MAILSON RENNAN BORGES DIAS

**EFEITOS DO TRANSPORTE E DA ADAPTAÇÃO AO
CONFINAMENTO EM GARROTES PORTADORES OU NÃO DE
Mannheimia varigena NA NASOFARINGE**

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.Dr. Enrico Lippi Ortolani

São Paulo

2018

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. 3699
FMVZ

Dias, Mailson Rennan Borges
Efeitos do transporte e da adaptação ao confinamento em garrotes portadores ou não de *Mannheimia varigena* na nasofaringe / Mailson Rennan Borges Dias. – 2018.
111 f. : 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.

Orientador: Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani.

1. Confinamento. 2. Transporte. 3. Bem-estar. 4. Respiratório. 5. Gado. I. Título.

ERRATA

Dias, M. R. B. **Efeitos do transporte e da adaptação ao confinamento em garrotes portadores ou não de *Mannheimia varigena* na nasofaringe.** 2018. 111 f.
Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Página	Onde se lê	Leia-se
Resumo	93 f.	111 f.
Abstract	93 f.	111 f.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Ação da tildipirosina na modulação da microbiota nasofaríngea de bovinos confinados submetidos ao transporte", protocolada sob o CEUA nº 8019310118 (10.00499), sob a responsabilidade de **Enrico Lippi Ortolani** e equipe; **MAILSON RENNAN BORGES DIAS** - 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 14/03/2018.

We certify that the proposal "Action of tildipirosin in the modulation of the nasopharyngeal microbiota of confined beef cattle submitted to transport", utilizing 48 Bovines (48 males), protocol number CEUA 8019310118 (10.00499), under the responsibility of **Enrico Lippi Ortolani** and team; **MAILSON RENNAN BORGES DIAS** - 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 03/14/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2018** a **05/2018**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos**

idade: **18 a 24 meses**

N: **48**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **300 a 450 kg**

Local do experimento: **FAZENDA CAMBARÁ**

São Paulo, 28 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: DIAS, Mailson Rennan Borges

Título: **Efeitos do transporte e da adaptação ao confinamento em garrotes portadores ou não de *Mannheimia varigena* na nasofaringe**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-Graduação em Clínica veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, por permitir que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Ilson e Sandra por acreditarem em mim e me incentivarem a crescer sempre, me dando suporte afetivo e financeiro fundamentais na minha formação como pessoa e profissional.

Aos meus irmãos, Murilo e Marcel por me ensinarem a viver, me ensinando muito sobre a vida, por vezes com seus próprios erros, sendo sempre meus melhores amigos desde a infância.

A todos os familiares que torceram e se orgulham de mim.

AGRADECIMENTOS

Obrigado a todas as pessoas que contribuíram com a execução deste trabalho, direta ou indiretamente, saibam que toda ajuda prestada jamais será esquecida.

Ao meu orientador e mentor intelectual, Professor **Enrico Lippi Ortolani**, por toda compreensão em minhas dificuldades e limitações como estudante, por toda experiência e conhecimento compartilhado, obrigado por acreditar e confiar mim, me encorajando sempre a expandir meus limites.

A Professora **Andrea Micke Moreno** pela paciência e apreço demonstrados para comigo e com este trabalho.

Ao Professor **Saulo da Luz e Silva** pela confiança e prontidão às necessidades exigidas para que este trabalho acontecesse.

A **Rejane dos Santos Sousa** pela amizade, companheirismo e por todo conhecimento compartilhado.

A **Francisco Leonardo Costa de Oliveira** pela amizade e parceria demonstradas tanto na faculdade quanto em casa.

A **Natalia Sato Minami** pela amizade e dedicação para comigo e os demais companheiros de equipe.

A todos os funcionários, pós-graduandos e estagiários do **Laboratório de Sanidade Suína e Virologia - LSSV** pela amizade e agradável convívio em especial a pós-doutoranda **Luisa Zanolli Moreno** e as técnicas **Ana Paula Santos da Silva** e **Rosilma Andrade Louro** por toda dedicação, responsabilidade e compromisso com as amostras e processamentos microbiológicos empregados neste estudo.

A **Clara Mori** pela amizade e dedicação ao ensinar como manipular as amostras e os aparelhos laboratoriais utilizados nesta pesquisa.

As técnicas laboratoristas **Claudia Regina** e **Maria Helena** pela ajuda, paciência e gentileza demonstradas para comigo.

Ao Grande amigo e Companheiro **Antônio Celso Schmidt** pela irmandade e consideração demonstradas para comigo, antes, durante e após o manejo dos animais envolvidos no presente trabalho.

A todos os Professores do Departamento da Clínica Médica de ruminantes por acreditarem em mim e confiarem no meu trabalho, desde a residência até o Mestrado: **Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Fabio Celidônio Pogliani, Fernando José Benesi, Lilian Gregory, Maria Claudia Araripe Sucupira e Viviani Gomes**. E aos demais professores das outras especialidades do departamento de clínica médica veterinária da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Ao meu primeiro professor de Clínica de Ruminantes Professor **Milton Ricardo Azedo** por ter me ensinado a base necessária para chegar até aqui e por ter me apresentado à comunidade FMVZ - USP.

A Agência **Capes** e ao departamento de **Clínica Veterinária** por fomentarem bolsa de estudo durante a maior parte do período deste mestrado.

...Cante pelo ano, Cante pelo sorriso, Cante pelas lagrima, Cante comigo,
mesmo que só por hoje, pode ser que amanhã o bom Deus te chame... Sonhe,
sonhe até seus sonhos se tornarem realidade...

(Aerosmith – Dream On)

RESUMO

DIAS, M. R. B. Efeitos do transporte e da adaptação ao confinamento em garrotes portadores ou não de *Mannheimia varigena* na nasofaringe. [Effects of transportation and adaptation of steers to the feedlot with and without *Mannheimia varigena* in the nasopharyngeal].2018. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Objetivou-se estudar efeitos negativos do transporte ao confinamento e do período de adaptação neste, assim como avaliar a presença de bactérias possivelmente patogênicas na nasofaringe durante este processo. Foram empregados 48 bovinos machos da raça Nelore, com 372 ± 27 kg de peso corpóreo, os quais viajaram ao confinamento, em caminhões-gaiola, em torno de 167 km, com duração de 4 h. Os mesmos foram pesados na saída, chegada e 48 h após. Amostras de sangue da veia jugular e *swab* da nasofaringe foram obtidos nos mesmos momentos e no 10º d, com exceção da saída. Para a obtenção do *swab* foi empregado zaragatoa acoplada à pinça *Allis*, ambas com 15 cm. O volume globular (VG) foi analisado no sangue total e a partir dessa variável foi calculado o déficit de volume plasmático (DVP). No soro foram determinados os teores de albumina e globulinas, calculando-se sua relação. O material do *swab* foi semeado em ágar sangue de carneiro (5%) com base Columbia e ágar McConkey e alíquotas desta cultura foram submetidas à técnica MALDI-TOF MS. Para a identificação bacteriana pelo espectro proteico, foi utilizado o programa BioTyper™. As colônias bacterianas identificadas pelo MADI-TOF MS como pertencentes a família *Pasteurellaceae* foram submetidas à identificação pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Dessa família foi isolada, pela primeira vez no Brasil, apenas *Mannheimia varigena* em 31,2 % dos animais, no dia da chegada ao confinamento, desaparecendo em seguida. Identificaram-se também bactérias do

gênero *Bacillus* spp., que inibe o crescimento do gênero *Mannheimia* spp., principalmente dos animais negativos (93,7%) e em menor frequência (46,7%) dos positivos. Bovinos positivos à *M. varigena* perderam percentualmente mais peso ($p = 0,045$) durante a viagem que os negativos, não existindo diferença na 48ª h ($p = 0,117$). Quanto mais leve foi o bovino maior foi a sua perda de peso ($p < 0,0001$) e seu grau de desidratação ($p = 0,005$) durante a viagem, recuperando essa última variável parcialmente durante a adaptação. Nesse período a desidratação espelhou positivamente o peso perdido ($r = 0,65$). A viagem e a adaptação estimularam a produção de globulinas, em especial nos positivos no 10º d ($p = 0,023$). A desidratação identificada foi de grau leve em 20% dos animais e moderada em 17,8%. O DVP identificou melhor o grau de desidratação que o VG. O estresse do transporte e a adaptação não foram suficientes para desencadear quadros respiratórios nas reses positivas para *M. varigena*.

