado é o principal órgão produtor de Hp (YANG et al., 1995), no entanto, a glândula mamária, assim como outros tecidos expressam genes capazes de produzir tal proteína (HISS et al., 2004).

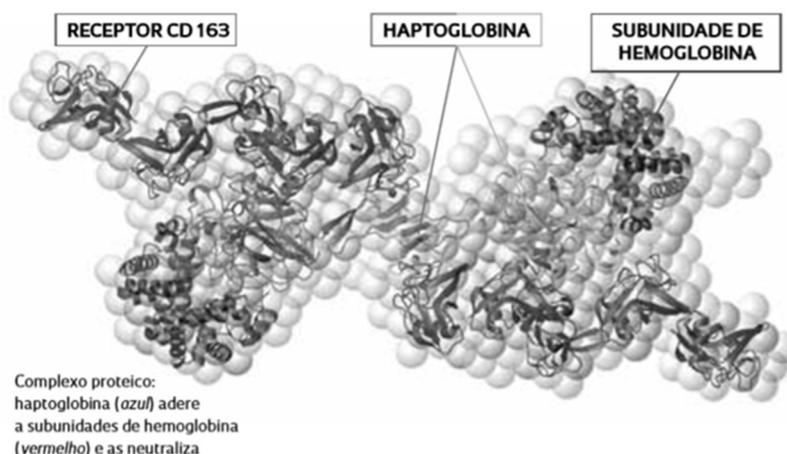
A Hp é uma glicoproteína com massa relativa (Mr) de 100.000 Da, que migra na região alfa-2 globulina na eletroforese. A molécula é composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta; a subunidade alfa tem um peso molecular de 16 a 26 kDa e a subunidade beta de 35 a 40 kDa. As subunidades se combinam na forma de uma cadeia tetramérica  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ . A Hp humana tem três subtipos devido ao seu polimorfismo genético: Hp 1-1, Hp 1-2, Hp 2-2. Nos animais o tetrâmero de Hp tem notável diferença: em carnívoros e onívoros é semelhante a Hp 1-1 humana, enquanto que nos bovinos tem similaridades à Hp 2-2 (MORIMATSU et al., 1991; TSENG et al., 2004; YUEH et al., 2007).

Uma importante habilidade da Hp é a afinidade de ligação com a hemoglobina. Ambas proteínas se ligam formando complexos, descritos como Hp-Hb. Em casos com altas concentrações de Hb, um número grande de complexos é formado. Mecanismos de varreduras pelos macrófagos são acionados para evitar os efeitos

danosos pelas substâncias geradas na degradação da hemoglobina na circulação. O receptor CD163 da Hp tem papel fundamental no reconhecimento dos complexos pelos macrófagos (Figura 2), retirando-os da circulação (ANDERSEN, 2012).

Devido a essa ligação com a hemoglobina livre na circulação, a Hp desempenha um mecanismo natural de defesa do organismo com funções bacteriostáticas, evitando o uso do ferro presente na hemoglobina pelas bactérias, indisponibilizando este mineral aos microrganismos que dele necessitam para a proliferação (EATON et al., 1982).

Figura 2 - Estrutura molecular da Hp, com as respectivas subunidades e receptores – São Paulo – 2018



Fonte: Andersen et al., (2012)

Quaye (2008) descreveu a importância da função antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora da Hp. As funções antioxidante e anti-inflamatória específicas podem estar ligadas a processos como a ativação de neutrófilos e inibição da ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX).

Após injúrias teciduais, as células do sistema imune sintetizam citocinas e ativam cascatas imunológicas. Na ativação da resposta imunológica ocorre a migração de neutrófilos, exercendo papel fundamental na fagocitose de antígenos no sítio da infecção. Pesquisas sugerem que células mielóides expressam genes responsáveis pela síntese de Hp, assim como os hepatócitos. Nestas células, um estoque de Hp é feito em grânulos e liberado após ativação de neutrófilos. A Hp derivada de células mielóides promove a redução dos danos teciduais pelo controle

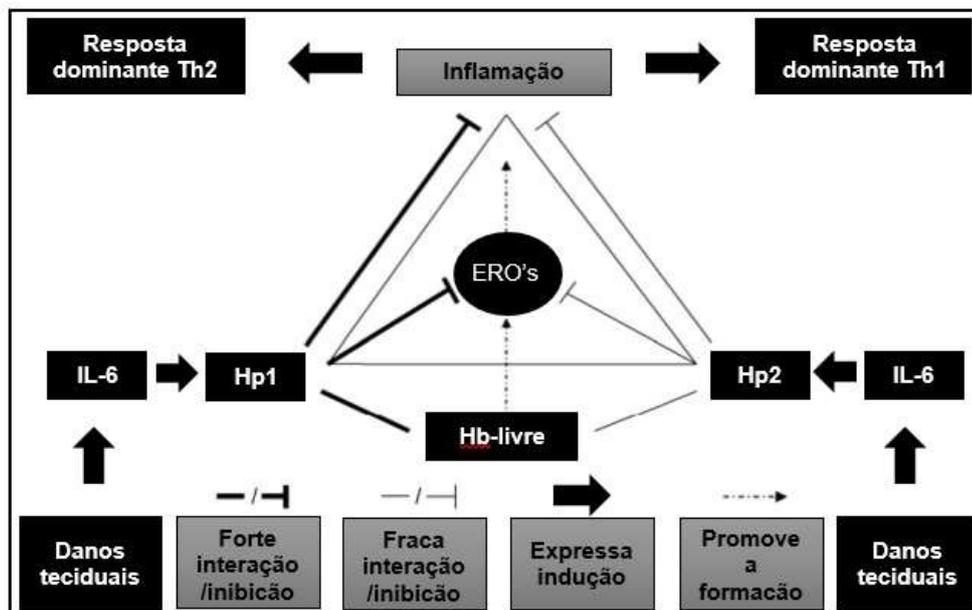
do crescimento bacteriano local, além da sua função anti-inflamatória (THEILGAARD-MÖNCH et al., 2006).

As enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) atuam em processos inflamatórios, sintetizando produtos da inflamação, como as prostaglandinas e leucotrienos. A LOX participa do processo de oxidação de lipídeos que leva a formação de radicais livres. Com propriedade anti-inflamatória e antioxidante, a Hp tem papel na inibição das enzimas COX e LOX, auxiliando na inibição do processo inflamatório e de oxidação lipídica (QUAYE, 2008). A Hp frente a oxidação da hemoglobina promove uma relação: quanto maior a concentração de Hp, maior é a sua atividade anti-oxidante (GUTTERIDGE, 1987).

Cita-se ainda, o efeito imunomodulador da haptoglobina (CRAY et al., 2009). Estudo em camundongos com deficiência de Hp demonstrou atrofia dos órgãos linfoides com pequena quantidade de células maduras B e T no sangue e em compartimentos linfoides secundários. Os camundongos apresentaram redução na resposta imunológica adaptativa, observada pela baixa produção de anticorpos IgG após a imunização com adjuvantes e antígenos (HUNTOON et al., 2008). Além disso, estudos recentes têm demonstrado que a Hp exerce função moduladora das respostas Th1 e Th2, promovendo uma resposta predominante Th1 mediada pela produção e inibição de citocinas (ARREDOUANI et al., 2003).

Os diferentes tipos de Hp promovem diferentes respostas, a Hp 1-1 promove uma redução na geração de ERO's, com potencial antioxidante, ligação com a Hb e função anti-inflamatória, reparando e diminuindo a resposta Th2. Já a Hp 2-2 aumenta o estresse oxidativo e permite a persistência do estímulo inflamatório, levando à uma resposta Th1. Na modulação, a Hp se liga à hemoglobina e diminui a liberação de ERO's (Figura 3). Apesar dos avanços nas pesquisas, alguns autores relataram a necessidade de maiores estudos voltados para a Hp em relação à modulação de respostas imunológicas (HUNTOON et al., 2008).

Figura 3 - Importância da Hp na modulação das respostas imunológicas – São Paulo – 2018



Fonte: adaptado de Quaye (2008); por Ramos (2018)

## 2.4 Hp como biomarcador de doenças

### 2.4.1 Haptoglobina como biomarcador de diarreia

Sabe-se que a diarreia promove efeito significativo sobre a concentração de Hp, e que os valores desta proteína estão associados com as sintomatologias clínicas da doença (ALBAYRAK; KABU, 2016). Deignan et al. (2000), avaliando bezerras com infecção experimental por *Salmonella* verificaram que a concentração da haptoglobina aumentou conforme a severidade da diarreia, determinada por sistema de escores: 1 – fezes normais (firmes, bem formadas); 2 – diarreia moderada (fezes fluidas com coloração anormal); 3 – diarreia severa (aquosa, fezes em jatos).

Correlação significativa dos escores de fezes com a Hp também foi encontrada por Pourjafar et al. (2011) em estudo adotando classificação similar à de Deignan et al. (2000). Os autores afirmaram que as proteínas Hp e AAS são indicadores confiáveis da gravidade da diarreia.

Associações de patógenos promovem diferentes respostas frente ao sistema imune, fato observado pelos maiores valores de Hp em infecções por Rotavírus +

*Cryptosporidium* ou Coronavírus + *Cryptosporidium*, em relação à infecções isoladas causadas apenas por Rotavírus ou Coronavírus. A infecção por ETEC K99 também promoveu aumento nos valores de Hp (POURJAFAR et al., 2011).

Em outro estudo realizado em bezerros com diarreia, a intensidade da doença foi classificada em quatro categorias, a seguir: 1 – normal (fezes normais); 2 - pastosa (fezes sem forma); 3 – escorrendo (fezes espalhando facilmente) e 4 – líquida (fezes desprovidas de matéria sólida). Os escores 3 (diarreia moderada) e 4 (diarreia severa) foram considerados como positivos. Neste estudo a desidratação também foi avaliada, por meio da formação da prega cutânea na porção lateral da região cervical e mensuração do tempo de retorno da pele à sua posição normal, utilizando as seguintes categorias: desidratação suave, desidratação moderada e desidratação severa. Bezerros com diarreia tinham maiores valores de Hp (0,27 g/L) quando comparado aos sadios (0,09 g/L), além disso, bezerros com diarreia e desidratação severa tinham concentração de Hp maior (0,43 g/L), quando comparado com diarreia suave (0,22 g/L) e moderada (0,27 g/L). Entre os bezerros com fraca e moderada desidratação não houve alterações no perfil sérico da Hp e AAS (HAJIMOHAMMADI et al., 2013).

Por outro lado, Tóthová et al. (2012) apresentaram resultados apontando que o valor da Hp em animais com diarreia não diferiu dos animais saudáveis, entretanto, neste estudo foi utilizado um baixo número de amostras (n=10), além de uma ampla faixa etária contemplada (duas semanas e seis meses). Sabe-se que o sistema imunológico dos bovinos sofre grandes transformações entre o período neonatal, a puberdade e a idade adulta, refletindo diretamente na função das células e seus produtos (ORRO et al., 2008; KILPI, 2015).

Outros autores compararam bezerras sem diarreia, bezerras com diarreia sem determinação do agente etiológico e bezerras com diarreia causada por *Rotavírus*. Após o início da detecção da doença, amostras foram coletadas em um intervalo de 24 horas até o final da manifestação dos sinais clínicos. A Hp não apresentou variações quanto aos grupos experimentais, no entanto, o estudo descreveu a importância da utilização da ceruloplasmina na detecção de diarreias causadas por *Rotavírus* (ROCHA et al., 2016).

Parasitas nematódeos podem causar diarreias em bezerros, obstruções intestinais e até mesmo migração de larvas para as vias aéreas ocasionando pneumonia verminótica (SILVA et al., 2015). Em um estudo que avaliou bezerros com

idade entre um e três meses de idade, verificou-se que a haptoglobina, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e malondialdeído sérico apresentavam-se aumentados, enquanto a albumina, proteína total, ferro e glutatona redutase diminuíram em animais infectados com *Toxocara vitulorum*, indicando uma resposta de fase aguda (BOZUKLUHAN et al., 2017).

Seppä-Lassila et al. (2015), avaliando 100 bezerros com idade entre 15 a 60 dias de vida na Finlândia, observaram taxa de diarreia de 32,6%, com detecção de *Eimeria (bovis, zuernii e alabamensis)* em 42,4% das amostras. Os animais foram classificados como sem sinais de eimeriose; sinais fracos; moderados e fortes. Com resultado diferente do esperado, os autores observaram que bezerras com sinais fracos de eimeriose apresentavam valores menores de Hp (0,2 g/L) em relação aos animais sem sinais de eimeriose (0,1 g/L). Os autores justificaram que o mecanismo de varredura da hemoglobina pela Hp devido às injúrias hemorrágicas causadas pela *Eimeria* poderia ter promovido a redução na concentração sérica da Hp observada.

Conforme os resultados obtidos nos estudos, pode-se considerar que existe uma grande variação entre a resposta imunológica de bezerras com diferentes idades e o impacto dos diferentes patógenos sobre o desencadeamento de uma resposta imunológica, ocasionando uma diarreia. Entretanto, o que não foi avaliado até o momento é qual a sensibilidade da Hp na detecção de casos de diarreia em diferentes idades, com diferentes patógenos e com diferentes tipos de proteínas.

#### **2.4.2 Haptoglobina como biomarcador de DRB**

A DRB promove aumentos significativos sobre a concentração de Hp (ANGEN et al., 2009; TÓTHOVÁ et al., 2012; JOSHI et al., 2018). Adotando-se quatro categorias para classificar a presença de secreção nasal, pelo escore adaptado de WI, foi possível verificar a associação das alterações com a concentração de Hp, observada pela interação significativa da doença com a idade, pois a concentração de Hp aumentava em bezerras mais velhas (MURRAY et al., 2014). Diante de outras enfermidades, como a diarreia e a onfalite, a DRB promoveu os maiores aumentos nos valores de Hp (TÓTHOVÁ et al., 2012).

Dudek et al. (2010) desafiaram com *Mycoplasma bovis* 12 bezerras com idade entre quatro a oito semanas de vida. Dois grupos foram formados, controle e experimental. As fêmeas foram avaliadas em cinco momentos: um dia antes do desafio e três, cinco, sete e nove dias após. Os autores observaram aumento significativo na concentração de Hp e AAS e sugeriram ativação efetiva da resposta de fase aguda. A concentração de Hp foi diferente nos momentos três (grupo experimental = 0,075 g/L e controle= 0,045 g/L), cinco (grupo experimental = 0,059 g/L e controle= 0,051 g/L) e sete (grupo experimental = 0,108 g/L e controle= 0,053 g/L).