Palavras-chave: Confinamento. Transporte. Bem-estar. Respiratório. Gado.

SUMMARY

DIAS, M. R. B. Effects of transportation and adaptation of steers to the feedlot with and without *Mannheimia varigena* in the nasopharyngeal. [Efeitos do transporte e da adaptação ao confinamento em garrotes portadores ou não de *Mannheimia varigena* na nasofaringe]. 2018. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

This survey studied the negative effects of transportation and adaptation of steers shipped to a feedlot, as well analyzed the presence of possible pathogenic bacteria in the nasopharyngeal during these events. Forty-eight male Nellore steers (372 ± 27 kg B.W.) travelled 167 km in trucks to the feedlot, for 4 h. The cattle was weighted on the departure, arrival and 48 h later. Jugular blood samples and swab of the nasopharyngeal were collected on the same schedule, but the departure, and on the 10th d. The nasopharyngeal samples were obtained with the use of a swab attached to an Allis' clamp, both with 15 cm length. The globular volume (GV) was measured in the total blood and from this variable, the plasma volume deficit (PVD) was calculated. Serum albumin and globulin, as well its ratio were also determined. The swab was plated onto sheep blood agar (5%), Columbia base and MacConkey agar, and samples of this culture were analyzed by a MALDI-TOF MS technique. For bacterial identification by the protein mass spectrum biomarker a BioTyperTM program was used. The colonies identified as *Pasteurellaceae* family were submitted for identification by partial sequencing of gene 16S rRNA. From this family was isolated, by the first time in Brazil, *Mannheimia varigena* in 31.2% of the steers, on the arrival, which disappeared thereafter. Bacteria from the genus *Bacillus*, which inhibits the genus *Mannheimia*, were also identified in the negative (93.7%) and less frequently (46.7%) in positive steers. Positive cattle to

M. varigena lost more weight during the shipment than the negatives ($p = 0.045$), but no difference was found at the 48th h ($p = 0.117$). The lighter the steer, the greater the lost of weight ($p < 0.0001$) and the degree of dehydration ($p = 0.005$), recovering partially the hydration at the 48th h. During adaptation, the higher the dehydration, the bigger the weight loss ($r = 0.65$). The trip and adaptation enhanced the globulin levels, mainly in the positive steers at day 10 ($p = 0.023$). The degree of dehydration was light in 20% of the animals and moderate in another 17.8 %. The PVD identified better the the degree of dehydration rather than VG. The stress of transport and adaptation was not enough to trigger respiratory disease in the positive steer to *M. varigena*.

Keywords: Feedlot. Transport. Welfare. Respiratory. Cattle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Relação do peso corpóreo (kg) nos bovinos em geral, na saída, e a perda de peso (%) ocorrida no transporte.....59.

FIGURA 2 – Relação do peso corpóreo (kg) nos bovinos em bovinos positivos para *M. varigena*, na saída, e a perda de peso (%) ocorrida no transporte.....60.

FIGURA 3 – Relação do peso corpóreo (kg) nos bovinos em bovinos negativos para *M. varigena*, na saída, e a perda de peso (%) ocorrida no transporte.....61

FIGURA 4 – Relação entre o peso corpóreo (kg) dos bovinos em geral, no momento da saída, e o volume globular (%) na chegada dos mesmos.....62

FIGURA 5 – Relação entre o peso corpóreo (kg) dos bovinos positivos para *M. varigena*, no momento da saída, e o volume globular (%) na chegada dos mesmos.63.

FIGURA 6 – Relação entre o peso corpóreo (kg) dos bovinos negativos para *M. varigena*, no momento da saída, e o volume globular (%) na chegada dos mesmos.64.

FIGURA 7 – Relação entre o peso corporal de todos os animais (kg) no momento de saída e o Déficit do Volume Plasmático (DVP %) na chegada.....65.

FIGURA 8 – Relação entre o peso corporal (kg) dos animais positivos para *M. varigena* e o percentual de déficit do volume plasmático (DVP %), no momento da chegada.....66.

FIGURA 9 – Relação entre o peso corporal (kg) e o déficit de volume plasmático (DVP %), dos animais negativos para *M. varigena*, no dia da chegada.....67.

FIGURA 10 – Relação entre a perda de peso corpóreo (%) calculados pela diferença percentual do dia zero menos o 2º dia de permanência no confinamento nos animais positivos.....68.

FIGURA 11 – Relação entre a Diferença do Peso Corpóreo e o déficit do volume plasmático do dia 0 menos o dia 2 (%), nos animais negativos.....69.

FIGURA 12 – Relação entre a diferença do volume globular e o déficit do volume plasmático do dia 10 menos o dia 0 (chegada) de confinamento.....70.

FIGURA 13 – Relação entre o peso corporal(kg) de todos os animais e os teores de globulina sérica (g/L) no 10º dia de confinamento.....71.

FIGURA 14 – Relação entre o peso corporal dos animais (kg) positivos e os teores de globulina sérica (g/L) dos animais no 10º dia de confinamento.....72.

FIGURA 15 – Peso corporal dos animais negativos para *M. varigena* em relação ao teor de globulina sérica (g/L) no 10º dia de confinamento.....73.

FIGURA 16 – Relação entre o peso corpóreo (kg) e a relação Albumina/Globulina de todos os animais no 10º dia de confinamento.....74.

FIGURA 17 – Relação entre o peso corporal (kg) e a relação Albumina/Globulina dos bovinos positivos para *M.varigena*. no 10º dia de confinamento.....75.

FIGURA 18 - Relação entre o peso corporal dos animais (kg) negativos e a relação Albumina/Globulina, no 10º d de confinamento.....76.

FIGURA 19 – Dendrograma ilustrando as relações entre os perfis de restrição das estirpes de *Mannheimia varigena* caracterizadas pelo polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados.....82.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Frequência de bactérias do gênero *Bacillus spp.* Provenientes da nasofaringe de bovinos positivos e negativos para *M. varigena* identificadas pela técnica de MALDI-TOF no decorrer de 10 dias de chegada ao confinamento.....58.

QUADRO 2 – Identidade (%) das sequências de nucleotídeos do gene 16S (rRNA) para as estirpes estudadas.....81.

LISTA DE IMAGENS

IMAGEM 1 – Interação hospedeiro-bactéria-ambiente na Infecção pulmonar por *Mannheimia haemolytica*.....29.

IMAGEM 2 – Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as espécies de *Mannheimia* com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA Os valores de *bootstrap* apresentados nos ramos correspondentes foram avaliados a partir de 500 réplicas.....80.

IMAGEM A – Bovinos confinados em baia coletiva.....38.

IMAGEM B – Alimentação dos bovinos com silagem de milho.....40.

IMAGEM C – Medição do *Swab* acoplado á pinça *allis* e do tubo de silicone utilizado.....42.

IMAGEM D – Contenção e coleta de material biológico por meio de *swab* nasofaríngeo.....43.

IMAGEM E – *Swab* nasofaríngeo demonstrativo em peça anatômica.....43.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Frequência de *M. varigena* nos diferentes tempos.....52.

TABELA 2 – Pesos corpóreos médios dos bovinos nos diferentes tempos (saída, chegada e 48h) e a perda de peso (%) destes animais nos intervalos entre as pesagens de cada tempo.53..

TABELA 3 – Valores percentuais de volume globular (VG) e de déficit de volume plasmático, calculado pela primeira variável, em bovinos positivos e negativos para *M. varigena*.....54.

TABELA 4 – Efeito do período de transporte e adaptação em relação a perda de volume plasmático (%).55.

TABELA 5 – Teores de Albumina (Alb), Globulina (Glob) e da relação Albumina/Globulina (A:G) dos animais positivos e negativos nos diferentes dias de confinamento.....57.