O efeito da diarreia viral bovina (BVDV) e *Manhemmia* sobre a concentração sérica das PFA foi avaliado, por meio da inoculação de uma cepa do BVDV não citopático do tipo 1 e cepa de *Manhemmia haemolytica* Ab 35, isolada de um lavado traqueobrônquico de um bezerro com sinais clínicos de pneumonia, em bezerros com idade variando entre nove e 18 semanas de vida. Foi possível observar aumento na concentração sérica de Hp em bezerras inoculadas com ambos os vírus, apresentando valores de 0,65 a 2,24 g/L, quando comparado com o grupo controle (<0,05 g/L), sugerindo-a como importante marcador para avaliação da saúde em rebanhos. Além disso, os autores descreveram que a duração das respostas das PFA dos diferentes grupos (infectados com BVDV, *Manhemmia* e BVDV + *Manhemmia*), foram equivalentes entre as proteínas em questão (GÂNHEIM et al., 2003).

A *Manhemmia* promove diferentes alterações no organismo das bezerras. Após quatro horas de inoculação por via intrabronquial foi possível observar os seguintes sinais clínicos: apatia, respiração abdominal, alteração dos ruídos respiratórios, hipertermia, elevação das frequências cardíaca e respiratória e arritmia cardíaca. No exame histopatológico foi possível encontrar lesões de pneumonia fibrinosa hemorrágica (FAGLIARI, 2003).

Outro importante vírus causador de doença respiratória, o Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV), foi testado frente à indução das proteínas Hp e AAS. Verificou-se um intenso aumento nas concentrações séricas destas proteínas, com valores de Hp variando entre 8 a 10,0 g/L no pico da doença, sendo o valor <0,02 g/L obtido no grupo controle; e valores de AAS entre 60 a 80 mg/mL encontrados no pico da doença, e valores abaixo de 17 mg/mL no grupo controle (HEEGAARD et al., 2000). O pico para ambas as proteínas foi próximo do oitavo dia após a infecção, o comportamento da Hp acompanhou as alterações clínicas dos animais (HEEGAARD

et al., 2000). No entanto, outros autores afirmaram que a AAS foi descrita como um marcador mais sensível para infecções respiratórias (ORRO et al., 2011).

Em outro estudo, após inoculação de *Dictyocaulus viviparus* nos pulmões de bezerras, Gånheim, Höglund e Waller (2004) observaram que diferentes doses (250 larvas no estágio de desenvolvimento 3 - L3 por dois dias consecutivos, 100 larvas L3 por cinco dias consecutivos e 2000 larvas L3 em uma única vez), induziram aumento na concentração de Hp, AAS e fibrinogênio, assim como aumento na contagem de eosinófilos, quando comparado com o momento inicial do estudo. Os autores sugeriram que a elevação na concentração de PFA e o aumento no número de eosinófilos em animais com DRB poderia indicar infecção pulmonar parasitária, podendo auxiliar na escolha do tipo de tratamento. Por outro lado, vale ressaltar que animais com verminoses pulmonares também podem apresentar concentrações normais ou baixas de Hp.

O monitoramento da DRB com o uso da Hp é importante tanto para a detecção quanto para o tratamento em bezerras, uma vez que em casos naturais de infecção os valores de Hp e AAS diminuem após o tratamento, enquanto que os valores de albumina aumentam (JOSHI et al., 2018).

Burciaga-Robles et al. (2009) avaliaram a aplicabilidade da Hp no diagnóstico de DRB em novilhas no momento da chegada aos confinamentos. Os autores verificaram que a concentração de Hp não foi elucidativa na previsão da ocorrência de DRB e apontaram que um melhor entendimento da doença em si, da origem fisiológica dos biomarcadores e mudanças fisiológicas que podem ocorrer durante a ocorrência da doença poderiam ser úteis no desenvolvimento de marcadores mais específicos para a DRB. Além disso, os autores destacaram que a elaboração de modelos usando um conjunto de variáveis poderia aumentar a habilidade de predição da doença.

#### **2.4.3 Haptoglobina como proteína preditora ou biomarcador de outras enfermidades**

A onfalite promove aumentos na concentração de Hp, porém apesar dos valores maiores que os animais do grupo controle, resultados significativos não foram

encontrados (TÓTHOVA et al., 2012), por outro lado aumentos significativos foram encontrados por Seppä-Lassila et al., (2015). No entanto, os aumentos na concentração de Hp em animais com onfalite foram inferiores quando comparados com os aumentos na concentração de Hp em bezerras com doenças respiratórias (TÓTHOVA et al., 2012; SEPPÄ-LASSILA et al., 2015). Outros estudos descreveram a importância da sensibilidade da Hp e da ceruloplasmina em animais com onfaloflebite, mastite estafilocócica e fotossensibilização hepatógena (SIMPLÍCIO et al., 2013).

Alguns trabalhos destacaram o uso da Hp no diagnóstico de doenças em relação a morbidade e mortalidade. Murray et al. (2014) mostraram que a concentração de Hp nas primeiras semanas de vida dos bezerros estava associada com maior risco de morte. A detecção tardia das diarreias e DRB acarretaram em uso prolongado de antimicrobianos, aumento da taxa de recorrências da doença, sequelas no trato respiratório (perda de parênquima e abscesso), além do impacto negativo no desempenho, produção de leite, reprodução e longevidade (McGUIRK, 2008).

A Hp tem sido utilizada em muitos estudos em bezerros comparando diferentes respostas inflamatórias. Ballou et al. (2013) demonstraram a importância da anestesia e analgesia em procedimentos como a castração e descorna sobre o perfil inflamatório de bezerros com três meses de vida. A castração e a descorna promoveram alterações na concentração de Hp, além disso, apresentou-se alta em animais sem analgesia. O uso da analgesia promoveu diminuição nas respostas inflamatória (Hp) e supressão dos leucócitos.

O uso de vitaminas e suplementos tem promovido indução de resposta de fase aguda em bovinos (KIM et al., 2011; KRUEGER et al., 2014). Após suplementação com levedura hidrolisada, bezerras com dois dias de vida apresentaram maior concentração de Hp com um e três dias após a suplementação, além de maior quantidade de IgA específica para bactérias e vírus cinco dias após. O grupo controle apresentou neutropenia, linfocitose e trombocitopenia, por outro lado, houve maior porcentagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> dois dias após a suplementação (KIM et al., 2011).

Leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* contêm produtos da parede celular, as manoproteínas e beta-glucanas, que podem melhorar o desempenho e a saúde dos animais. Importantes resultados foram descritos em relação à indicadores imunológicos e bioquímicos em bezerros, como o aumento na concentração de

gamaglobulinas, atividade da ceruloplasmina, resposta proliferativa dos linfócitos e atividade de fagócitos (KIM et al., 2011; WÓJCIK, 2014).

#### **2.4.4 Otimização do uso da haptoglobina como biomarcador**

Estratégias para a utilização da Hp devem ser utilizadas, sabendo-se que a mesma pode variar de acordo com a idade, tipo de técnica e doença. A concentração sérica da Hp foi observada no período neonatal em sete bezerros clinicamente saudáveis, com o seguinte delineamento: dia 0 (zero) - sem ingestão do colostro e 1, 2, 7, 14, e 30 dias de vida (TÓTHOVÁ et al., 2015). Os autores observaram baixa concentração da PFA após o nascimento e aumento gradativo nos momentos posteriores, isto é, com 7, 14 e 30 dias de vida, e ainda sugeriram que a ingestão do colostro poderia estar associada com as elevações séricas das PFA. Por outro lado, estas variações poderiam ser justificadas pela imaturidade hepática ou do sistema imunológico do neonato (KILPI, 2015).

Em outro estudo avaliando o comportamento de proteínas de fase aguda no primeiro mês de vida de bezerras Holandesas, os autores afirmaram que o comportamento da ceruloplasmina, haptoglobina e proteínas de peso moleculares 33 kDa e 23 kDa nos primeiros dias de vida foram influenciadas pela ingestão de colostro e/ou nascimento (ROCHA et al., 2013).

O uso da haptoglobina como um biomarcador para triagem e detecção precoce de doenças em bezerras pode ser uma estratégia extremamente importante para prevenir perdas a curto e longo prazo (MURRAY et al., 2014). As PFA podem ser utilizadas na detecção de doenças subclínicas. Gånheim, Alenius e Waller (2007) observaram que muitos bezerros tinham concentração elevada de PFA no grupo com baixa ocorrência de doenças, indicando a possível existência de doenças subclínicas.

Joshi et al. (2018) descreveram que biomarcadores do estresse oxidativo poderiam auxiliar na detecção de doenças e melhorar a acurácia da Hp. A identificação do estresse oxidativo estaria relacionada à maiores valores de Hp e à uma forte associação com a presença de doença respiratória. Esta associação promoveu diminuição dos falsos positivos e negativos e aumentaram a sensibilidade e especificidade da avaliação.

Estabelecer o ponto de corte, sensibilidade e especificidade da Hp na detecção de doenças é de grande importância. Svensson, Liberg e Hultgren (2007) determinaram diferentes pontos de corte para Hp em relação à DRB, definida quando houve a manifestação de tosse ou espirros por mais de dois dias seguidos, com severa alteração nos ruídos respiratórios junto com tosse e/ou secreção nasal. Foi utilizado o Kit comercial (*PHASE Range Haptoglobin Assay Kit*) com nível de detecção de 0,05 g/L. O melhor ponto de corte neste estudo foi com 0,15 g/L em bezerras, com sensibilidade de 64% e especificidade de 71%. Os autores descreveram a importância da utilização da Hp associada com a temperatura >39,5°C como uma ferramenta valiosa na detecção de doenças a nível de rebanho. Por fim, ressaltaram a necessidade de mais estudos para confirmar a validade do teste.

Os pontos de corte de 0,02 g/L (ECKERSALL; BELL, 2010); 0,05 g/L (SVENSSON; LIBERG; HULTGREN, 2007) e 0,06 g/L (GELSINGER et al., 2016) foram descritos para a Hp em bezerros saudáveis. Diferentes técnicas podem emitir resultados com diferentes valores, portanto, faz-se necessária a avaliação dos pontos de corte com base na técnica. Por outro lado, estudos que possuem limite de detecção acima de 0,02 g/L podem comprometer a utilização da proteína, pois valores acima deste limite são encontrados em bovinos com sinais de alterações inflamatórias (ECKERSALL; BELL, 2010).

A acurácia da utilização das PFA na detecção da DRB foi avaliada utilizando trabalhos realizados entre os anos de 1946 a 2015, com total de 314 estudos (ABDALLAH et al., 2016). Os autores concluíram que não foi possível avaliar a acurácia das PFA (Hp, AAS e Fibrinogênio) frente aos casos de DRB, uma vez que existia uma grande inconsistência entre os resultados dos estudos selecionados. Além disso, sugeriram relatórios de estudo sobre os testes de diagnóstico. Importante ressaltar ainda que a definição de DRB não é padronizada, fator este que dificultou a revisão sistemática.

Todos os fatores acima elucidam a importância de novos estudos com PFA na medicina veterinária com foco na aplicabilidade das proteínas em rotinas de diagnóstico em fazendas. No entanto, a padronização de resultados na literatura, metodologias de fácil acesso, precisas e definições da doença ainda são necessárias para uma melhor acurácia nos resultados e posterior utilização no diagnóstico, monitoramento e prognóstico de enfermidades.

### 3 OBJETIVOS

A hipótese deste estudo é que a Hp avaliada por técnica espectrofotométrica apresenta boa sensibilidade e especificidade quando utilizada para a detecção de onfalite, diarreia e DRB.

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar o uso da haptoglobina como biomarcador de doenças em bezerras Holandesas nos primeiros dias de vida. Os objetivos específicos foram: (1) estabelecer a ocorrência de onfalite, diarreia e DRB nos primeiros 41 dias de vida, (2) apresentar o comportamento da Hp neste mesmo período (3) determinar os parâmetros de performance da Hp frente à detecção de doenças em bezerras Holandesas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, protocolo nº 5132061217, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Neste estudo foi utilizado banco de dados provenientes de estudo prévio da equipe denominado “Use of Zelnate to prevent Bovine Respiratory Disease in dairy calves raised in individual housing”.

### 4.1 Local do experimento

O estudo foi realizado em uma fazenda comercial de alta produção, localizada no município de Araras - SP, latitude 22°21'25”S, longitude 47°23'03”W e altitude 629m. O experimento ocorreu entre Maio a Dezembro de 2017.

### 4.2 Manejo das vacas pré-parto e bezerras

O manejo pré-parto das vacas consistia no fornecimento de dieta aniônica, esquema de vacinação no momento da secagem (60 dias pré-parto) e aos 30 dias antes do parto, contra Rotavírus, Coronavírus e *E.coli* F5 (Rotavec® Corona, MSD) e contra as mastites ambientais causadas por coliformes (J-Vac®, Boehringer Ingelheim), além do tratamento da vaca seca com antimastítico (Cepravin®, MSD) + selante intramamário (Teatseal®, Zoetis) para múltíparas e antimastítico (Obernin®, Zoetis) para as primíparas.

O trabalho de parto era acompanhado e auxílio obstétrico era realizado quando necessário. Após o nascimento, as bezerras recebiam tratamento umbilical, imergindo-o em solução de iodo a 5% durante um minuto e então eram transferidas para bezerreiros individuais com cama de feno e providos de luz para o aquecimento.

Após a parição as vacas eram encaminhadas para o tronco de contenção localizado na maternidade, possibilitando a ordenha do colostro. O colostro era obtido após higienização individual dos tetos com papel toalha, realização de pré-dipping e eliminação do selante intra-mamário após descarte dos primeiros jatos de colostro. Após a ordenha, realizava-se o pós-dipping e as vacas eram encaminhadas para o setor pós-parto, onde eram monitoradas diariamente para melhor acompanhamento de manifestações de doenças comuns neste período.

A qualidade do colostro era avaliada pela determinação da porcentagem de sólidos totais utilizando-se o colostrômetro. As bezerras recebiam colostro fresco, proveniente de suas mães, na quantidade de quatro litros na primeira hora de vida ou no máximo em até seis horas após o nascimento. O colostro fornecido na segunda mamada era mantido sob refrigeração à 4°C e aquecido levemente à 37°C no momento de sua administração. A segunda mamada ocorria entre oito a dez horas após o nascimento, e o volume ofertado era equivalente a 10% do peso vivo da bezerra, determinado no momento do nascimento.

O colostro fresco identificado como sendo de baixa qualidade pela avaliação com o colostrômetro era substituído pelo congelado advindo do banco de colostro, armazenado à -20°C e descongelado em banho maria no momento de sua utilização.

Após a colostragem e até no máximo dois dias de vida, as bezerras eram transferidas para gaiolas individuais e recebiam sete litros de leite, divididos em duas mamadas (manhã e tarde), utilizando-se baldes de inox (fixos) para cada bezerra. Água e feno eram oferecidos ad libitum. Do segundo ao vigésimo quinto dia de vida era oferecido leite de descarte pasteurizado (sete litros em duas mamadas) e concentrado, e a partir do 26° dia de vida até o desmame, as bezerras ingeriam oito litros de leite por dia.

As bezerras foram desmamadas com idade variando entre 65 a 89 dias de vida, dependendo do escore de condição corporal, ingestão de concentrado e saúde geral. A diminuição gradativa da oferta de leite iniciava-se com cinco litros, divididos em duas refeições durante três dias; redução para quatro litros divididos em duas refeições durante mais três dias; e três litros divididos em duas refeições durante mais três dias. No desmame final eram oferecidos aproximadamente três quilos de concentrado durante cinco dias. Por fim, as bezerras foram retiradas das gaiolas e levadas para o alojamento coletivo, com taxa de lotação de dez bezerras/lote. Neste alojamento, as

bezerras passaram por um processo de adaptação alimentar, ingerindo concentrado, feno e silagem.

O protocolo de vacinação das bezerras consistiu na administração de duas doses da vacina intranasal (Inforce<sup>®</sup> 3, Zoetis Animal Health, Florham Park, NJ, USA) contra Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1), Parainfluenza bovina tipo 3 (PIV-3) e Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV), na primeira semana de vida. O *booster* com 30 dias após a primeira vacinação completava o protocolo desta primeira vacina. As bezerras passavam por outro protocolo de vacinação com a aplicação de vacina injetável (CatteMaster<sup>®</sup> Gold FP 5/L5, Zoetis, New York, NY, USA) contra BoHV-1, Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVD), PIV-3, BRSV e *Leptospirose* aos 80 e 110 dias de vida. As bezerras recebiam ainda uma dose preventiva contra Eimeriose (Baycox, Bayer), dez dias após o desmame.

#### 4.3 Animais e momentos de avaliações

Para a realização desta pesquisa foram utilizadas 216 bezerras da raça Holandesa, acompanhadas em cinco momentos distintos, a saber: D2-6 (dois a seis dias de vida); D7-13 (sete a 13 dias de vida); D14-20 (14 a 20 dias de vida), D21-27 (21 a 27 dias de vida) e D31-41 (31 a 41 dias de vida).

#### 4.4- Monitoramento da Saúde

Informações referentes aos tratamentos das bezerras realizados durante o experimento, realização de procedimentos como descornas, óbitos, nascimentos prematuros e casos de falha na transferência de imunidade passiva foram obtidas por consulta aos registros da fazenda.

O exame físico geral das bezerras foi realizado segundo os procedimentos descritos por Feitosa (2014), compreendendo a aferição das funções vitais (frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura corporal), hidratação, avaliação das mucosas aparentes e linfonodos.

O exame físico da região umbilical foi realizado por meio da inspeção e palpação das estruturas umbilicais externas e internas, buscando-se alterações na coloração, aumentos de volume, presença de secreções, dor e alterações de temperatura (DIRKSEN et al., 2008).

As bezerras foram avaliadas ainda quanto à presença ou ausência de diarreia e doença respiratória bovina – DRB, seguindo os protocolos do *Calf Health Scoring Criteria, da University of Wisconsin – Madison* (McGUIRK, 2008; POULSEN; McGUIRK, 2009).

A presença ou ausência de diarreia foi determinada de acordo com a avaliação da consistência das fezes, classificando-as como normal (escore 0); pastosa/semiformada (escore 1); pastosa com maior quantidade de água e fezes aderidas no períneo e cauda (escore 2); e líquidas com conteúdo fecal aderido no períneo e cauda (escore 3). Os escores 0 e 1 foram utilizados para classificar a ausência e os escores 2 e 3 para a presença de diarreia (McGUIRK, 2008).

A determinação da existência de quadros de DRB também se baseou na utilização de escores, após avaliação dos parâmetros como temperatura retal, tosse, secreção nasal, secreção ocular, posição das orelhas e da cabeça. Para cada parâmetro avaliado atribuiu-se uma pontuação - zero a 3,0 (Quadro 3). Ao final da avaliação, a pontuação total foi determinada a partir da soma dos pontos atribuídos para cada parâmetro, interpretando-se da seguinte forma: soma final menor ou igual a 4,0 – ausência de DRB e soma final maior ou igual a 5 – presença de DRB (POULSEN; MCGUIRK, 2009).

Quadro 3 - Escores da DRB – São Paulo – 2018

<b>Escores</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Temperatura retal</b>	37,7-38,2°C	38,3-38,8°C	38,9-39,3°C	≥39,4°C
<b>Tosse</b>	Ausente	Presente e única quando estimulada	Presente e repetidas, estimuladas ou ocasionais	Presente, repetidas e espontâneas
<b>Secreção Nasal</b>	Serosa	Seromucosa, unilateral	Mucopurulenta, bilateral	Purulenta, bilateral
<b>Secreção Ocular</b>	Serosa	Pouca quantidade	Moderada quantidade	Intensa quantidade
<b>Posição de orelhas e cabeça</b>	Normal	Balançar das orelhas ou cabeça	Ligeiramente pendente, unilateral	Pendente intensamente, bilateral ou torção da cabeça

Fonte: Poulsen; McGuirk, (2009).

#### 4.3.1 Colheita e armazenamento das amostras

Amostras de sangue foram obtidas por punção da veia jugular, utilizando-se o sistema à vácuo, em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA-K2), para determinação do volume globular (VG) e em tubos sem anticoagulante (Becton-Dickinson Brasil, São Paulo, Brasil), para a dosagem de haptoglobina (Hp). Após a colheita, os tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 1057 g durante 10 minutos, e os soros obtidos de cada amostra sanguínea foram aliquotados em microtubos e armazenados a -40°C até o momento da análise.

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal utilizando-se luvas de látex estéreis e transferidas imediatamente para coletores universais estéreis, congelados a -20°C até o momento da determinação da porcentagem de matéria seca.

## 4.4 Análises laboratoriais

### 4.4.1 Dosagem da Haptoglobina (Hp)

A concentração de haptoglobina foi determinada com base na sua habilidade de ligação com a hemoglobina (JONES; MOULD, 1987; BASTOS et al., 2013; RAMOS et al., 2018), utilizando-se a espectrofotometria.

O soro utilizado para a determinação da curva padrão foi humano (0,59 g/L), com concentração de Hp determinada por meio de kit comercial (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Para a determinação da Hp foram utilizadas placas de 96 poços para espectrofotometria. As colunas A1-H1 e B2-H2 foram utilizadas para o preparo da curva padrão de Hp entre zero e 0,59 g/L, por meio de diluições seriadas. Para tanto, adicionou-se 20 µL do soro controle em 180 uL de solução fisiológica nos poços A1 e A2, e 100 µL de solução fisiológica nos poços B1 à H1 e B2 à H2. Posteriormente, aspirou-se 100 µL contidos no poço A1 da placa, realizando-se a diluição seriada até o poço G1, restando um volume de 100 µL nos poços A1 a G1, e descartando-se 100 µL retidos na ponteira da pipeta automática. O mesmo procedimento foi realizado para a coluna 2. Os últimos poços das colunas 1 e 2 da placa (H1 e H2) foram destinados ao branco da curva (Figura 4). Posteriormente, preencheu-se o restante da placa com 90 uL de solução salina e 10uL das amostras a serem testadas, em duplicata. Para um melhor controle das dosagens, padronizou-se que as colunas pares da placa (4 a 12) seriam utilizadas como o branco da curva padrão e branco das amostras testadas, e as colunas ímpares (3 a 11) foram destinadas aos testes (Figura 4). Cada amostra teve o seu respectivo branco, com o intuito de descartar influências da composição do soro, como em casos de lipidose onde pode-se observar um aumento na absorbância mesmo no branco da amostra (BASTOS et al., 2013; RAMOS et al., 2018).

Figura 4 - Layout do preenchimento das amostras na placa de Elisa com 96 poços – São Paulo – 2018

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	BCP	TA1	BA1	...	...						
B	CP	BCP	TA2	BA2								
C	CP	BCP	TA3	BA3								
D	CP	BCP	TA4	BA4								
E	CP	BCP	TA5	BA5								
F	CP	BCP	TA6	BA6								
G	CP	BCP	TA7	BA7								
H	CP	BCP	TA8	BA8								

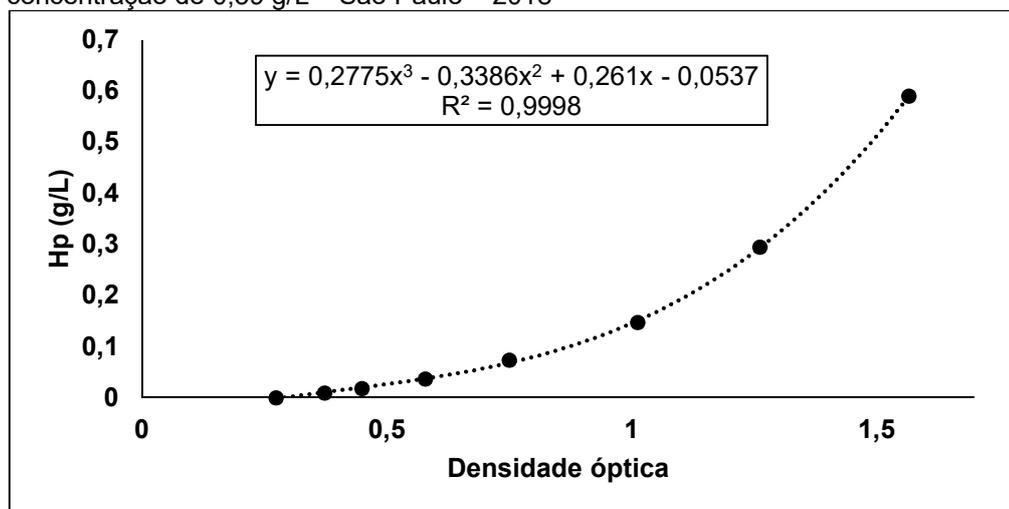
Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

Legenda: CP – curva padrão; BCP – branco da curva padrão; 1A-1H - 100 µL de solução com concentrações de Hp entre 0,59 g/L a zero + 50 µL de meta-hemoglobina + 150 µL de Guaiacol + 50 µL de peróxido de hidrogênio. A2-H2= Branco da curva padrão (BCP) contendo 100 µL de solução com concentração de 0,59 g/L a zero + 50 µL de solução fisiológica + 150 µL de Guaiacol + 50 µL de peróxido de hidrogênio; TA – teste da amostra contendo 90 µL de solução fisiológica + 10 µL de soro da amostra teste + 50 µL de meta-hemoglobina + 150 µL de Guaiacol + 50 µL de peróxido de hidrogênio. BA – branco da amostra contendo 90 µL de solução fisiológica + 10 µL de soro da amostra teste + 50 µL de solução fisiológica + 150 µL de Guaiacol + 50 µL de peróxido de hidrogênio.

Adicionou-se então, em cada poço das colunas ímpares, 50 µL de solução de meta-hemoglobina bovina (concentração de 40mg/dL), e 50 µL de solução fisiológica em cada poço das colunas pares. Após dez minutos de incubação em temperatura ambiente, 150 µL do substrato guaiacol e 50 µL de peróxido de hidrogênio (0,02 mol/L) foram adicionados em todos os poços da placa, inclusive os da linha H. A placa foi incubada no escuro por dez minutos em temperatura ambiente e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 495 nm. Amostras foram diluídas quando a concentração de Hp ultrapassava a concentração máxima do padrão e amostras hemolisadas não foram analisadas, uma vez que a técnica utiliza a ligação da Hp com a hemoglobina.

Após a determinação das densidades ópticas, as concentrações (g/L) de Hp das amostras foram determinadas utilizando-se o método dos mínimos quadrados, com função obtida em uma regressão polinomial de ordem 3, com os valores conhecidos da Hp do padrão, para cada placa de ELISA (Figura 5).

Figura 5 - Representação gráfica dos valores de haptoglobina da curva padrão, com concentração de 0,59 g/L – São Paulo – 2018



Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

#### 4.4.1.1 Determinação da repetibilidade da Hp por técnica espectrofotométrica

O grau de padronização dos reagentes e a experiência do testador são fatores que podem influenciar os resultados, pelo qual devem ser testados por meio de testes de repetibilidade para a validação do teste (THRUSFIELD, 2005). A repetibilidade dos resultados obtidos na técnica de dosagem da Hp por espectrofotometria foi determinada com base em literatura consultada (TANIWAKI, 2012).

Amostras provenientes de dez bezerras da raça Holandesa, sendo duas saudáveis e oito doentes, foram obtidas para a análise da repetibilidade do teste para preservação das amostras do experimento. O soro sanguíneo das bezerras foi separado em seis alíquotas de 500 µL, congeladas a -80°C. Cada alíquota foi descongelada uma única vez, e todas foram analisadas no prazo máximo de 30 dias após a colheita.

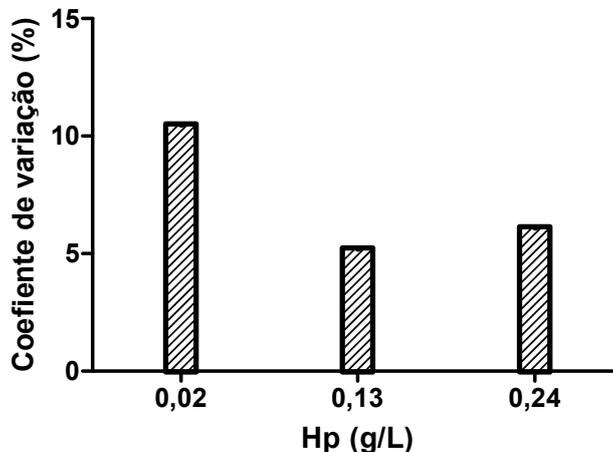
Uma alíquota de cada bezerra foi utilizada para a verificação da possibilidade de inclusão do teste de repetibilidade, considerando os valores mínimo e máximo de 0,02 g/L (ECKERSALL e BELL, 2010) e 0,59 g/L (soro padrão humano), respectivamente. Desta forma, três bezerras foram selecionadas: uma saudável, que apresentou concentração de Hp de 0,02 g/L; uma bezerra que apresentava no

momento da colheita diarreia e hipertermia, com Hp no valor de 0,13 g/L e outra com doença respiratória e valor de Hp alto de 0,24 g/L.