TABELA 6 – Descrição das 24 estirpes isoladas a partir dos 16 bovinos avaliados.....78.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

d..... Dia

h..... Hora

kg..... Quilos

DVP..... Déficit do volume plasmático

Ht..... Hematócrito

VP..... Volume Plasmático

Alb Albumina

GlobGlobulina

A:GRelação Albumina/Globulina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Importância Econômica do Complexo respiratório bovino (CRB).....	24
2.2 O transporte do gado	25
2.3 Etiopatogenia da Febre do Transporte	27
2.4 Diagnóstico.....	30
2.5 Microbiota da nasofaringe bovina.....	31
2.6 <i>Manheimia varigena</i> e a identificação molecular.....	33
3. HIPÓTESES.....	35
4. OBJETIVOS	36
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5.1 Animais, transporte e manejo.....	37
5.2 Coleta de amostras biológicas	41
5.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	44
5.3.1 Amostras de sangue	44
5.3.2 <i>Swab</i> da naso-faringe.....	45
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS	46
5.4.1 Identificação por Maldi-Tof MS.....	46
5.4.2 Identificação pelo sequenciamento parcial de 16S rRNA.....	47
5.4.2.1 Extração de DNA.....	47
5.4.3 Sequenciamento parcial de 16S rRNA.....	48

5.4.4 Análise filogenética do 16s rRNA	49
5.4.5 Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)	49
5.5 OUTROS CÁLCULOS MATEMÁTICOS PARA OBTENÇÃO DOS VALORES ESTUDADOS	50
5.5.1 Cálculo da perda de volume plasmático (%)	50
5.6 MÉTODOS ESTATÍSTICOS	51
6. RESULTADOS	52
6.1 FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>MANNHEMIA</i> SP. NA NASO-FARINGE DE BOVINOS DA RAÇA NELORE	52
6.1.1 Pesos médios dos animais nos diferentes momentos e suas respectivas perdas de peso.....	53
6.1.2 Variáveis sanguíneas (VG, DVP E VP) utilizadas para avaliar a desidratação e a perda de peso decorrente	54
6.1.3 Teores de albumina (Alb), globulina (Glob) e relação albumina/globulina (A:G) nos diferentes momentos.....	56
6.2 RELAÇÕES DOS PESOS CORPÓREOS (KG) DOS ANIMAIS E SUAS RESPECTIVAS PERDAS DE PESO (%) NO TRANSPORTE.	59
6.2.1 RELAÇÕES ENTRE OS PESOS CORPÓREOS (KG) E AS VARIÁVEIS SANGUÍNEAS (VG, DVP E VP) ESTUDADAS PARA AVALIAR A DESIDRATAÇÃO E A PERDA DE PESO DECORRENTE.	62
6.2.2 TEORES DE GLOBULINA SÉRICA EM RELAÇÃO AO PESO DOS ANIMAIS.....	71
6.2.3 RELAÇÃO ENTRE O PESO CORPÓREO E A RELAÇÃO ALBUMINA/GLOBULINA	74
6.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	77
6.3.1 Identificação por sequenciamento genético parcial (16S rRNA) e análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)	79

7. DISCUSSAO	83
8. CONCLUSÃO.....	102
9. REFERÊNCIAS.....	104

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte tem passado por profundas modificações nas últimas décadas, com aumento gradual da produtividade, do desfrute, da fertilidade dos rebanhos, sem ter evoluído no mesmo patamar no concernente à sanidade. Essa melhora tem provocado o robustecimento de setores definidos na pecuária que se especializaram em recria e engorda, com destaque ao crescimento dos confinamentos no Brasil contemporâneo (PIRES, 2010)

Segundo (ORTOLANI, 2018), cerca de 80 % dos bovinos brasileiros têm sido deslocados, ao menos uma vez na vida de propriedade para propriedade ou para o abate. Diferentemente, de décadas anteriores onde as reses eram mais deslocadas por via férrea ou tocados a cavalo, hoje a maioria dessas conduções se faz por caminhões-gaiola (ORTOLANI, 2018). Esse autor chama a atenção que os estudos nacionais dos efeitos negativos desse transporte têm sido voltados apenas para animais destinados ao abate, e não aos bovinos enviados para recria e engorda.

A doença respiratória tem sido relatada como a principal enfermidade que acomete os bovinos nos nossos confinamentos e nos principais centros de engorda de países mais tradicionais nesta especialidade (MILLEN et al., 2009); (TIMSIT et al., 2013) (ORTOLANI, 2016); (CONSTABLE et al., 2016) Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que a doença respiratória ocorre principalmente nas duas primeiras semanas de chegada dos animais ao confinamento (SANDERSON; DARGATZ; WAGNER, 2008; TAYLOR ET AL. 2010; CONSTABLE et al. (2017)). Desde muito, vários autores têm relacionado o desenvolvimento dos quadros respiratórios após a ocorrência de eventos que gerem estresse, tais como o transporte, o manejo inicial, o período de adaptação ao novo ambiente e dieta etc., os quais provocam queda nos mecanismos de defesa sistêmicos e do trato respiratório, propiciando a

multiplicação de bactérias possivelmente patogênicas, residentes no sistema respiratório anterior seguido de invasão dos pulmões, pleuras etc.

Devido a complexidade dessas relações e melhor compreensão desses temas o assunto será revisado no capítulo seguinte.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância Econômica do Complexo respiratório bovino (CRB)

No Brasil, o complexo respiratório bovino (CRB) representa o principal problema sanitário dos confinamentos de gado de corte, chegando a representar mais de 50% do total de problemas diagnosticados segundo os principais gerentes e nutricionistas nacionais (MILLEN et al., 2009). O que se sabe até então, é que a maior frequência dos quadros de CRB em bovinos confinados no Brasil é idêntica ao descrito nos Estados Unidos, ou seja, nos primeiros 20 dias de engorda. No ano de 2015, foi estimado o prejuízo econômico provocado pelo CRB num grande confinamento, da região sudeste, com 47.358 bovinos. Computaram-se, para tal, os gastos oriundos do tratamento e diminuição no ganho de peso de animais com CRB (n= 9.488), daqueles que sucumbiram por tal enfermidade (n=33) e os prejuízos inerentes às sequelas causadas pelos casos não detectados clinicamente, estimados em 15% do rebanho e o montante financeiro foi espantoso e atingiu R\$ 1.964.147,00. (ORTOLANI, 2016)

O complexo respiratório bovino representa cerca de 70 a 80% da morbidade, e de 40 a 50% da mortalidade dos animais confinados na América do Norte (GRIFFIN et al., 2010); (SMITH, 1998). Com um impacto econômico na indústria de carne bovina dos Estados Unidos ultrapassando os US\$4 bilhões por ano, valor no qual incluem-se queda da produtividade, custos com tratamentos e mortalidade (CERNICCHIARO et al., 2012). A identificação de fatores de risco para o aumento da ocorrência de doenças respiratórias é uma ferramenta valiosa para tomadas de decisão no manejo do confinamento, além do mais, informações confiáveis sobre os fatores de risco e sobre as taxas de morbidade esperadas para cada grupo animal são úteis no planejamento de

mão de obra e no desconto ou bonificação de prêmios dos funcionários (SANDERSON; DARGATZ; WAGNER, 2008)

2.2 O transporte do gado

Há muitas décadas se estuda os efeitos negativos do transporte em bovinos, sendo o assunto devidamente registrado e revisado por (HAILS, 1978) Desde o século passado já foi denominada uma enfermidade chamada de “Shipping Fever”, cuja tradução ao pé-da-letra seria: “Febre do transporte”, resignada aos bovinos norte-americanos de engorda que eram submetidos a longos transportes, os quais desenvolviam poucos dias depois da chegada ao confinamento um quadro pulmonar, causado pela então *Pasteurella haemolytica*, a qual era incriminada como principal responsável pelos casos de pneumonia nestes animais (TAYLOR et al., 2010a) O impacto do estresse do transporte tem gerado preocupações econômicas e de bem estar animal devido a sua associação com aumento na incidência do complexo respiratório bovino (DUFF; GALYEAN, 2007)

Confinamentos comerciais que recebem o gado recém transportado de diversas distâncias e diferentes origens, necessitam de informações sobre o tipo de manejo desenvolvido em cada propriedade de origem, tanto para estabelecer o preço na compra do lote, quanto para poderem se antecipar aos efeitos indesejáveis decorrentes de um manejo ruim, o que pode influenciar diretamente sobre o desempenho destes animais no confinamento, tanto a experiência prática como a pesquisa científica indicam que os animais jovens podem ser mais afetados pelo transporte do que os animais mais velhos e saudáveis que estão em boas condições (GRANDIN, 2007) É provável que os bovinos jovens e mais leves, sejam mais frágeis, tendo menos oportunidades de exposição a potenciais patógenos ao longo do tempo e, portanto, possuam menos imunidade, o gado mais jovem também pode sofrer mais estresse na transição para o confinamento e pode responder de forma menos eficiente à

exposição aos patógenos respiratórios em comparação com o gado mais velho (SANDERSON; DARGATZ; WAGNER, 2008)

A maioria das perdas de peso vivo durante o transporte podem ser atribuídas aos efeitos da retirada da alimentação e água, o conteúdo do tubo digestivo pode representar de 12 a 25% do peso vivo dos animais. (GRANDIN, 2007) Além disso os animais perdem peso vivo como consequência da excreção de dejetos, evaporação por sudorese e troca respiratória (TARRANT, 1990). O gado pode perder aproximadamente até 1% do seu peso vivo por hora entre a 3ª e a 4ª hora de transporte e mais 0,25% por hora de transporte entre a oitava e a décima hora (FIKE; SPIRE, 2006); (CONSTABLE et al., 2016). Foi verificado aumento nos níveis de cortisol sanguíneo e redução na atividade fagocítica dos macrófagos alveolares de bovinos submetidos ao transporte no Japão, no estudo em questão o tempo de viagem foi de 4h e a atividade dos macrófagos permaneceu diminuída por pelo menos sete dias após, demonstrando a influência do transporte sobre a imunidade pulmonar destes animais (ISHIZAKI; HANAFUSA; KARIYA, 2005). Bovinos que são usualmente considerados de alto risco para desenvolver doença respiratória no início do período de alimentação são os animais recentemente desmamados, leves, misturados, provenientes de leilões, etc.. (DEDONDER; APLEY, 2015)

2.3 Etiopatogenia da Febre do Transporte

A etiopatogenia da “Febre do Transporte” não está bem definida, e vários fatores predisponentes como estresse, alterações nutricionais e condições ambientais (desmame, transporte, taxa de lotação e mistura de lotes) se combinam para impactar a susceptibilidade do hospedeiro (HODGSON et al., 2012). Desta forma, microrganismos oportunistas beneficiam-se não somente pelo prejuízo na microbiota sadia residente. Mas também, quando as infecções virais e os efeitos neuro-humorais do estresse que prejudicam a defesa imunológica sistêmica e local do animal (GRIFFIN et al., 2010). Uma das antigas hipóteses do surgimento da febre do transporte (shipping fever) está ligada a intensidade de perda de peso, em parte (50%) por esvaziamento do rúmen, intestinos e bexiga, e na outra metade por perda de fluidos intra e extracelular que levam a desidratação, somado aos efeitos do estresse que leva a imunodepressão, neste processo (FIKE; SPIRE, 2006); (CONSTABLE et al., 2016).

O estado de hidratação é fundamental na manutenção de uma série de atividades na homeostase dos animais (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010); (EARLEY; BUCKHAM SPORER; GUPTA, 2017). No concernente ao trato respiratório uma adequada hidratação está ligada a dois processos, um deles é a plena movimentação dos cílios da mucosa respiratória para eliminar partículas maiores que adentram o trato respiratório. O outro processo está ligado a produção do muco ciliar, tanto nas camadas externas do trato anterior respiratório como nas vias aéreas pulmonares, onde são produzidas secreções líquidas pelas glândulas submucosas e células taça que fornecem uma camada de proteção contra partículas inaladas, aerossóis e patógenos microbianos. Essas secreções contêm substâncias antimicrobianas, pró e anti-inflamatórias, imunomoduladoras e cicatrizantes de microferidas locais. (CASWELL, 2014).

Os fatores de virulência dos patógenos bacterianos variam e são diversificados entre formação de biofilme, presença de cápsulas, adesinas, toxinas ou enzimas. Esses são mecanismos são facilitadores da colonização bacteriana no trato respiratório inferior, que dificultam a resposta do sistema imune, aumentam a resistência aos antibióticos, destroem o epitélio respiratório e geram intensa resposta inflamatória (FULTON et al., 2009) A *Mannheimia haemolytica* é responsável por provocar lesões destrutivas pelas leucotoxinas e lipopolissacarídeos, além das adesinas específicas que são as mediadoras de aderência ao epitélio traqueal (PANCIERA; CONFER, 2010); (RICE et al., 2007).

É sabido que a secreção de muco-ciliar juntamente a ação dos cílios reduzem a colonização de *Mannhemia haemolytica* no trato respiratório. Porém, quadros de desidratação sistêmica diminuem a produção dessa substância tornando-a mais viscosa e aumentando a produção de substância mucoide, a qual pode propiciar colonização de patógenos bacterianos, acúmulo de partículas inaladas e menor vibração ciliar, portanto, o estado de hidratação é bastante importante para as defesas respiratórias, em especial para a atividade da produção de muco ciliar, que pode estar diminuído após o estresse de viagem em bovinos (CASWELL, 2014).

Imagem 1 - Interação hospedeiro-bactéria-ambiente na Infecção pulmonar por *Mannheimia haemolytica*.

Fonte: (DIAS, M.R.B, 2018) adaptado de Rice et al., 2008.

Nota: Homeostase no estado comensal (A); Fatores ambientais ditam o desequilíbrio para favorecer a colonização pulmonar e a doença (B); Estratégias de intervenção reestabelecem a homeostase (C).

2.4 Diagnóstico

Tradicionalmente, técnicos que trabalham em sanidade dentro dos confinamentos têm limitada sensibilidade (62%) para detectar o CRB, baseado apenas nos sinais subjetivos de comportamento e atitude dos animais, no decorrer de sua evolução o bovino para escapar de seus predadores tendeu a mascarar sinais de fraqueza e doença, principalmente quando estão frente à presença humana (WHITE; RENTER, 2009).

Bovinos com CRB geralmente são detectados tardiamente ou passam despercebidos não sendo devidamente diagnosticados no confinamento (WHITE; RENTER, 2009). Além disso, certos sinais clínicos comuns deparados em bovinos doentes, tais como depressão do estado geral, perda do apetite e aumento de temperatura retal, nem sempre são específicos de CRB, fazendo com que grande percentual (63%) de animais tratados como positivos para CRB não esteja verdadeiramente afetado com este quadro (TIMSIT et al., 2011).

Como a eficiência dos tratamentos depende da intervenção precoce em quadros de CRB é fundamental o desenvolvimento de técnicas diagnósticas com alta especificidade e precisão para detectar tal complexo. Porém, ainda faltam maiores estudos para selecionar os melhores métodos de diagnóstico do CRB ao “pé-do-animal” para auxiliar a tomada de decisões do médico veterinário dentro de um confinamento (WOLFGER et al., 2015).

Um dos grandes problemas na seleção desses métodos diagnósticos é a comparação deles com um teste ou análise que seja considerado “padrão-ouro”. Os autores em geral são unânimes em afirmar que funcionaria como padrão-ouro a comprovação “*in situ*” da lesão pulmonar no exame necroscópico, desde que o exame diagnóstico tenha sido realizado momentos antes do sacrifício ou abate do bovino, o qual por motivos éticos ou econômicos é usualmente não realizado (WOLFGER et al., 2015). Vários

estudos demonstraram a correlação positiva entre o achado das bactérias *Manheimia haemolytica*; *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* em swabs nasais e nos tecidos pulmonares de bovinos acometidos por CRB, podendo-se afirmar que o swab tem um fator preditivo de 100%, em especial em relação a detecção de *Manheimia haemolytica* (COUTINHO et al., 2009);(IVES; RICHESON, 2015).

2.5 Microbiota da nasofaringe bovina

Estudando a microbiota da nasofaringe de garrotes jovens confinados, que apresentaram ou não quadros respiratórios, (HOLMAN et al., 2015) identificaram em 80% dos bovinos doentes a presença de *M. haemolytica* e em 60% dos sadios a mesma presença desta bactéria no dia da chegada ao confinamento. Ainda falta melhor definição dos agentes causais deste complexo de doenças no rebanho nacional, embora pelos aspectos clínicos e pelos resultados nos tratamentos realizados dos casos de CRB acredita-se que as bactérias tenham papel preponderante e sejam os principais desencadeadores do quadro (ORTOLANI, 2016).