A avaliação da repetibilidade intra-teste foi feita por meio do teste de dez replicatas de soro com baixa, média e alta concentração de Hp. Para a avaliação da repetibilidade inter-teste (diferentes corridas), as amostras em duplicata foram testadas durante cinco dias seguidos. O coeficiente de variação (CV) foi calculado utilizando o desvio padrão (DP) e a média das repetições, com a fórmula  $CV (\%) = (DP \times 100) / \text{média}$ .

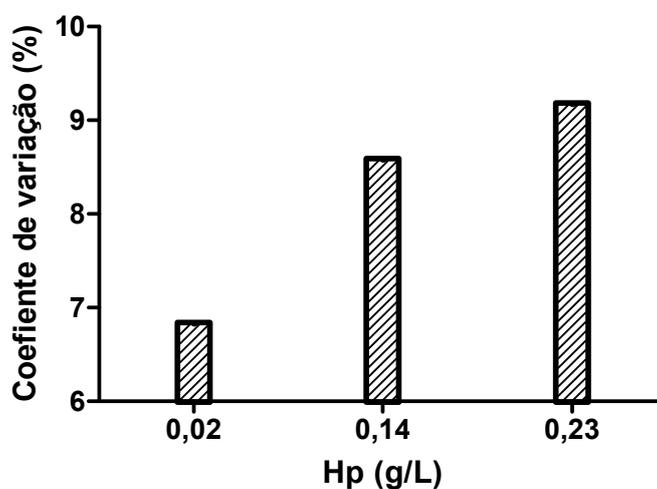
O coeficiente de variação intra-teste variou de 5,19 a 10,47 (Figura 6 e tabela 1), enquanto o coeficiente inter-teste variou de 6,83 a 9,17 (Figura 7 e tabela 2). Observa-se baixa variação para diferentes concentrações de Hp (baixa, média e alta) e para ambos os coeficientes (CV intra= 7,25% e CV inter= 8,19%).

Figura 6 - Coeficiente de variação intra-teste de amostras com baixa, média e alta concentração de Hp em bezerras Holandesas – São Paulo – 2018



Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

Figura 7 - Coeficiente de variação inter-teste de amostras com baixa, média e alta concentração de Hp em bezerras Holandesas – São Paulo – 2018



Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

Tabela 1 - Coeficiente de variação (CV) intra-teste de amostras com baixa, média e alta concentração de Hp em bezerras Holandesas – São Paulo – 2018

Número de repetições	□Baixa	□Média	□Alta
1	1,92	13,84	21,70
2	1,86	14,22	21,83
3	1,86	13,40	24,64
4	1,84	13,88	23,34
5	1,76	13,44	26,39
6	1,60	13,26	24,30
7	1,62	13,29	24,01
8	1,50	13,77	24,01
9	1,70	12,36	22,16
10	1,38	11,98	23,77
<b>CV%</b>	10,47	5,19	6,09
<b>Média geral do CV%</b>		7,25	

Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

Tabela 2 - Coeficiente de variação (CV) inter-teste de amostras com baixa, média e alta concentração de Hp em bezerras Holandesas – São Paulo – 2018

	□Baixa	□Média	□Alta
<b>Dia 1</b>	1,92	13,84	21,70
<b>Dia 2</b>	2,15	13,67	24,63
<b>Dia 3</b>	1,80	14,31	21,18
<b>Dia 4</b>	2,01	11,44	25,95
<b>Dia 5</b>	1,89	14,03	21,76
<b>CV%</b>	6,83	8,58	9,17
<b>Média geral do CV%</b>		8,19	

Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

#### 4.4.2 Matéria seca das fezes (MS)

Para a determinação da porcentagem de matéria seca das fezes, os coletores universais foram descongelados em geladeira overnight, e transferiu-se 5 gramas de cada amostra para potes metálicos. Após, os potes foram transferidos para estufa a 103°C por 24 horas, sendo transferidos posteriormente para o dessecador por 30 minutos para resfriar. A porcentagem de MS foi calculada utilizando a fórmula abaixo. Foram considerados casos de diarreia quando a %MS ≤ 15%.

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

#### 4.5 Análise estatística

No estudo “Use of Zelnate to prevent Bovine Respiratory Disease in dairy calves raised in individual housing” as bezerras eram incluídas de 1 a 11 dias de vida, acompanhadas no dia de aplicação do produto (T0) e nos momentos subsequentes T1, T3, T5, T7, T14, T30 e T60, o que gerava sobreposição de idades entre os tempos de avaliação.

Inicialmente o momento T0, com idade variando entre um e 11 dias de vida foi excluído da análise devido a não dosagem de Hp no referido momento, reduzindo a amostragem de 1708 para 1492 observações. Uma nova definição de tempos foi

realizada para excluir a sobreposição entre as idades das bezerras em diferentes tempos de avaliação. Foi possível distribuir os dados sem sobreposição de idade adotando os seguintes intervalos: D2-6 (n=96); D7-13 (n=216); D14-20 (n=177); D21-27(n=119) e D31-41 (n=208), totalizando 816 observações.

Para análise dos dados, o software de estatística Statistical Package for the Social Science, versão 18 (SPSS) foi utilizado para a elaboração da estatística descritiva e inferências estatísticas. Para avaliação da variação da concentração da Hp ao longo do tempo, inicialmente, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliação da normalidade dos dados. Os dados da Hp, com distribuição não paramétrica, foram submetidos a uma transformação em duas abordagens.

A primeira retorna os valores em rank e a segunda, transforma estes mesmos valores com a transformação inversa, esta metodologia foi descrita por Templeton (2011). A análise de variância ANOVA para medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni permitiu a avaliação do efeito do tempo sobre a concentração de Hp.

A avaliação dos parâmetros de performance (sensibilidade e especificidade da Hp) para a detecção de doenças foi realizada com software MedCalc versão 18.2.1. Nesta etapa, diferentes curvas foram realizadas para avaliar a acurácia do uso da Hp nos picos de detecção das onfalites, diarreias e DRB, sendo excluídas destas análises as bezerras que apresentavam outras doenças concomitantes.

Em relação a onfalite, o padrão-ouro foram animais positivos para esta doença no exame de inspeção e palpação, sem doenças concomitantes (Diarreia e DRB), e animais saudáveis, foram aqueles sem quaisquer doenças.

Para a avaliação da diarreia, cinco padrões-ouro de análise foram utilizados. A primeira análise foi geral, considerando bezerras que apresentavam escore de fezes 2 e 3, enquanto as bezerras do grupo controle não apresentavam quaisquer das enfermidades avaliadas. Os segundo, terceiro, quarto e quinto padrões-ouro foram obtidos utilizando bezerras com escore de diarreia 2 (segundo padrão-ouro) e 3 (terceiro padrão-ouro), quando as bezerras apresentaram matéria seca <15% (quarto padrão-ouro) e quando as bezerras apresentaram matéria seca <15% e escore de fezes >1 (quinto padrão-ouro), o controle para cada análise eram bezerras sem quaisquer alterações.

Para a DRB, a sensibilidade e especificidade da Hp para a detecção da doença foram testadas em relação à cinco diferentes padrões-ouro. Para o primeiro padrão-

ouro, bezerras positivas eram aquelas que possuíam somatório  $\geq 5$  no escore de WI, já as negativas eram aquelas com escore de WI  $< 5$  e sem doenças concomitantes. O segundo, terceiro, quarto e quinto padrões-ouro foram definidos utilizando os somatórios do escore de WI 5 (segundo padrão-ouro), 6 (terceiro padrão-ouro) e  $\geq 7$  (quarto padrão-ouro), cada somatório foi testado isoladamente, e quando as bezerras apresentavam temperatura  $> 39,5^{\circ}\text{C}$  e somatório WI  $\geq 5$  (quinto padrão-ouro). Para todas as análises as bezerras do grupo controle possuíam escore de WI  $< 5$  e não apresentavam doenças concomitantes.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ocorrência e prevalência de onfalite, diarreia e doença respiratória

As ocorrências das doenças manifestadas pelas bezerras ao longo do estudo estão apresentadas na Figura 8. A ocorrência geral de onfalite foi de 4,5% (37/816), enquanto o pico da doença ocorreu em D7-13 (Tabela 3 e figura 8A), com prevalência de 8,8% (19/216) para esta mesma faixa etária. A ocorrência geral de diarreia foi de 15,1% (123/816), enquanto que no pico da doença, que ocorreu em D14-20 (Figura 8B), a prevalência foi de 42,9% (76/177). Para a DRB a ocorrência geral foi de 17,8% (145/816), e a prevalência no pico da doença (Figura 8C) foi de 26,4% (55/208), ocorrendo em D31-41.

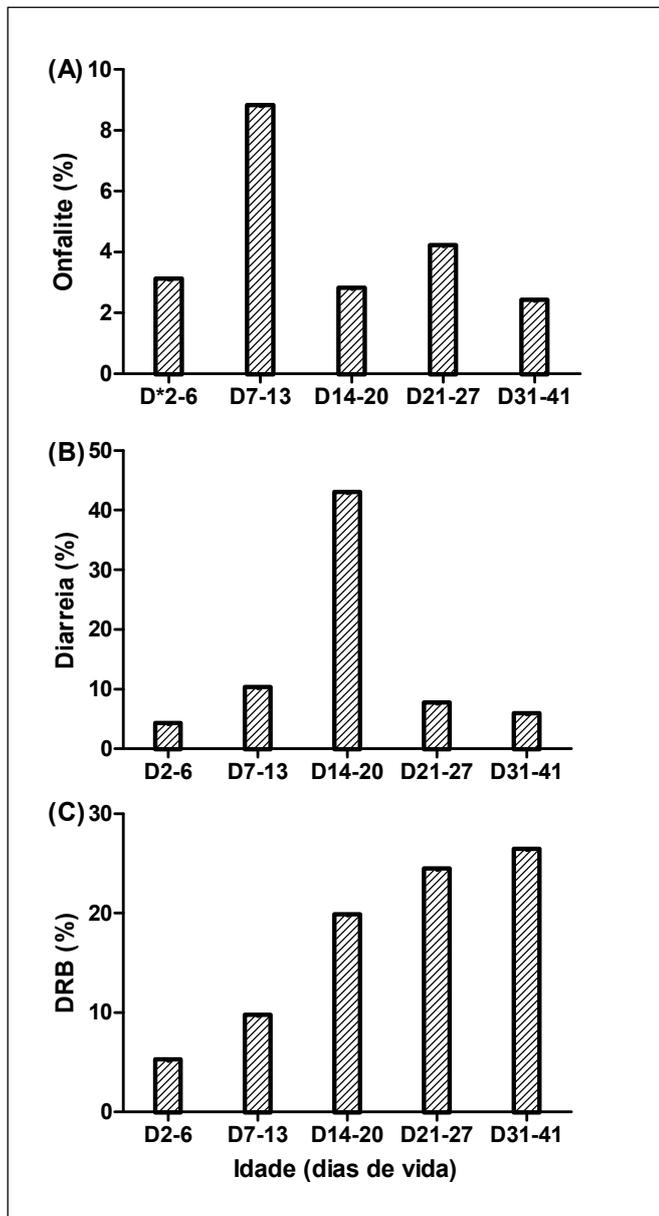
Tabela 3 - Ocorrência de onfalite, diarreia e DRB %(número de casos positivos/número total de animais) em bezerras Holandesas durante os primeiros dias de vida (N=816) – São Paulo – 2018

	D*2-6	D7-13	D14-20	D21-27	D31-41
Onfalite (%)	3,1(3/96)	8,8(19/216)	2,8(5/177)	4,2(5/119)	2,4(5/208)
Diarreia(%)	4,2(4/96)	10,2(22/216)	42,9(76/177)	7,6(9/119)	5,8(12/208)
DRB(%)	5,2(5/96)	9,7(21/216)	19,8(35/177)	24,4(29/119)	26,4(55/208)

Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

Legenda: D\*= Dias de vida; DRB= Doença respiratória bovina.

Figura 8 - Ocorrência de onfalite, diarreia e DRB em bezerras durante os primeiros dias de vida (N=816) – São Paulo – 2018



Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

Legenda: Figura A= Onfalite; Figura B= Diarreia; Figura C= DRB; DRB= Doença respiratória bovina.

\*D= dias.

## 5.2 Comportamento da Hp em bezerras da raça Holandesa

A média da concentração de Hp durante o experimento foi de  $0,03 \pm 0,05$  g/L, com valores mínimo e máximo de 0,00 e 0,52 g/L, respectivamente. O comportamento da Hp apresentou variação significativa ( $P < 0,05$ ) ao longo do período experimental (Figura 9). As bezerras apresentaram maiores valores de Hp em D7-13 e D14-20 com valores de  $0,04 \pm 0,07$  e  $0,04 \pm 0,05$  g/L (Tabela 4), respectivamente.

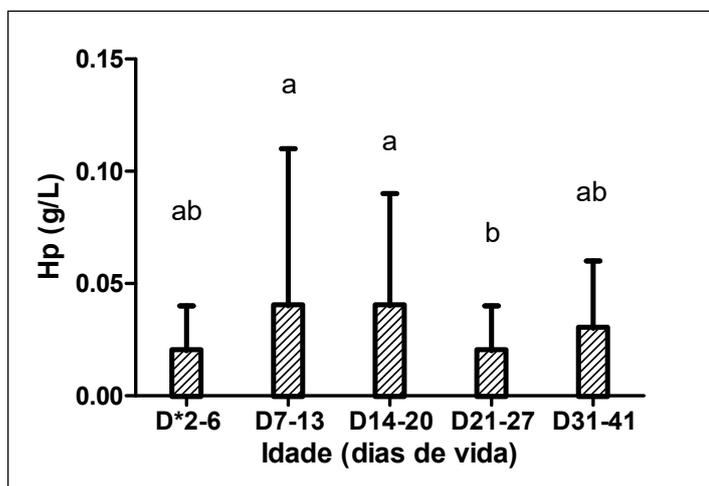
Tabela 4 - Concentração da haptoglobina (média±desvio-padrão) em bezerras durante os primeiros dias de vida (N=816) – São Paulo – 2018

	D*2-6	D7-13	D14-20	D21-27	D31-41
Hp	$0,02 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,07$	$0,04 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,03$

Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

Legenda: D\*= Dias de vida; Hp= Haptoglobina.