A compreensão da microbiota nasofaríngea é uma importante lacuna a ser preenchida na sanidade bovina, pois é composta por uma rica e diversificada comunidade microbiana a colonização da nasofaringe de bovinos jovens aumenta de acordo com a idade, e a imunidade do hospedeiro é importante no controle do supercrescimento de patógenos no trato respiratório superior (TRS), existem evidências recentes de que a composição da microbiota nasofaríngea tem um papel crucial na determinação da saúde respiratória em ruminantes. (WOLDEHIWET; MAMACHE; ROWAN, 1990; DEDONDER; APLEY, 2015); (HOLMAN; TIMSIT; ALEXANDER, 2015).

No começo da vida os bezerros adquirem *M. haemolytica* através do contato com sua mãe e interação com outros bovinos, esta bactéria reside na nasofaringe e tonsilas sendo este último considerado o principal reservatório

(RICE et al., 2007). Diversas bactérias com potencial patogênico para causar infecção pulmonar são habitantes comuns no TRS de bovinos adultos clinicamente sadios. Bactérias da família *pasteurellaceae* e *Mollicutes* envolvidas no complexo respiratório bovino como: *Pasteurella* spp, *Manheimia* spp e *Mycoplasma* spp respectivamente, entre outras, podem estar presentes no TRS atuando como microorganismos comensais (FULTON et al., 2009); (TIMSIT et al., 2016). Porém sob condições específicas, elas podem se multiplicar de maneira exponencial e obter acesso aos pulmões por inalação (CASWELL, 2014).

Autores nacionais como (COUTINHO et al., 2009) encontraram a presença do Gênero *Bacillus* spp em amostras coletadas da nasofaringe de bezerros antes e após a indução de Mannheimiose, apontando a presença do Gênero *Bacillus* spp. como fruto de uma possível contaminação nas amostras.

No estudo realizado por CORBEIL et al. (1985) estes autores demonstram *in vitro* que numa colonização mista de *Bacillus* spp. e *Pasteurella* spp. este último tem seu crescimento inibido, não conseguindo se desenvolver bem próximo as colônias de *Bacillus* spp. Os mesmos autores afirmam que o *Bacillus* spp. foi o melhor inibidor de crescimento sobre as colônias da Família *Pasteurellaceae* no estudo, sugerindo ainda que a instilação intranasal de *Bacillus* spp obtidos da própria nasofaringe bovina antes do transporte, podem ajudar na prevenção da febre do transporte “shipping fever”. (GAETA, 2016) também concorda em seus achados microbiológicos que a alta frequência de *Bacillus* spp em suas amostras pode ter inibido o crescimento de algumas *Pasteurellaceas* destacando no trabalho a ausência de isolamento de *M. haemolytica* e *P. Multocida*.

2.6 *Manheimia varigena* e a identificação molecular

O complexo "*Pasteurella haemolytica*" foi reclassificado e foi definido um novo gênero, denominado *Manheimia* que inclui pelo menos as seguintes seis espécies: *M. glucosida*, *M. ruminalis*, *M. haemolytica*, *M. granulomatis*, *M. caviae* e *M. varigena* (SUÁSTEGUI-URQUIJO et al., 2015); ANGEN et al., 1999). A *M. haemolytica* é sem dúvida a mais importante do grupo e tem sido tradicionalmente associada aos quadros agudos de pleuropneumonia fulminante evidenciadas nas primeiras semanas de confinamento, é uma bactéria Gram-negativa e tem 12 sorotipos capsulares reconhecidamente ativos, sendo os sorotipos 1 (S1) e 6 (S6) os mais prevalentes nos casos de broncopneumonia fibrinosa necrosante em bovinos (RICE et al., 2007).

Segundo a literatura disponível a *Mannheimia varigena* também faz parte da microbiota normal do trato respiratório superior e trato gastrointestinal de ruminantes, é uma bactéria do tipo Gram-negativa que no passado raramente foi associada à broncopneumonia fibrinonecrótica em bovinos confinados, no entanto, mais recentemente tem sido isolada de pulmões bovinos pneumônicos, casos de mastite, e casos septicêmicos de bovinos e suínos (BISGAARD, 1993); (BLACKALL; BISGAARD; STEPHENS, 2002); (SUÁSTEGUI-URQUIJO et al., 2015); (RÉRAT et al., 2012). Trata-se de um patógeno oportunista que pode ser encontrado na nasofaringe de bovinos assintomáticos e em outros ruminantes, no entanto, tem sido mais comumente isolada do gado com febre do transporte (DOUSSE et al. 2008; HARHAY et al. 2014; RÉRÁT et al. 2012). Apesar das características bioquímicas e genéticas serem diferentes, a espécie *M. varigena* tem patogenicidade semelhante com a da *M. haemolytica* (Angen et al., 1999).

A identificação precisa de microrganismos é uma grande preocupação do ponto de vista epidemiológico. No caso dos membros da Família Pasteurellaceae, a identificação fenotípica é bastante incômoda, mesmo quando são utilizados sistemas de identificação automatizados e testes sorológicos (CHRISTENSEN et al., 2007); (SUÁSTEGUI-URQUIJO et al., 2015). Por esta razão, muitos laboratórios empregam métodos moleculares para a identificação da família Pasteurellaceae, especialmente amplificação e análise de seqüências do gene 16S rRNA (CHRISTENSEN et al., 2004); (KRÓL et al., 2011); (SUÁSTEGUI-URQUIJO et al., 2015). Devido a mudanças contantes na classificação taxonomica de algumas especies da familia Pasteurellaceae, se faz necessária a inclusão de métodos moleculares para rapida e precisa identificação na maioria das espécies dessa família, pelos menos das mais relevantes e frequentes. A amplificação e o sequenciamento de genes em amostras clinicas ou amostras puras pode ser um instrumento muito eficiente para melhor compreender a patogenia microbiana. (MIGNARD; FLANDROIS, 2006); (PETTI, 2007).

3. HIPÓTESES

Frente aos pontos obscuros levantados na revisão de literatura são formuladas as seguintes hipóteses:

- ❖ Desenvolver uma alça extensora para o swab da nasofaringe que seja mais barata e disponível que os equipamentos usuais importados.
- ❖ Analisar a microbiota comensal da nasofaringe de bovinos sadios submetidos ao transporte e período de adaptação ao confinamento, enfatizando a presença de bactérias possivelmente patogênicas.
- ❖ Mensurar os efeitos negativos do transporte e dos primeiros dias do confinamento, com destaque a perda de peso corpóreo e de volume plasmático em bovinos que contenham ou não bactérias possivelmente patogênicas.
- ❖ Comparar o volume globular e o déficit de volume plasmático para mensurar o grau de desidratação.

4. OBJETIVOS

- ❖ O presente trabalho teve como objetivos estudar efeitos negativos do transporte ao confinamento e do período de adaptação neste, assim como avaliar a presença de bactérias possivelmente patogênicas na nasofaringe durante estes processos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O material e a metodologia empregada no presente experimento foram submetidos para avaliação e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) no dia 14/03/2018, com o seguinte registro nº 8019310118.

5.1 Animais, transporte e manejo

Foram utilizados 48 bovinos machos, não castrados, da raça Nelore, com idade em torno de 20 a 24 meses com escore de condição corporal variando de 2,75 a 3.5 numa escala de 1 a 5. Os animais foram pesados antes de serem embarcados nas duas respectivas propriedades, empregando-se balança analógica. Esse contingente foi oriundo de duas propriedades distintas, nos municípios de Itamogi-MG (n= 26) e São Sebastião do Paraíso-MG (n= 22). Ambos grupos eram criados extensivamente a pasto, recebendo apenas suplemento mineral (Fosbovi® 20). O confinamento era localizado no município de Pirassununga, nas dependências do Campus da Universidade de São Paulo (Imagem A).

Imagem A – Bovinos confinados em baia coletiva.

Fonte: (DIAS, M. R.B, 2018)

Os lotes foram transportados em dois caminhões separados, um para cada propriedade. Os caminhões eram de um piso só, com carroceria-gaiola subdividida em duas partes iguais, o piso não era emborrachado, mas tinha travessas de madeira quadriculadas. Foi calculado a área para cada animal nos respectivos caminhões, ficando entre 0,60 m², ou em torno de 40 cm lineares/animal. A distância das propriedades até o confinamento era semelhante, ou seja, de Itamogi foram percorridos 145 de via asfáltica e 15 km de estrada de terra (total 160 km) e de São Sebastião do Paraíso 162 km de asfalto e cinco de terra (167 km). A duração da viagem foi em torno de 4 h e 10 minutos de Itamogi e de 4h de São Sebastião do Paraíso.

Coincidentemente, ambos grupos saíram da propriedade em torno de 10 h da manhã.

O desembarque dos animais ocorreu de forma rápida, tranquila e sem qualquer embaraço para o piquete de acolhimento. Os animais ficaram durante o experimento num piquete próprio até o final do 20º dia, quando foram empregados para outro objetivo. Porém, notou-se que os bovinos de menor porte pareciam estar mais estressados, agressivos e sujos que os mais erados. Esse comportamento também foi notado no segundo dia da permanência na nova instalação. Nesses dois dias a ingestão de água foi aparentemente normal, mas o consumo de alimento parecia ser mais reduzido nos animais mais estressados. No decorrer dos próximos dias tal comportamento foi deixando de existir e no 10º dia todos as rezes estavam aparentemente normais e bem adaptados ao novo ambiente e se alimentando sem problema.

Assim que chegaram os animais foram pesados, com balança eletrônica (w310 – Coimma®). Foi repetida a pesagem no 2º dia após a chegada, as 6 h da manhã, antes do trato matutino. Ainda na chegada os bovinos foram vacinados contra clostridioses (Ourovac® Poli BT) e vermifugados (Puritec Gold® -Ivermectina 3,5%), seguindo dosagem preconizada na bula. No decorrer do presente experimento os animais tiveram livre acesso a água e sal mineral comercial (Fosbovi®20) sendo alimentados, duas vezes por dia, com silagem de milho (21,3 % MS; 1,5 % PB; 12,8 % Nutrientes Digestíveis Totais; 0,6% Extrato Etéreo; 0,08 % Ca e 0,07 % P) oferecido na quantidade de matéria seca correspondente a 2,5% de seus pesos corpóreos.

Esse manejo alimentar foi preconizado como dieta basal de pré-adaptação ao confinamento (Imagem B)

Imagem B – Alimentação dos bovinos com silagem de milho.

Fonte: (DIAS, M. R.B, 2018).

5.2 Coleta de amostras biológicas

Amostras de sangue e de *swab* da naso-faringe foram obtidas no momento da chegada, 48 h depois e 10 dias após o recebimento dos animais. Para tal, as rezes foram contidas em tronco com guilhotina para apreensão da região cervical.

Amostras de sangue foram coletadas em tubos a vácuo (Becton, Dickinson and Company, modelo Vacutainer®, São Paulo-SP, Brasil) com capacidade de 8,5 mL sem anticoagulante, para a obtenção do soro e com ácido dietilenodiamino tetra-acético (EDTA) para sangue total (Becton, Dickinson and Company, modelo Vacutainer®, São Paulo-SP, Brasil). Estas amostras foram obtidas por meio de venipunctura da jugular externa.

Após cada coleta de sangue, os tubos com anticoagulante foram imediatamente homogeneizados e mantidos em refrigeração a 4°C para serem posteriormente processados. Ao passo que os tubos sem anticoagulante eram mantidos à temperatura ambiente até que proviesse seu processamento.

A obtenção do *swab* nasofaríngeo baseou-se no trabalho de (GODINHO et al., 2007), com algumas modificações descritas a seguir. A antissepsia da narina esquerda foi realizada com álcool 70% como descrito por (HOLMAN et al., 2017a). Enquanto que Godinho et al. (2007) propuseram o uso de *swab* uterino para equinos estéril comercial, no presente trabalho foi empregado uma zaragatoa convencional estéril de 15cm presa numa alça extensora, que no caso era uma pinça cirúrgica *Allis* de 14 cm (Imagem C).

Imagem C – Medição do Swab acoplado à pinça *allis* e do tubo de silicone utilizado.

Fonte: (DIAS, M. R.B, 2018).

A cabeça do animal era ligeiramente inclinada (30 graus) por um operador, para deixar as narinas o mais horizontal possível (Imagem D). Em seguida, a zaragatoa estéril, assim que era aberta era imediatamente pinçada e introduzida, em torno de 8 cm, num outro tubo estéril de silicone de 11 cm de comprimento e 4,7 cm de circunferência. O conjunto era gentilmente introduzido pela narina até que todo tubo de silicone estivesse penetrado,

momento em que a zaragatoa era totalmente introduzida através do tubo de silicone alcançando a região da nasofaringe (Imagem E).

Imagem D – Contenção e coleta de material biológico por meio de swab nasofaríngeo.

Fonte: (DIAS, M. R.B, 2018).

Imagem E – Swab nasofaríngeo demonstrativo em peça anatômica.

Fonte: (DIAS, M. R.B, 2018).

Após “pincelar” esse local por no mínimo 8 segundos a zaragatoa era recolhida para o tubo de silicone e todo o conjunto removido da narina. Já fora da narina o conjunto era mantido para baixo para evitar que alguma secreção da extremidade posterior do tubo de silicone contaminasse a zaragatoa. Após retirar a mesma desse tubo um outro operador abria um frasco de acrílico contendo meio de cultura de Stuart, adequado para o transporte, e a ponta da zaragatoa era imersa nesse meio, o qual era rapidamente fechado armazenado sob refrigeração a 4° C, até seu processamento.

5.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

5.3.1 Amostras de sangue

No laboratório, os tubos com sangue, para obtenção de soro e plasma eram centrifugados a 1000 x g por 15 min, onde foram acondicionados, em duas alíquotas, em microtubos plásticos Eppendorf® e congelados a - 20°C. Essas amostras foram posteriormente descongeladas uma única vez para cada análise realizada. Os teores de proteína total (PT) e albumina (ALB) foram determinados utilizando kits comerciais Randox® (Randox® - Randox Laboratories, Reino Unido) em analisador bioquímico automático modelo RX Daytona (Randox® - Randox Laboratories, Reino Unido). O teor das globulinas (GLOB) foi calculado subtraindo a concentração de PT de ALB, nas amostras correspondentes. A partir dos dados foi determinada a razão ALB: GLOB.

As amostras de sangue nos tubos com EDTA foram utilizadas para determinação do volume globular (VG) realizado por analisador hematológico automático MINDRAY® (BC-2800vet). A partir dos valores do volume globular seriados, foram calculados os déficits de volume plasmático (DVP) de acordo com as orientações de BOYD et al. Apud. (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{DVP: } \{[\text{VG1} (1-\text{VG2}) / \text{VG2} * (1-\text{VG1})] - 1\} * 100$$

Onde: VG1 = VG no dia 10, pois considerou-se que nesse momento ocorreu a estabilização dos animais após o estresse do transporte e da adaptação ao novo ambiente.

VG2 = VG nos outros dias testados.

5.3.2 *Swab* da naso-faringe

Os 144 swab obtidos da nasofaringe dos animais examinados foram semeados em ágar sangue de carneiro (5%) com base Columbia (Difco-BBL) e ágar MacConkey (Difco-BBL). A placa de ágar sangue de carneiro foi incubada em 5% de CO₂ a 37°C por 48h e a placa de ágar MacConkey foi incubada em aerobiose a 37°C por 48 horas.

As colônias bacterianas obtidas após o período de incubação descrito foram selecionadas e semeadas em uma nova placa de ágar sangue ou ágar MacConkey. Após o crescimento em ágar estas colônias foram semeadas em caldo BHI (Difco-BBL), incubadas a 37° C por 24-48h, sendo uma alíquota desta cultura submetida a identificação pelo MALDI-TOF MS e outra congeladas a -86° C com 30% de glicerol para realização das análises posteriores.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS

5.4.1 Identificação por Maldi-Tof MS

Uma alíquota de 1 ml do cultivo bacteriano em caldo BHI foi centrifugada por 5 minutos em velocidade de 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado mantendo somente o sedimento, o qual é suspenso em 300 µL de água ultrapura (tipo I). O sedimento foi centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento foi suspenso em 300 µL de água ultrapura (tipo I) e misturado com auxílio de pipeta para homogenizar completamente a cultura bacteriana na água ultrapura (tipo I). Foi adicionado 900 µL de etanol absoluto ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) ao microtubo. A amostra foi centrifugada em velocidade de 13.000 rpm por 2 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Após estas etapas o tubo foi mantido em temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora para secagem do sedimento. Após a secagem foi adicionado 30 µL de ácido fórmico 100% e 30 µL de acetonitrila 70% a amostra foi misturada no vortex e centrifugada a 13.000 rpm por 2 minutos. O sobrenante (50 µL) foi transferido microtubo novo e foi armazenado a -20°C .