Figura 9 - Média da concentração de Hp em bezerras da raça Holandesa nos primeiros dias de vida (N= 796 observações) – São Paulo – 2018



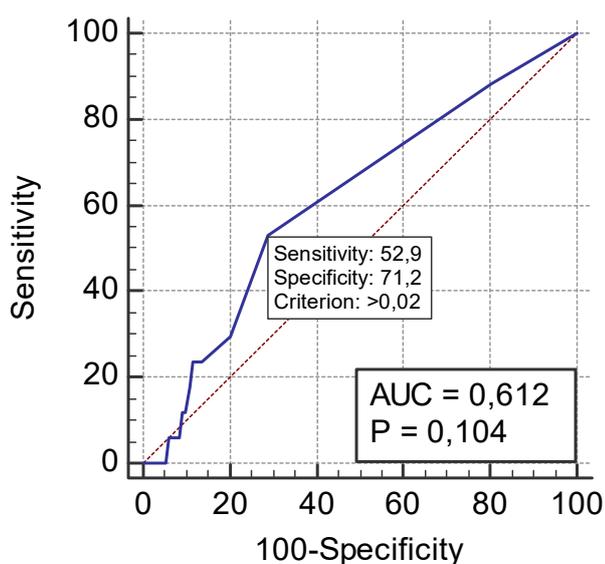
Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

Legenda: \*D= dias; Hp= Haptoglobina; \*\*Letras diferentes representam as diferenças entre os tempos pelo teste de Bonferroni,  $P < 0,05$ ."

### 5.3 Determinação dos parâmetros de performance da Hp em relação aos momentos de maior prevalência da onfalite, diarreia e DRB

Um total de 180 amostras foram submetidas à análise de sensibilidade e especificidade da Hp para a detecção de onfalite (Figura 10). O número de positivos foi de 9,44% (17/180) e negativos 90,56% (163/180). Não foi possível observar resultados significativos para a utilização da Hp em casos de onfalite.

Figura 10 - Análise de sensibilidade e especificidade da Hp no período de maior manifestação da diarreia (D7-13) em bezerras da raça Holandesa – São Paulo – 2018



Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

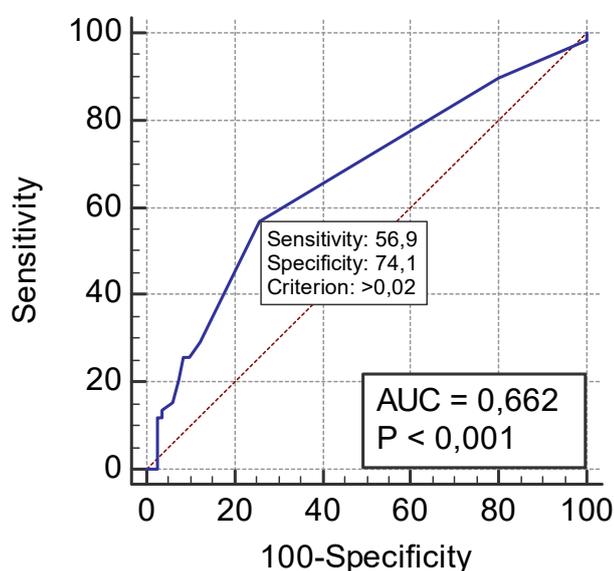
Legenda: AUC = Area under the curve; Onfalite, n = 17; controle, n = 163.

Em relação a diarreia e a sua associação com a Hp, um total de 139 amostras foi utilizado para a análise de sensibilidade e especificidade. O número de positivos foi de 41,73% (58/139) e negativos foi de 58,27% (81/139). Foi possível observar resultado significativo ( $P=0,001$ ), sendo a área sob curva ROC = 0,662 ( $SE=0,045$ ),

sensibilidade de 56,9% e especificidade de 74,07%, o ponto de corte para a Hp foi de 0,02 g/L (Figura 11).

A razão de verossimilhança para um resultado positivo (LR+) foi de 2,19 enquanto que a razão de verossimilhança para um resultado negativo (LR-) foi de 0,58. O valor preditivo positivo foi de 62,2% e valor preditivo negativo foi de 69,6%.

Figura 11 - Análise de sensibilidade e especificidade da Hp no período de maior manifestação da diarreia (D14-20) em bezerras da raça Holandesa – São Paulo – 2018

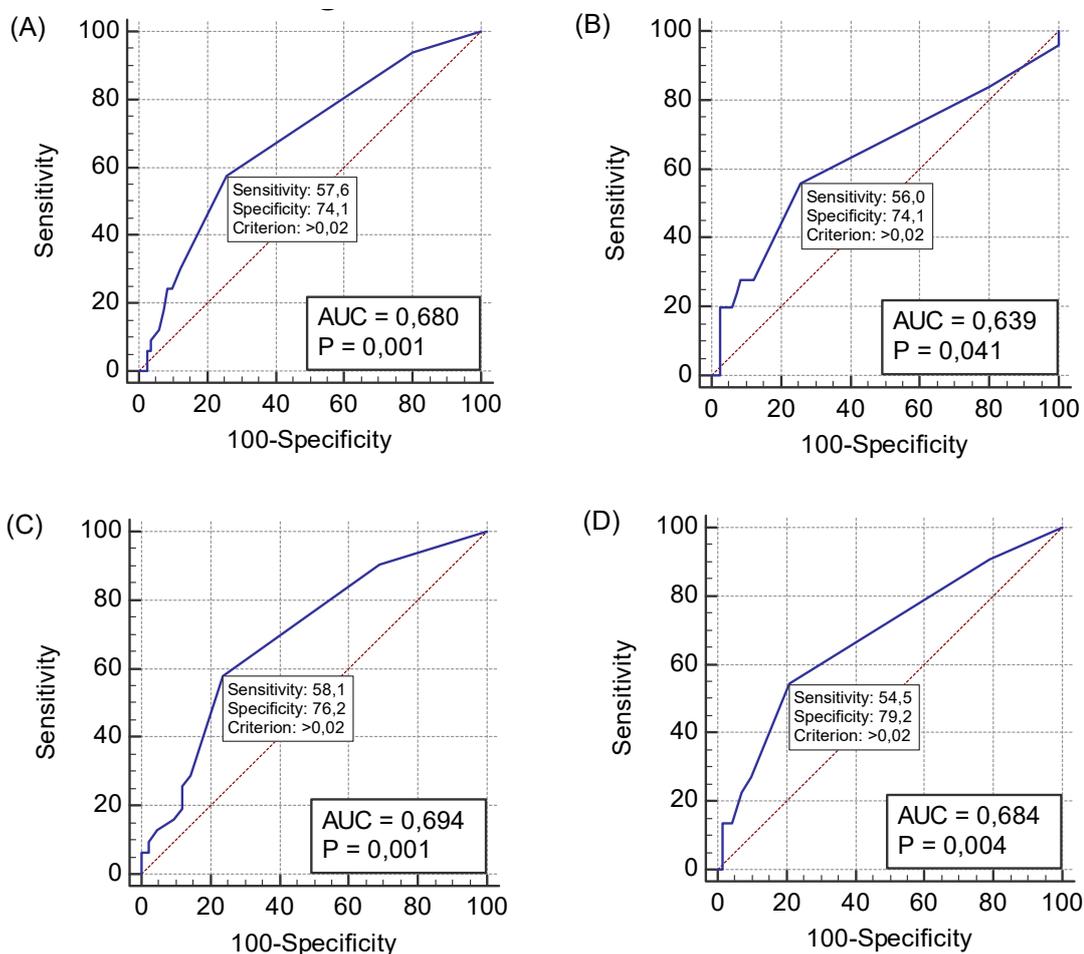


Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

Legenda: Hp = haptoglobina; AUC = *Area under the curve*; Padrão-ouro, n = 58; controle, n = 81.

Adotando-se o escore de diarreia 2 (segundo padrão-ouro), 3 (terceiro padrão-ouro), matéria seca <15% (quarto padrão-ouro) e quando as bezerras apresentaram matéria seca <15% e escore de fezes >1 (quinto padrão-ouro), e, para estes quatro padrões-ouro o ponto de corte da Hp foi de 0,02 g/L. A sensibilidade foram semelhantes e variaram de 54,55 a 58%, enquanto que a especificidade variou de 74,07 a 79,17. A área sobre curva variou de 0,639 a 0,694 (Figura 12).

Figura 12 - Análise de sensibilidade e especificidade da Hp no período de maior manifestação da diarreia (D14-20) para os quatro padrões-ouro utilizados – São Paulo – 2018

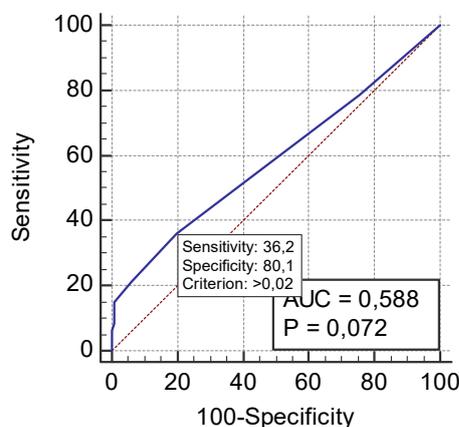


Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

Legenda: Hp = haptoglobina; AUC = *Area under the curve*; A = Padrão ouro (escore 2 de diarreia), n = 33, controle = 81; B = Padrão-ouro (escore 3 de diarreia), n = 25, controle = 81; C = Padrão-ouro (matéria seca <15%), n = 31 Controle = 42; D = Padrão-ouro (matéria seca <15% + escore de fezes >=2), n = 22, controle = 72.

Quanto à DRB e a concentração de Hp, um total de 183 amostras foi submetido à análise de sensibilidade e especificidade (Figura 13) no momento de pico da doença (D31-41). O número de positivos foi de 25,68% (47/183) e negativos 74,32% (136/183). Não foi possível observar resultado significativo (P=0,072).

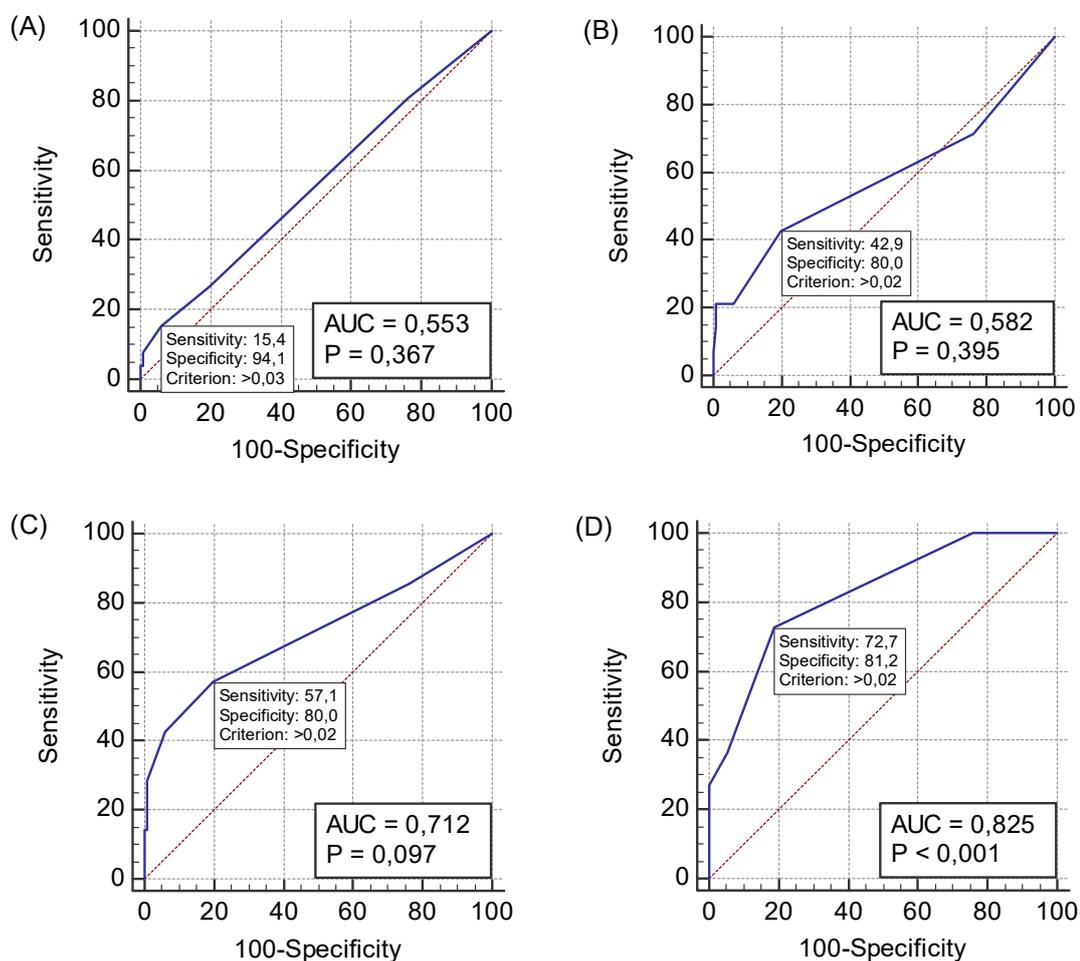
Figura 13 - Análise de sensibilidade e especificidade da Hp no período de maior manifestação da DRB (D31-41) em bezerras da raça Holandesa – São Paulo – 2018



Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).  
 Legenda: Hp = haptoglobina; AUC = *Area under the curve*; DRB, n = 47; controle, n = 136.

A sensibilidade e especificidade do uso da Hp na detecção de DRB foi testada com diferentes padrões-ouro, isto é, com os somatórios do escore de WI 5 (segundo padrão-ouro), 6 (terceiro padrão-ouro) e  $\geq 7$  (quarto padrão-ouro) e quando as bezerras apresentavam temperatura  $> 39,5^{\circ}\text{C}$  e somatório WI  $\geq 5$  (quinto padrão-ouro). Bezerras com DRB, somatório escore de WI=7 apresentaram uma tendência para a utilização da Hp na detecção de DRB somatório 7 ( $P= 0,097$ ), apresentando uma AUC = 0,712 e valores de sensibilidade e especificidade de 57,1 e 80%, respectivamente (Figura 14C). Os melhores resultados da associação da concentração de Hp com a DRB foram obtidos para as bezerras com escore de WI  $\geq 5$  e temperatura  $>39,5^{\circ}\text{C}$ , sendo possível observar AUC = 0,825, sensibilidade de 72,7% e especificidade de 81,2% (Figura 14D). O melhor ponto de corte para as análises realizadas foi de 0,02 g/L.

Figura 14 - Análise de sensibilidade e especificidade da Hp no período de maior manifestação da DRB (D14-20) utilizando-se diferentes padrões-ouro – São Paulo – 2018



Fonte: (RAMOS, J. S., 2018).

Legenda: Hp = haptoglobina; AUC = *Area under the curve*; A = Padrão ouro (soma escore WI = 5), n = 26, controle = 135; B = Padrão-ouro (Soma escore WI = 6), n = 14, controle = 135; C = Padrão-ouro (soma escore WI = 7), n = 7, Controle = 135; D = Padrão-ouro (Escore  $\geq 5$  e temperatura acima de 39,5°C), n = 11, controle = 133.

## 6 DISCUSSÃO

Este trabalho estabeleceu o período de prevalência das principais doenças (onfalite, diarreia e doença respiratória) que acometem as bezerras nos primeiros 41 dias de vida em um sistema de criação intensivo, assim como estabeleceu o comportamento da Hp no retro referido período. Além disso, foi possível avaliar a performance da Hp frente a detecção de doenças em bezerras Holandesas.

### 6.1 Prevalência de doenças (onfalite, diarreia e DRB)

A ocorrência de onfalite foi de 4,5%, com pico da doença em bezerras com idade de 7 a 13 dias de vida. Em outro estudo foi observado 42,22% (95/225) de onfalopatias em bezerros de fazendas voltadas para produção de leite, e com idade variando entre um a 90 dias de vida (REIS et al., 2009). As diferenças entre as prevalências podem estar associadas com o tipo de manejo adotado nas fazendas, tais como: colostragem, qualidade do leite e cura do umbigo. Neste período as bezerras estão em processo de adaptação e o desafio imunológico é constante, a região umbilical é uma porta de entrada para microrganismos, ocasionando em uma onfalite. Alguns microrganismos foram identificados como agentes causadores de onfalite, tais como: *Staphylococcus* spp., *E. coli*, *Pseudomonas* spp. e *Streptococcus* spp. (RENGIFO et al., 2006).

A diarreia apresentou maior prevalência quando as bezerras apresentavam idade de 14 a 20 dias de vida, com 42,9% (76/177). Tais valores foram diferentes aos encontrados por Novo et al. (2017) em bezerras da raça Holandesa com idade de sete (62,75%) e 14 (68,9%) dias de vida. Este último estudo foi realizado na mesma fazenda em relação ao trabalho atual, e as mudanças do manejo, principalmente com a inclusão de substâncias a base de halofuginona, para o controle de diarreias por *Cryptosporidium* sp. e a inclusão de dióxido de cloro na desinfecção do bezerreiro, impactaram na redução das taxas de diarreia observadas. Martin (2017) detectou prevalência de 92,8% em bezerras com idade entre 13 e 15 dias de vida. A alta prevalência pode estar associada com a não utilização de protocolos sanitários para

o controle da diarreia. Já no trabalho de Seppä-Iassila et al. (2015) na Finlândia, a prevalência encontrada para a diarreia, para bezerros com idade entre 15 a 60 dias de vida foi de 32,6%. Diferentes condições sanitárias podem ter impactando na proliferação de diferentes agentes etiológicos e conseqüentemente as porcentagens observadas para a diarreia (OLAOGUN et al., 2016; REITEN et al., 2018).

A porcentagem de DRB foi maior no D31-41, com 26,4% (55/208). No Canadá, em bezerras com 90 dias de vida o risco de DRB foi de 21,6%, sendo o intervalo entre 37 dias a 90 dias de vida o período de maior ocorrência (9,5%), observado em 19 fazendas. Os diferentes rebanhos, com diferentes manejos e protocolos sanitários podem ter promovido uma divergência em relação às taxas observadas em ambos estudos (WINDEYER et al., 2014).

Em estudo realizado no sul do Brasil avaliando diversas enfermidades diagnosticadas entre 2000 a 2011, Assis-Brasil et al. (2013) observaram que a maior porcentagem de doenças em bezerros de leite e corte entre um a 90 dias de vida estava associada a pneumonia (19,3%).

A variação da idade pode ter sido o fator mais importante na diferenciação das taxas verificadas nos diferentes estudos. As bezerras do presente estudo apresentaram taxas elevadas no pico da doença que compreendeu o intervalo de 31 a 41 dias de vida, diferente dos outros estudos citados que tiveram a avaliação em um intervalo de idade maior (ASSIS-BRASIL et al., 2013; WINDEYER et al., 2014). Além disso, as diferentes taxas observadas podem estar relacionadas com o estresse, falha na ingestão de colostro, baixo peso corporal, condições higiênico-sanitárias e ambientais das instalações, além do frio, fator importante que pode levar o desencadeamento de surtos de doença respiratória (ASSIS-BRASIL et al., 2013).

Importante ressaltar que a janela imunológica, período de transição da imunidade passiva para ativa, está associada ao aparecimento de doença respiratória (CHASE, 2018). Neste período os anticorpos maternos reduzem significativamente, devido à sua meia vida, que varia de 21,2 a 35,9 dias após o nascimento (FULTON et al., 2004). A eficácia desta transferência dos anticorpos maternos depende de fatores como a concentração ingerida e absorvida via colostro, tempo de fornecimento após o nascimento e qualidade do colostro (SOUZA et al., 2014).

Os principais agentes primários da DRB que podem estar associados ao pico da doença são os vírus da Rinotraqueite Infecciosa Bovina (BHV-1), vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), vírus da Parainfluenza tipo 3 (PI3), vírus Respiratório Sincicial

Bovino (BRSV) e Coronavírus. Já as infecções secundárias são causadas pelas bactérias *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, e *Mycoplasma bovis* (WOOLUMS; AMES; BAKER, 2009).

### 6.1 Comportamento da Hp nos primeiros dias de vida

A concentração geral da Hp foi de  $0,03 \pm 0,05$  g/L com valores mínimo e máximo de 0,00 e 0,52 g/L, respectivamente, sendo estes valores menores quando comparados com outro estudo realizado com animais com diarreia (0,27 g/L) e saudáveis (0,09 g/L), respectivamente (HAJIMOHAMMADI et al., 2013). No entanto, os valores obtidos na presente pesquisa foram próximos ao valor de 0,02 g/L relatado por Eckersall, Bell (2010) como ponto de corte para a Hp.

Foi possível observar que a Hp apresentou as maiores concentrações no D7-13 e no D14-20. O pico da onfalite (D7-13) e diarreia (D14-20) ocorreram neste período, e o aumento na concentração da Hp pode estar associado com a ocorrência destas doenças. No entanto, alterações na concentração sérica da Hp em bezerras no período neonatal e em condições fisiológicas foram observadas com o avançar da idade (TÓTHOVÁ et al., 2015). Os autores observaram baixa concentração após o nascimento e aumento gradativo nos momentos posteriores, isto é, com sete, 14 e 30 dias de vida, e ainda sugeriram que a ingestão do colostro poderia estar associada com as elevações séricas das PFA. Por outro lado, estas variações poderiam ser justificadas pela imaturidade hepática ou do sistema imunológico do neonato (KILPI, 2015).

Em outro estudo avaliando o comportamento de proteínas de fase aguda no primeiro mês de vida de bezerras Holandesas, os autores afirmaram que o comportamento da ceruloplasmina, haptoglobina e proteínas de peso moleculares 33 kDa e 23 kDa nos primeiros dias de vida foram influenciadas pela ingestão de colostro e/ou nascimento (ROCHA et al., 2013).

## 6.2 Avaliação da sensibilidade, especificidade e ponto de corte da Hp frente a onfalite diarreia e DRB

Não foi possível observar resultado significativo entre a concentração de Hp e a onfalite, em outro estudo realizado com cinco animais com onfalite, não foi possível observar diferenças significativas, no entanto uma diferença numérica foi observada, os animais enfermos apresentaram concentração de Hp de 0,13 g/L enquanto os animais clinicamente sadios apresentaram concentração de 0,04 g/L (TÓTHOVÁ et al., 2012). Por outro lado, Simplício et al. (2013) apresentaram concentrações elevadas para a Hp (0,94 g/L) e Cp (36,7 mg/dL) em cinco bovinos com onfaloflebite quando comparado com animais sadios (0,35 g/L, Hp e 14,1 mg/dL, Cp).

O uso da Hp como biomarcador para detecção de diarreia foi testado, e os resultados encontrados foram significativos. No momento de pico da doença, a sensibilidade da Hp frente a casos de diarreia foi de 56,9%, enquanto a especificidade foi de 74,07%, sendo um teste mais específico do que sensível. Os estudos encontrados avaliaram somente o efeito da doença sobre a concentração das proteínas de fase aguda, no entanto, o estabelecimento da sensibilidade e especificidade é de fundamental importância, conhecendo o número de verdadeiros positivos, animais com a doença e com a proteína elevada, assim como os verdadeiros negativos, aqueles que não tem a doença e a concentração da proteína apresenta-se baixa (DEIGNAN et al., 2000; POURJAFAR et al., 2011; ALBAYRAK; KABU, 2016).

O ponto de corte de 0,02 g/L foi definido para a Hp quando utilizada na detecção de diarreia. Este resultado corrobora com os valores descritos por Eckersall, Bell (2010). No entanto, outro ponto de corte para a Hp foi descrito com o valor de 0,13 g/L para prever doenças e mortalidade em bezerras, com idade entre um e oito dias de vida, usando um analisador fotométrico automático, no entanto uma baixa sensibilidade (27%) e boa especificidade (80%) foi observada (MURRAY et al., 2014). Já, Gelsing et al. (2016) definiram o ponto de corte de 0,06 g/L, usando técnica descrita por Cooke, Arthington (2013). As metodologias utilizadas em outros estudos, utilizando analisador automático fotométrico e ELISA, e o guaiacol utilizado na presente pesquisa podem justificar as diferenças obtidas para os pontos de corte da Hp.

Estudos que possuem limite de detecção da Hp acima de 0,02 g/L podem comprometer a utilização desta proteína, uma vez que valores acima deste limite foram encontrados em bovinos com sinais de alterações inflamatórias (ECKERSALL; BELL, 2010).

O agente etiológico e as alterações hemodinâmicas (ligação da haptoglobina com a hemoglobina, recrutando a proteína) ligados à cronicidade da doença podem estar associados com os valores de sensibilidade e especificidade encontrados no estudo. Dentro deste período, os possíveis agentes etiológicos, tais como: Rotavirus (DHAMA et al., 2009); *Salmonella* e *Escherichia coli* (CHO; YOON, 2014) e *Cryptosporidium* (DINLER et al., 2017) podem promover diferentes respostas sobre o organismo, acarretando em diferentes concentrações de PFA após o estabelecimento da infecção (POURJAFAR et al., 2011).

Em relação às alterações hemodinâmicas, microrganismos como a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) podem apresentar associação com colites hemorrágicas e síndrome hemolítica urêmica (MOXLEY et al., 2004). A hemoglobina livre na circulação se liga à haptoglobina, fator este que pode levar à diminuição dos valores séricos de Hp e estar associado com a baixa sensibilidade (ANDERSEN et al., 2012). Por outro lado, o baixo estímulo à produção de Hp pelo fígado pode também estar associado com a baixa sensibilidade da Hp na detecção de bezerras com diarreia. Casos de diarreia com baixos valores de Hp (0,1 g/L) foram descritos em infecções com baixos sinais de eimeriose, em uma classificação usando sinais fracos; moderados e fortes, em bezerras com idade entre 15 e 60 dias de vida (SEPPÄ-LASSILA et al., 2015).

Quando utilizada a matéria seca no auxílio da detecção de animais com diarreia, verificou-se que a sensibilidade e especificidade da Hp não foi melhorada, apresentando valores de 58 e 76%, respectivamente.

Em relação à DRB uma baixa sensibilidade pode estar associada com a limitação do uso da Hp na detecção de quadros de DRB, por outro lado o padrão-ouro utilizado pode ter apresentado uma limitação na detecção de casos verdadeiro positivos. Idoate et al. (2015) avaliaram os índices epidemiológicos em bezerros com infecção natural em confinamento, e afirmaram que a Hp pode ser utilizada na detecção de DRB. O padrão-ouro utilizado foi o escore de WI e a análise de Hp por meio de Kit comercial. Foi definido o ponto de corte de 0,81 g/L, com sensibilidade de 92,86 e especificidade de 85,71. A área sob curva foi de 0,923 indicando valor

excelente para um teste de diagnóstico. Apesar da utilização dos mesmos escores (WI) em relação as bezerras Holandesas deste estudo, outros fatores foram diferentes, tais como, raça (bezerros de corte x leite), manejo sanitário (protocolos vacinais; diferentes agentes etiológicos nos ambientes) e alimentar e técnica da análise da Hp (ELISA x técnica usando guaiacol). Estes podem estar associados com as diferenças observadas.

Em relação aos escores de WI, o somatório 7 foi o que apresentou os melhores resultados. Sendo a sensibilidade de 50% e especificidade de 80%, com AUC de 0,712 e ponto de corte de 0,02 g/L. Os mesmos somatórios 5, 6 e 7 foram avaliados por outros autores, que demonstraram que a concentração da Hp foi proporcional ao aumento dos somatórios (JOSHI et al., 2018).

Quando utilizada a temperatura na elaboração do padrão-ouro a sensibilidade aumentou e apresentou os melhores resultados neste estudo. A sensibilidade e especificidade foram de 72,7 e 81,2%, respectivamente. Avaliando a acurácia, a AUC foi de 0,825. A sensibilidade da Hp apresentou excelentes resultados quando considerado o escore de WI positivo  $\geq 5$  e temperatura  $>39,5$ . Estes achados foram destacados por Abdallah et al. (2016), mostrando que os diferentes padrões-ouro podem impactar em diferentes resultados para os índices epidemiológicos.

Alguns trabalhos utilizaram a febre como padrão-ouro, fato que ocasionou um aumento na sensibilidade da Hp na detecção dos quadros de DRB. Temperaturas elevadas podem ser consideradas como quadros febris, que por sua vez, estão relacionadas com uma resposta inflamatória. Foi possível observar pico da temperatura corpórea após uma hora da inoculação bacteriana, via intrabranquial, com *M. haemolytica*, em bezerros, com posterior diminuição, após o tratamento (FAJT et al., 2004). Desta forma a temperatura está associada à fase aguda da doença, assim como a Hp, pela maior sensibilidade ao usar a temperatura como padrão-ouro. Correlação positiva entre a Hp e temperatura foi observada em estudo com bezerras com infecções por *Salmonella* (DEIGNAN et al., 2000).

Muitos trabalhos demonstraram que a Hp pode ter um importante potencial no auxílio da detecção de doenças (ANGEN et al., 2009; TÓTHOVÁ et al., 2012; JOSHI et al., 2018). Porém, a necessidade de trabalhos avaliando a acurácia da Hp frente a casos de DRB foi relatada em uma revisão sistemática (ABDALLAH et al., 2016). Os resultados dos diferentes artigos apresentaram grandes variações em relação a sensibilidade e especificidade, devido as diferentes metodologias empregadas.