Para leitura pelo MALDI-TOF MS foi utilizado o espectrofotômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik). Para leitura 1 µL de suspensão proteica foi transferido para a placa de aço inox de 96 poços. Após secagem em temperatura ambiente, foi adicionado sobre a amostra 1µL da matrix. Cada cepa foi distribuída em três poços (triplicata). Para captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa FlexControl™ (Bruker Daltonik) pelo método MTB_autoX.

Para a identificação bacteriana pelo espectro proteico foi utilizado o programa BioTyper™ (MALDI Biotyper CA Systems) 3.0 (Bruker Daltonik) a partir do qual foi realizada uma comparação dos espectros capturados para

cada estirpe com a biblioteca do fabricante. Desta comparação de presença/ausência de picos específicos por gênero e espécie bacteriana, obtém-se um valor de escore (*log (score) value*). Os critérios para interpretação dos padrões da fabricante Bruker Daltonik foram utilizados neste estudo como segue: escores ≥ 2.0 foram aceitos para atribuição de espécie, e escores ≥ 1.7 e < 2.0 foram utilizados para identificação de gênero.

5.4.2 Identificação pelo sequenciamento parcial de 16S rRNA

As colônias bacterianas identificadas pelo MADI-TOF MS como pertencentes a família *Pasteurellaceae* foram submetidas a identificação pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

5.4.2.1 Extração de DNA

A extração foi realizada segundo descrito por (BOOM et al., 1990) a partir de 1 ml de cultura bacteriana em caldo BHI. A cultura foi centrifugada durante 5 minutos em velocidade de 12.800 X rpm para formação do sedimento e descarte do sobrenadante. O sedimento recebeu 1ml de tampão de lise (120 g isotiocianato de guanidina, 1 mL Triton 100 X, 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 8,8 ml EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL H₂O ultrapura (tipo I)), 40 µL de solução carreadora (1 g de Diatomaceous Earth, 50 µL HCl 37 % e 5 mL H₂O ultrapura (tipo I) e o microtubo foi agitado em vortex e incubados a temperatura ambiente por 20 minutos. Após a lise celular e a ligação do material genético as partículas de sílica, a amostra foi centrifugada a 12800 x rpm por 90 segundos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi submetido a cinco lavagens seguidas. As duas primeiras com 500 µL de tampão de lavagem (120 g isotiocianato de guanidina e 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] em 100 mL H₂O

ultrapura (tipo I)), as duas seguintes com 500 µL de etanol 70 % (- 20°C) e a última com 500 µL de acetona. Após as lavagens o microtubo contendo o sedimento foi mantido em estufa a 37 °C por 45 minutos até ficar sem resíduos de acetona. O sedimento foi suspenso em 165 µL de tampão de eluição (1 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 0,2 mL EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL de H₂O ultrapura (tipo I)) e mantido a 56°C durante 10 minutos. Após este período o material foi centrifugado a 12800 x rpm por 7 minutos. Nesta última etapa o sobrenadante contendo o DNA foi removido e transferido para um microtubo limpo, o qual foi armazenado a -20 °C até sua utilização.

5.4.3 Sequenciamento parcial de 16S rRNA

Para a identificação das estirpes foi realizada a amplificação parcial do gene 16S rRNA. A amplificação parcial foi realizada com os iniciadores descritos por TWOMEY et al. (2012) (F8 - AGTTTGATCCTGGCTCAG; 1492R - ACGGCTACCTTGTTACGACTT). Os fragmentos amplificados obtidos foram purificados com o kit *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado pelo Centro de Pesquisa de Genoma Humano (Universidade de São Paulo) a partir dos produtos purificados. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). O material foi analisado no equipamento de sequenciamento automático modelo 3130xl (Applied Biosystems). Foram feitas duplicatas de cada amostra para a

5.4.4 Análise filogenética do 16s rRNA

As sequências obtidas foram editadas com o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.9 (HALL, 1999) e alinhadas pelo aplicativo *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) com as sequências disponíveis no banco de dados *GenBank* (NCBI). A análise filogenética foi realizada no programa *Mega* 5.10 (TAMURA et al., 2011) utilizando o método de *Maximum-likelihood* (FELSENSTEIN, 1981) e o modelo *Tamura-3-parameter* (TAMURA et al., 2011). As sequências obtidas foram depositadas no banco de dados *GenBank* com os números de acesso: MH538169-MH538192. O suporte estatístico dos ramos da árvore filogenética foi calculado pelo método de *Bootstrap* com 500 réplicas.

5.4.5 Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)

O AFLP foi realizado segundo protocolo descrito por McLauchlin et al. (2000) utilizando a endonuclease de restrição *Hind III* (New England BioLabs Inc). A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando-se tampão TBE 0,5X (Tris-base 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM, pH 8) e voltagem de 90V durante 3 horas. Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR* (Bio Rad), sendo os fragmentos corados com *BlueGreen™* (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder™ (New England BioLabs Inc).

Para a análise de agrupamento dos perfis de fragmentos amplificados (AFLP) foi utilizado o programa *Bionumerics* 7.6 (Applied Maths). Um dendrograma foi construído utilizando o coeficiente de Dice e o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). O ponto de corte de 90 % de similaridade genética foi utilizado para determinação e análise dos agrupamentos obtidos (VAN BELKUM et al., 2007).

5.5 OUTROS CÁLCULOS MATEMÁTICOS PARA OBTENÇÃO DOS VALORES ESTUDADOS

5.5.1 Cálculo da perda de volume plasmático (%)

Para se estimar o volume plasmático (VP) foi inicialmente calculado o volume sanguíneo total. Com esse objetivo, foi empregado o resultado do estudo clássico de (HANSARD et al., 1953) que injetaram intravenosamente o corante Azul de Evans em garrotes de corte e a partir de uma série de coletas estimaram o volume sanguíneo no valor de 57 mL/kg de peso corpóreo. Em seguida, foi calculado o volume plasmático, considerando o volume globular médio (34,8 %) o descrito como valor de referência para bovinos machos da raça Nelore, com 20 a 24 meses de idade, criados no estado de São Paulo, descrito por Ayres (1994). Assim, o volume total sanguíneo obtido por cada animal foi multiplicado por 0,652 ($1 - 0,348$) obtendo-se o VP. A partir do peso corpóreo original de saída ou de chegada foi calculado o respectivo VP e desse valor foi estimado, com o correspondente DVP, o novo valor de VP, por exemplo na 48^a h. Com os valores de VP obtidos foi calculado o percentual de déficit ou superávit de deste em relação ao dado original.

5.6 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os dados foram inicialmente avaliados quanto as suas distribuições pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov. Os dados paramétricos tiveram sua variância repetida no tempo e analisados pelo teste de comparação das médias de Tukey, na qual avaliou-se a diferença entre os grupos experimentais em seus diferentes tempos de coleta. Quando foram feitas análises simples entre dois tratamentos, num único tempo, optou-se pelo uso de Teste t de Student. O estudo da influência entre as relações de duas variáveis foram calculados os coeficientes de correlação (r) de Sperman e de determinação (R^2). Ficou estabelecido que existiu uma correlação de alta intensidade quando $r \geq 0,60$; média intermediária quando $0,30 < r < 0,60$ e de baixa intensidade quando $r \leq 0,30$. Testes de regressão linear foram feitos para predizer duas variáveis.

A avaliação de dados não-paramétricos foi inicialmente submetido ao teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney para comparar dois tratamentos. Para comparar as frequências observadas de positividade ou não um de um certo agente nas populações foi empregado o teste de qui-quadrado. O grau de significância adotado foi de 0,05 e considerou-se com uma tendência estatística quando os valores de “p” se posicionaram entre 0,051 a 0,1. Os testes foram analisados pelo pacote estatístico Minitab release 14 (Minitab®)

6. RESULTADOS

6.1 FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *MANNHEMIA* SP. NA NASO-FARINGE DE BOVINOS DA RAÇA NELORE

Na tabela 1 se encontram os dados de presença da citada bactéria nos diferentes momentos de coleta no decorrer do estudo. A frequência de positividade foi maior no dia da chegada (31,25%) que às 48 h (0,48%) ($p = 0,001$), não sendo encontradas amostras positivas no dia 10. Dentre as bactérias desse gênero foi isolada apenas uma espécie: *M. varigena* ($n = 16$)

Tabela1. Frequência de *M. varigena* nos diferentes tempos.