Autores destacaram ainda a necessidade da utilização de padrões para relatórios de precisão de diagnóstico (BOSSUYT et al., 2003).

Este estudo apresentou as limitações da utilização da haptoglobina e contribuiu com a avaliação da acurácia desta proteína frente a casos de onfalite, diarreia e DRB em bezerras da raça Holandesa no período de aleitamento em uma análise com a utilização de importantes critérios como a determinação da repetibilidade da técnica e habilidade dos pesquisadores, impactando nos resultados obtidos.

## 7 CONCLUSÃO

Foi possível estabelecer o pico da onfalite, diarreia e DRB e o comportamento da Hp nos primeiros 41 dias de vida em bezerras Holandesas. A Hp pode ser utilizada para a detecção de diarreia, adotando o ponto de corte de 0,02 g/L, e em quadros de DRB quando utilizado o escore 7, e escore de WI  $\geq$  5 com temperatura  $>$  39,5°C. Este trabalho sugere que a utilização da Hp para a detecção de DRB está associada com a fase aguda da doença, que por sua vez, poderá ser utilizada no auxílio da escolha terapêutica, com base na fase da doença e evolução da enfermidade.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, A.; HEWSON, J.; FRANCOZ, D.; SELIM, H.; BUCZINSKI, S. Systematic Review of the Diagnostic Accuracy of Haptoglobin, Serum Amyloid A, and Fibrinogen versus Clinical Reference Standards for the Diagnosis of Bovine Respiratory Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, p. 1356–1368, 2016.
- ALBAYRAK, H.; KABU, M. Determining serum haptoglobin and cytokine concentrations in diarrheic calves. **Firat University Journal of Health Sciences**, 30, 113-117, 2016.
- AL 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. **Veterinary Journal**, v. 203, n. 2, p. 155–160, 2015.
- ALSEMGEEST, S. P. M.; JONKER, F. H.; TAVERNE, M. A. M.; KALSBECK, H. C.; WENSING, T.; GRUYS, E. Serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) plasma concentrations in newborn calves. **Theriogenology**, v. 43, n. 2, p. 381–387, 1995.
- ALY, S. S.; LOVE, W. J.; WILLIAMS, D. R.; LEHENBAUER, W.; EENENNAAM, A. Van; DRAKE, C.; KASS, P. H.; FARVER, T. B. Agreement between bovine respiratory disease scoring systems for pre-weaned dairy calves. **Animal Health Research Reviews**, v. 15, n. 2, p. 148–150, 2014.
- AMMAR, S. S. M.; MOKHTARIA, K.; TAHAR, B. B.; AMAR, A. A.; REDHA, B. A.; YUVA, B.; SI MOHAMED, H.; ABDELLATIF, N.; LAID, B. Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in western Algeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. Suppl 1, p. S318–S322, 2014.
- ANDERSEN, C. B. F.; TORVUND-JENSEN, M.; NIELSEN, M. J.; DE OLIVEIRA, C. L. P.; HERSLETH, H.-P.; ANDERSEN, N. H.; PEDERSEN, J. S.; ANDERSEN, G. R.; MOESTRUP, S. K. Structure of the haptoglobin–haemoglobin complex. **Nature**, v. 489, n. 7416, p. 456–459, 2012.
- ANGEN, Ø.; THOMSEN, J.; LARSEN, L. E.; LARSEN, J.; KOKOTOVIC, B.; HEEGAARD, P. M. H.; ENEMARK, J. M. D. Respiratory disease in calves: Microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1–2, p. 165–171, 2009.
- ARREDOUANI, M.; MATTHIJS, P.; HOEYVELD, E. V. A. N.; KASRAN, A.; BAUMANN, H.; CEUPPENS, J. L. Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. **Immunology**, p. 144–151, 2003.
- ASSIS-BRASIL, N. D.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; HINNAH, F. L.; LADEIRA, S. R. L.; SALLIS, E. S. V.; GRECCO, F. B.; SCHILD, L.; D, A. A. N.; HINNAH, F. L.; LADEIRA, S. R. L. Enfermidades diagnosticadas em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 423–430, 2013.
- AZIMPOUR, S.; POURTAGHI, H. A. Case Report of Fungal Diarrhea in a Prewaned Calf in Iran. **International Journal Enteric Pathogens**, v. 4, n. 2, p. 2–5, 2016.
- BALLOU, M. A.; SUTHERLAND, M. A.; BROOKS, T. A.; HULBERT, L. E.; DAVIS, B. L.; COBB, C. J. Administration of anesthetic and analgesic prevent the suppression

- of many leukocyte responses following surgical castration and physical dehorning. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 151, n. 3–4, p. 285–293, 2013.
- BAPTISTA, A. L.; REZENDE, A. L.; FONSECA, P. de A.; MASSI, R. P.; NOGUEIRA, G. M.; MAGALHÃES, L. Q.; HEADLEY, S. A.; MENEZES, G. L.; ALFIERI, A. A.; SAUT, J. P. E. Bovine respiratory disease complex associated mortality and morbidity rates in feedlot cattle from southeastern Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 10, p. 791, 2017.
- BASTOS, B. L.; LOUREIRO, D.; RAYNAL, J. T.; GUEDES, M. T.; VALE, V. L.; MOURA-COSTA, L. F.; GUIMARÃES, J. E.; AZEVEDO, V.; PORTELA, R. W.; 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.
- BODE, J. G.; ALBRECHT, U.; HÄUSSINGER, D.; HEINRICH, P. C.; SCHAPER, F. Hepatic acute phase proteins - Regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- $\kappa$ B-dependent signaling. **European Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 6–7, p. 496–505, 2012.
- BOSSUYT, P. M.; REITSMA, J. B.; BRUNS, D. E.; GATSONIS, C. a; GLASZIOU, P. P.; IRWIG, L. M.; MOHER, D.; RENNIE, D.; VET, H. C. W. De; LIJMER, J. G. Academia and Clinic The STARD Statement for Reporting Studies of Diagnostic Accuracy: **Annals of Internal Medicine**, v. 138, n. 1, p. 1–12, 2013.
- BOZUKLUHAN, K.; MERHAN, O.; ÖZCAN, A.; GÖKÇE, H. İ.; GÖKÇE, G. Investigation of the levels of serum haptoglobin, oxidative indicators and some biochemical parameters in calves naturally infected with *Toxocara vitulorum* [Toxocara vitulorum ile doğa enfekte buzağılarda serum haptoglobin düzeyi, oksidatif belirteçler v. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 64, n. 2, p. 75–79, 2017.
- BRASIL, N. D. A.; HINNAH, F. L.; FISS, L.; SALLIS, E. S. V; GRECCO, B.; LADEIRA, S. R. L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; LUCIA, A.; D, A. A. N.; HINNAH, F. L.; FISS, L.; SALLIS, E. S. V; GRECCO, F. B.; LADEIRA, S. R. L. Doenças respiratórias em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 33 surtos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 745–751, 2013.
- BUZINSKI, S.; FECTEAU, G., DUBUC, J.; FRANCOZ, D. Validation of a clinical scoring system for bovine respiratory disease complex diagnosis in preweaned dairy calves using a Bayesian framework. **Preventive veterinary medicine**, 156, 102-112, 2018.
- BUZINSKI, S.; OLLIVETT, T. L.; DENDUKURI, N. Bayesian estimation of the accuracy of the calf respiratory scoring chart and ultrasonography for the diagnosis of bovine respiratory disease in pre-weaned dairy calves. **Preventive veterinary medicine**, 119(3-4), 227-231, 2015.
- BURCIAGA-ROBLES, L. O.; HOLLAND, B. P.; STEP, D. L.; KREHBIEL, C. R.; MCMILLEN, G. L.; RICHARDS, C. J.; SIMS, L. E.; JEFFERS, J. D.; NAMJOU, K.; MCCANN, P. J. Evaluation of breath biomarkers and serum haptoglobin concentration for diagnosis of bovine respiratory disease in heifers newly arrived at a feedlot. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 10, p. 1291–1298, 2009.

- CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, 34(2), 85-99, 2005.
- CHASE, C. C. L. Enteric Immunity, Happy Gut, Healthy Animal Christopher. **Veterinary Clinical Food Animal**, v. 34, p. 1–18, 2018.
- CHO, Y. il; YOON, K. J. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. **Journal of Veterinary Science**, v. 15, n. 1, p. 1–17, 2014.
- CONSTABLE, P. D.; HINCHCLIFF, K. W.; DONE, S. H.; GRÜNBERG, W. **Veterinary medicine-e-book: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. Elsevier Health Sciences, 2016.
- COOKE, R. F.; ARTHINGTON, J. D. Concentrations of haptoglobin in bovine plasma determined by ELISA or a colorimetric method based on peroxidase activity. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 97, n. 3, p. 531-536, 2013.
- COURA, F. M.; FREITAS, M. D.; RIBEIRO, J.; DE LEME, R. A.; DE SOUZA, C.; ALFIERI, A. A.; FACURY FILHO, E. J.; DE CARVALHO, A. Ú.; SILVA, M. X.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Longitudinal study of Salmonella spp., diarrheagenic Escherichia coli, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 3–11, 2015.
- CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. Acute phase response in animals: A review. **Comparative Medicine**, v. 59, n. 6, p. 517–526, 2009.
- DEIGNAN, T.; ALWAN, A.; KELLY, J.; MCNAIR, J.; WARRENS, T.; O'FARRELLY, C. Serum haptoglobin: An objective indicator of experimentally-induced Salmonella infection in calves. **Research in Veterinary Science**, v. 69, n. 2, p. 153–158, 2000.
- DHAMA, K.; CHAUHAN, R. S.; MAHENDRAN, M.; MALIK, S. V. S. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 1, p. 1–23, 2009.
- DINLER, C.; ULUTAS, B.; VOYVODA, H.; ULUTAS, P. A.; URAL, K.; KARAGENC, T. Haptoglobin and serum amyloid-A concentrations and their relationship with oocyst count in neonatal lambs experimentally infected with Cryptosporidium parvum. **Veterinary Parasitology**, v. 247, n. September, p. 49–56, 2017.
- DIRKSEN, G.; GRUNDER, H. D.; STOBER, M. Rosemberg- **Exame clínico dos bovinos**. In: DIRKSEN, G. Sistema digestivo. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 166-228.
- DUDEK, K.; BEDNAREK, D.; SKA, M. S. Ś. Ś. ACUTE PHASE RESPONSE IN CALVES AS A RESULT OF EXPERIMENTAL. **Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy**, v. 54, n. May 2014, p. 517–520, 2010.
- EATON, J. W.; BRANDT, P.; MAHONEY, J. R.; LEE, J. T. Haptoglobin: a natural bacteriostat. **Science (New York, N.Y.)**, v. 215, n. 4533, p. 691–3, 1982.
- ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 23–27, 2010.
- FAGLIARI, J. J. Estudo clínico e laboratorial da pneumonia de bezerros induzida pela inoculação intrabronquial de Mannheimia haemolytica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 55(1), 8-14, 2003.

- FAGUNDES, T. F.; VIDAL, L. G. P.; ALVES, P. A. M.; DE SOUZA TASSINARI, W.; DE CÁSSIA ALVES ALCÂNTARA DE MENEZES, R.; DA FONSECA, A. H.; PEREIRA, M. J. S. Risk factors for diarrhea in a cohort of dairy heifer calves reared in individual outdoor hutches in Piraí, Rio de Janeiro, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3159–3172, 2016.
- FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 13–36, 2009.
- FRANCOZ, D.; BUCZINSKI, S.; BÉLANGER, A. M.; FORTÉ, G.; LABRECQUE, O.; TREMBLAY, D.; WELLEMANS, V.; DUBUC, J. Respiratory Pathogens in Québec Dairy Calves and Their Relationship with Clinical Status, Lung Consolidation, and Average Daily Gain. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 1, p. 381–387, 2015.
- FULTON, R. W.; BRIGGS, R. E.; PAYTON, M. E.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; RIDPATH, J. F.; BURGE, L. J.; DUFF, G. C. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline. **Vaccine**, v. 22, n. 5–6, p. 643–649, 2004.
- GÂNHEIM, C.; ALENIUS, S.; PERSSON WALLER, K. Acute phase proteins as indicators of calf herd health. **Veterinary Journal**, v. 173, n. 3, p. 645–651, 2007.
- GÂNHEIM, C.; HÖGLUND, J.; WALLER, K. P. Acute phase proteins in response to Dictyocaulus viviparus infection in calves. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 45, n. 1–2, p. 79–86, 2004.
- GÂNHEIM, C.; HULTEN, C.; CARLSSON, U.; KINDAHL, H.; NISKANEN, R.; WALLER, K. P. The Acute Phase Response in Calves Experimentally Infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus and/or Mannheimia haemolytica. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 50, p. 183–190, 2003.
- GELSINGER, S. L.; PINO, F.; JONES, C. M.; GEHMAN, A. M.; HEINRICHS, A. J. Effects of a dietary organic mineral program including mannan oligosaccharides for pregnant cattle and their calves on calf health and performance. **The Professional Animal Scientist**, v. 32, n. 2, p. 205–213, 2016.
- GONÇALVES, R. C.; KUCHEMUCK, M. R. G.; CURI, P. R.; CHIACCHIO, S. B.; ALMEIDA, C. T. de; BORGES, A. S. Diferenciação Clínica da Broncopneumonia Moderada e Grave em Bezerros. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 263–269, 2001.
- GONZÁLEZ, F. H.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J. Haptoglobina en rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas. In **Anales de Veterinaria de Murcia**, v. 23, p. 5-17, 2007.
- GULLIKSEN, S. M.; LIE, K. I.; LØKEN, T.; ØSTERÅS, O. Calf mortality in Norwegian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2782–2795, 2009.
- GUTTERIDGE, John MC. The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 917, n. 2, p. 219-223, 1987.
- FAJT, V. R.; APLEY, M. D.; BROGDEN, K. A.; SKOGERBOE, T. L.; SHOSTROM, V. K.; CHIN, Y. Effect of danofloxacin and tilmicosin on body temperatures of beef calves with pneumonia experimentally induced by inoculation with Mannheimia

haemolytica. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 5, p. 610-615, 2004.

FEITOSA, F. L. F.; BENESI, F. J. Semiologia de recém-nascidos ruminantes e equídeos. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. 3ª ed. Roca, São Paulo, p. 69-97, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Dairy Production and Products – Milk Production. Disponível em: <http://www.fao.org/dairy-production-products/en/#.V3AZwbgrLIV> Acesso em 15 abril de 2016.

FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 13–36, 2009.

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**, v. 22, n. 2, p. 227–232, 2013.

HASHISH, E. A.; EL DAMATY, H. M.; TARTOR, Y. H.; ABDELAAL, A. M. Epidemiological study of diarrheagenic Escherichia coli virulence genes in newborn calves. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 36, n. 1, 2016.

HEEGAARD, P. M. H.; GODSON, D. L.; TOUSSAINT, M. J. M.; TJØRNEHØJ, K.; LARSEN, L. E.; VIUFF, B.; RØNSHOLT, L. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, n. 1–2, p. 151–159, 2000.

HISS, S.; MIELENZ, M.; BRUCKMAIER, R. M.; SAUERWEIN, H. Haptoglobin Concentrations in Blood and Milk After Endotoxin Challenge and Quantification of Mammary Hp mRNA Expression. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 11, p. 3778–3784, 2004.

HUNTOON, K. M.; WANG, Y.; EPPOLITO, C. A.; BARBOUR, K. W.; BERGER, F. G.; SHRIKANT, P. A.; BAUMANN, H. The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity. **Journal of leukocyte biology**, 84(1), 170-181, 2008.

HUMBLET, M. COGHE, J. LEKEUX, P. GODEAU, J. Acute phase proteins assessment for an early selection of treatments in growing calves suffering from bronchopneumonia under field conditions. **Research in Veterinary Science**, v. 77, p. 41–47, 2004.

IBGE; Produção da Pecuária Municipal. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2016\\_v44\\_br.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf) >. Acesso: 20/06/ 2018.

IDOATE, I.; VANDER LEY, B.; SCHULTZ, L.; HELLER, M. Acute phase proteins in naturally occurring respiratory disease of feedlot cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, n. 3–4, p. 221–226, 2015.

JONES, G. E.; MOULD, D. L. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. **Research in Veterinary Science**, v. 37, n. 1, p. 87-92, 1984.

JOSHI, V.; GUPTA, V. K.; BHANUPRAKASH, A. G.; MANDAL, R. S. K.; DIMRI, U.; AJITH, Y. Haptoglobin and serum amyloid A as putative biomarker candidates of

naturally occurring bovine respiratory disease in dairy calves. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, n. January, p. 33–37, 2018.

KALKANOV, Ismet et al. Morphological and etiological investigations in a rotaviral enteritis outbreak in calves. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 22, n. 2, p. 309-313, 2016.

KILPI, A. J. **Serum concentrations of globulins, albumin and serum amyloid a of neonatal lambs and associations with weight gain during summer rearing period**. 2015. 38f. Doctoral teses – Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences - Estonian University of Life Sciences, 2015.

KIM, M. H., SEO, J. K., YUN, C. H., KANG, S. J., KO, J. Y., & HA, J. K. Effects of hydrolyzed yeast supplementation in calf starter on immune responses to vaccine challenge in neonatal calves. **Animal**, 5(6), 953-960, 2011.

KLEIN-JÖBSTL, D.; IWERSEN, M.; DRILLICH, M. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: A case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p. 5110–5119, 2014.

KRUEGER, L. A.; BEITZ, D. C.; ONDA, K.; OSMAN, M.; O'NEIL, M. R.; LEI, S.; NONNECKE, B. Effects of d- $\alpha$ -tocopherol and dietary energy on growth and health of preruminant dairy calves. **Journal of dairy science**, 97(6), 3715-3727, 2014.

LINDEN, T. C.; BICALHO, R. C.; NYDAM, D. V. Calf birth weight and its association with calf and cow survivability, disease incidence, reproductive performance, and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2580–2588, 2009.

MARTIN, CAMILA CECILIA. **Influência do uso precoce de antibiótico no desenvolvimento da microbiota intestinal, resposta imune e incidência de diarreias em bezerras recém-nascidas**. Dissertação. Universidade de São Paulo, 2017.

MARTÍNEZ SUBIELA, S.; TECLES, F.; PARRA, M. D.; CERÓN, J. J. Proteínas De Fase Aguda: Conceptos Básicos Y Principales Aplicaciones Clínicas En Medicina Veterinaria. **Anales de Veterinaria de Murcia**, v. 97, n. 17, p. 114, 2001.

MCGUIRK, S. M. Disease Management of Dairy Calves and Heifers. **Veterinary Clinical Food Animal**, v. 24, p. 139–153, 2008.

MORIMATSU, M.; SYUTO, B.; SHIMADA, N.; FUJINAGA, T.; YAMAMOTO, S.; SAITO, M.; NAIKI, M. Isolation and characterization of bovine haptoglobin from acute phase sera. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 18, p. 11833–11837, 1991.

MOXLEY, R. A. Escherichia coli O157: H7: an update on intestinal colonization and virulence mechanisms. **Animal health research reviews**, v. 5, n. 1, p. 15-33, 2004.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. **Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28–40, 2004.

MURRAY, C. F.; WINDEYER, M. C.; DUFFIELD, T. F.; HALEY, D. B.; PEARL, D. L.; WAALDERBOS, K. M.; LESLIE, K. E. Associations of serum haptoglobin in newborn dairy calves with health, growth, and mortality up to 4 months of age. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 12, p. 7844–7855, 2014.

- MYERS, L. L.; GUINÉE, P. A. Occurrence and characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea. **Infection and immunity**, v. 13, n. 4, p. 1117-1119, 1976.
- NOVO, S. M. F.; COSTA, J. F. dos R.; 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.
- OLAOGUN, S. C.; JEREMIAH, O. T.; JUBRIL, A. J.; ADEWUYI, O. O. Calf Diarrhea: Epidemiological Prevalence and Bacterial Load in Oyo and Ogun States. **Research in Veterinary Science**, v. 51, n. 1, p. 90–96, 2016.
- ORRO, T.; JACOBSEN, S.; LEPAGE, J. P.; NIEWOLD, T.; ALASUUTARI, S.; SOVERI, T. Temporal changes in serum concentrations of acute phase proteins in newborn dairy calves. **The veterinary journal**, 176(2), 182-187, 2008.
- ORRO, T.; POHJANVIRTA, T.; RIKULA, U.; HUOVILAINEN, A.; ALASUUTARI, S.; SIHVONEN, L.; PELKONEN, S.; SOVERI, T. Acute phase protein changes in calves during an outbreak of respiratory disease caused by bovine respiratory syncytial virus. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 1, p. 23–29, 2011.
- POULSEN, K. P.; MCGUIRK, S. M. Respiratory disease of the bovine neonate. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 25(1), 121-137, 2009.
- POURJAFAR, M.; BADIEI, K.; NAZIFI, S.; NAGHIB, S. M. Acute phase response in Holstein dairy calves affected with diarrhoea. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 14, n. 3, p. 142–149, 2011.
- QUAYE, I. K. Haptoglobin, inflammation and disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 8, p. 735–742, 2008.
- RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. WB Saunders company. **Philadelphia. USA. Pp**, p. 572-577, 2000.
- RAMOS, J. S.; KLUG, F. S. F.; BASTOS, B. L.; ROCHA FILHO, J. T. R.; AYRES, M. C. C.; GUIMARÃES, J. E. Determinação da concentração sérica de proteínas de fase aguda em equinos por técnicas espectrofotométricas. **PUBVET**, 12, 139, 2018.
- REIS, A. D. S. B.; PINHEIRO, C. P.; DE ALBUQUERQUE LOPES, C. T.; CERQUEIRA, V. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, D. Onfalopatias em bezerros de rebanhos leiteiros no nordeste do estado do Pará. **Ciência Animal Brasileira**, 1, 29-34, 2009.
- REITEN, M.; ROUSING, T.; THOMSEN, P. T.; OTTEN, N. D.; FORKMAN, B.; HOUE, H.; SØRENSEN, J. T.; KIRCHNER, M. K. Mortality , diarrhea and respiratory disease in Danish dairy heifer calves : E ffect of production system and season. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 155, n. September 2017, p. 21–26, 2018.
- 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**, 43(4), 442-447, 2006.

- ROCHA, T. G.; NOCITI, R. P.; SAMPAIO, A. A.; FAGLIARI, J. J. Hemograma e proteínas de fase aguda de bezerros saudáveis do nascimento aos 30 dias de idade. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 25-31, 2013.
- ROCHA, T. G.; SILVA, F. D. F.; BORTOLETTO, C.; SILVA, D. G.; BUZINARO, M. D. G.; ZAFALON, L. F.; FAGLIARI, J. J. Serum concentrations of acute phase proteins and immunoglobulins of calves with rotavirus diarrhea. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 4, p. 865–872, 2016.
- SABBAG, OMAR JORGE; COSTA, S. M. A. L. Análise de custos da produção de leite: aplicação do método de Monte Carlo. **Extensão Rural, Santa Maria**, v. 22, n. 1, p. 125-145, 2015.
- SCHAEFER, A. L.; COOK, N. J.; BENCH, C.; CHABOT, J. B.; COLYN, J.; LIU, T.; OKINE, E. K.; STEWART, M.; WEBSTER, J. R. Research in Veterinary Science The non-invasive and automated detection of bovine respiratory disease onset in receiver calves using infrared thermography. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 2, p. 928–935, 2012.
- SCHAEFER, A. L.; TONG, A. K. W. The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. **Research in Veterinary Science**, v. 83, p. 376–384, 2007.
- SEPPÄ-LASSILA, L.; ORRO, T.; LASSEN, B.; LASONEN, R.; AUTIO, T.; PELKONEN, S.; SOVERI, T. Intestinal pathogens, diarrhoea and acute phase proteins in naturally infected dairy calves. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 41, p. 10–16, 2015.
- SILVA, D. G.; SANTANA, A. M.; PIZAURO, L. J. L.; BERNARDES, P. A.; CLEMENTE, V.; SILVEIRA, C. R. A.; FAGLIARI, J. J. Toxocara vitulorum em bezerros bubalinos neonatos. **INVESTIGAÇÃO**, 14(6), 2015.
- SIMPLÍCIO, K. M. M. G.; SOUSA, F. C.; FAGLIARI, J. J.; SILVA, P. C. Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos saudáveis e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1339–1347, 2013.
- SOUZA, D.F.D.; MONTEIRO, A.L.G.; DITTRICH, R.L.; SCHMIDT, E.M.D.S.; FERNANDES, S.R.; BELTRAME, O.C. Dinâmica pré e pós-colostral de parâmetros bioquímicos em cordeiros. **Ciência Animal Brasileira**, 313-321, 2014.
- SVENSSON, C.; LIBERG, P.; HULTGREN, J. Evaluating the efficacy of serum haptoglobin concentration as an indicator of respiratory-tract disease in dairy calves. **Veterinary Journal**, v. 174, n. 2, p. 288–294, 2007.
- TANIWAKI, S. A. **Desenvolvimento e validação de testes sorológicos para o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) utilizando antígenos recombinantes**. Tese de doutorado, 2012.
- TEMPLETON, G. F. A two-step approach for transforming continuous variables to normal: implications and recommendations for IS research. **CAIS**, v. 28, n. 1, p. 41-58, 2011.
- THRUSFIELD, M.; CHRISTLEY, R. **Veterinary epidemiology**. Oxford: Blackwell science, 2005.
- TIMSIT, E.; ASSIÉ, S.; QUINIOU, R.; SEEGERS, H.; BAREILLE, N. Early detection of bovine respiratory disease in young bulls using reticulo-rumen temperature boluses. **The Veterinary Journal**, v. 190, n. 1, p. 136–142, 2011.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8ª ed. Roca, São Paulo, 2008.

THEILGAARD-MÖNCH, K.; JACOBSEN, L. C.; NIELSEN, M. J.; RASMUSSEN, T.; UDBY, L.; GHARIB, M.; PORSE, B. T. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. **Blood**, 108(1), 353-361, 2006.

TÓTHOVÁ, C.; NAGY, O.; SEIDEL, H.; KOVÁ, G. Acute Phase Proteins as Markers of Diseases in Farm Animals. **Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases**, 2011.

TÓTHOVÁ, C.; NAGY, O.; SEIDEL, H.; KOVÁČ, G. Acute phase proteins in relation to various inflammatory diseases of calves. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 5, p. 1037–1042, 2012.

TÓTHOVÁ, C.; NAGY, O.; NAGYOVÁ, V.; KOVÁČ, G. Changes in the Concentrations of Acute Phase Proteins in Calves during the first Month of Life / Promene Koncentracije Proteina Akutne Faze Tokom Prvog Meseca Života Teladi. **Acta Veterinaria**, v. 65, n. 2, p. 260–270, 2015.

TSENG, C. F.; HUANG, H. Y.; YANG, Y. T.; MAO, S. J. T. Purification of human haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 using monoclonal antibody affinity chromatography. **Protein Expression and Purification**, v. 33, n. 2, p. 265–273, 2004.

VANDERMEULEN, J.; BAHR, C.; JOHNSTON, D.; EARLEY, B.; TULLO, E.; FONTANA, I.; GUARINO, M.; EXADAKTYLOS, V.; BERCKMANS, D. Early recognition of bovine respiratory disease in calves using automated continuous monitoring of cough sounds. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 129, p. 15–26, 2016.

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.

WÓJCIK, ROMAN. The effect of Leiber Beta-S on selected immunity indicators in calves. **Acta Veterinaria Brno**, v. 83, n. 2, p. 113-118, 2014.

WOLFGER, B.; TIMSIT, E.; WHITE, B. J.; ORSEL, K. A systematic review of bovine respiratory disease diagnosis focused on diagnostic confirmation, early detection, and prediction of unfavorable outcomes in feedlot cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, 31(3), 351-365, 2015.

WOOLUMS, A. R.; AMES, T. R.; BAKER, J. C. **The bronchopneumonias (respiratory disease complex of cattle, sheep and goats)**. In: Smith BP, ed. Large Animal Internal Medicine, 4th ed. St Louis: Mosby, Elsevier; 602–643, 2009.

YANG, F.; FRIEDRICHS, W. E.; NAVARIJO-ASHBAUGH, A. L.; BOWMAN, B. H.; COALSON, J. J. Cell type-specific and inflammatory-induced expression of haptoglobin gene in lung. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, 73(3), 433-440, 1995.

YUEH, S. C. H.; LAI, Y. A.; CHEN, W. L.; HSU, H. H.; MAO, S. J. T. An improved method for haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 purification using monoclonal antibody affinity chromatography in the presence of sodium dodecyl sulfate. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 845, n. 2, p. 210–217, 2007.