Tempos de coleta	T1	T48h	T10d	p =
Frequência de <i>M. varigena</i>	15/48 A	1/48 B	0/48	0,001

Fonte: (DIAS, M.S., 2018) Notas: **T1** = chegada; **T48h** = 48 horas; **T10d** = 10 dias de confinamento.

Na tabela 2 estão representados os peso corpóreos médios dos animais em geral, positivos e negativos para a bactéria *M. varigena*, nos dias de saída, de chegada e 48 h após, assim como a perda percentual de peso nos respectivos intervalos. Ocorreu diferença significativa entre o peso de saída e da 48^a h posterior a chegada nos animais em geral ($p = 0,006$) e nos positivos ($p = 0,05$), ocorrendo tendência nos negativos ($p = 0,089$). Os animais positivos perderam mais peso percentual entre a saída e chegada que os negativos ($p = 0,045$).

6.1.1 Pesos médios dos animais nos diferentes momentos e suas respectivas perdas de peso

Tabela 2. Pesos corpóreos médios dos bovinos nos diferentes tempos (saída, chegada e 48h) e a perda de peso (%) destes animais nos intervalos entre as pesagens de cada tempo.

Peso em (kg)	T0	T1	T48h	p =
Geral	382,2 ± 26,6 A	372,8 ± 27,3 AB	363,0 ± 27,7 B	0,006
Positivos <i>M. varigena</i>	382,0 ± 23,9 A	372,1 ± 24,7 AB	359,6 ± 24,1 B	0,050
Negativos <i>M. varigena</i>	382,6 ± 28,3	373,7 ± 28,9	366,7 ± 28,7	0,089
Perda de Peso (%)	T0 – T1	T0– T48h	p =	
Geral	-2,43 ± 0,14	-2,26 ± 2,75	0,693	
Positivos <i>M. varigena</i>	-2,6 ± 0,4 a	-3,33 ± 2,9	0,357	
Negativos <i>M. varigena</i>	- 2,34 ± 0,37 b	-1,85 ± 2,94	0,351	
p =	0,045	0,117	-	

Fonte: (DIAS, M. R. B., 2018) Notas: Letras Maiusculas representam diferença significativa dentro de um mesmo grupo, enquanto as letras minusculas representam diferença significativa entre grupos. **T0** = saída **T1** = chegada; **T48h** = 48 horas

6.1.2 Variáveis sanguíneas (VG, DVP E VP) utilizadas para avaliar a desidratação e a perda de peso decorrente

Na tabela 3 foram comparados os valores do volume globular (VG - %) e do déficit de volume plasmático (DVP - %) dos bovinos em geral, positivos para *M. varigena* e dos negativos, no decorrer dos primeiros 10 dias de chegada ao confinamento. Nos bovinos em geral ($p = 0,014$) e nos positivos ($p = 0,018$) o volume globular foi maior no dia da chegada em relação ao dia 10, fato que não ocorreu nos negativos ($p = 0,307$). Em relação ao déficit do volume plasmático não foram encontrados diferenças em nenhum dos grupos nos decorrer dos vários períodos estudados ($p = 0,450$)

Tabela 3. Valores percentuais de volume globular (VG) e de déficit de volume plasmático, calculado pela primeira variável, em bovinos positivos e negativos para *M. varigena*.

DIA	VG GERAL	VG POSITIVOS	VG NEGATIVOS	DVP GERAL	DVP POSITIVOS	DVP NEGATIVOS	p =
T1	36,6 ± 2,9 A	37,4 ± 2,6 A	36,2 ± 3,0	-6,95 ± 10,78	-9,99 ± 9,89	-5,62 ± 11,03	0,450
T48h	36,3 ± 3,1 AB	36,4 ± 2,6 AB	36,2 ± 3,4	-5,85 ± 13,23	-6,42 ± 11,06	-5,61 ± 14,23	0,982
T10d	34,8 ± 3,2 B	34,7 ± 2,4 B	34,8 ± 3,5	-	-	-	-
p =	0,014	0,018	0,307	0,663	0,376	0,995	-

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018) Notas: Letras Maiusculas representam diferença significativa dentro de um mesmo grupo, enquanto as letras minusculas representam diferença significativa entre grupos. **T1** = chegada; **T48h**= 48 horas; **T10d** = 10 dias de confinamento.

A tabela 4 demonstra que não houve diferença quanto a perda de volume plasmático (VP - %) em relação ao **peso corpóreo** (PC) dentro dos três grupos estudados, indicando que não ocorreram influências nem do transporte nem da adaptação nessa variável ($p = 0,989$) apesar de haver uma tendência ($0,095$) no grupo geral em relação aos demais. Quando essa perda de volume plasmático foi calculada sobre a **perda total de peso**, também não existiu diferença dentro dos grupos estudados, no entanto houveram diferenças entre os três agrupamentos (geral, positivo e negativo) ($p = 0,015$) para a influência do transporte que para o período de adaptação.

Tabela 4. Efeito do período de transporte e adaptação em relação a perda de volume plasmático (%).

(%) Perda VP/PC	Efeito do transporte	Efeito da adaptação	p =
Geral	0,39 ± 0,27	0,30 ± 0,26	0,095
Positivos	0,39 ± 0,34	0,25 ± 0,16	0,165
<i>M. varigena</i>			
Negativos	0,38 ± 0,24	0,31 ± 0,29	0,292
<i>M. varigena</i>			
p =	0,989	0,779	—
(%) Perda de VP/(%) Perda Total de Peso	Efeito do transporte	Efeito da adaptação	p =
Geral	4,0 ± 2,1 A	2,6 ± 2,9 B	0,015
Positivos	4,9 ± 1,8 A	1,7 ± 2,2 B	0,004
<i>M. varigena</i>			
Negativos	3,8 ± 2,2	3,0 ± 3,1	0,223
<i>M. varigena</i>			
p =	0,754	0,437	—

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018) Nota: Valores expressos em mediana pelos dados terem distribuição não paramétrica; Letras Maiúsculas representam diferença

significativa dentro de um mesmo grupo, enquanto as letras minúsculas representam diferença significativa entre grupos.

6.1.3 Teores de albumina (Alb), globulina (Glob) e relação albumina/globulina (A:G) nos diferentes momentos

Na tabela 5 foram comparados os teores de albumina (g/L), globulina (g/L) e a relação albumina/globulina (A:G) nos bovinos em geral, positivos e negativos para *M. varigena*, no decorrer dos primeiros 10 dias de chegada ao confinamento. Os teores de albumina foram maiores na chegada e na 48 h que no 10º dia nos bovinos em geral e nos negativos ($p < 0,0001$), sendo maior na 48 h que no 10º dia nos positivos ($p = 0,014$). Os teores de globulina foram maiores na 48ª h que no dia 10 nos bovinos em geral e nos negativos, sendo que nos positivos, além desse resultado, as concentrações da 48ª h foram também superiores ao momento da chegada. A relação A:G foi superior na chegada que nas amostragens subsequentes nos bovinos em geral ($p = 0,029$) e nos positivos ($p = 0,023$), mas não nos negativos ($p = 0,361$). Apenas existiu diferença entre o grupo dos positivos e dos negativos nessa relação A:G no 10º dia ($p < 0,026$).

Tabela 5. Teores de Albumina (Alb), Globulina (Glob) e da relação Albumina/Globulina (A:G) dos animais positivos e negativos nos diferentes dias de confinamento.

DIA	(Alb) GERAL	(Alb) POSITIVOS	(Alb) NEGATIVO S	(Glob) GERAL	(Glob) POSITIVOS	(Glob) NEGATIVO S	A:G GERAL	A:G POSITIVOS	A:G NEGATIVO S	p =
T1	34 ± 2,2 A	33,1 ± 2,2 AB	34,1 ± 2,2 A	35,7 ± 4,1 AB	35,4 ± 3,8 B	35,3 ± 4,0 AB	0,96 ± 0,1 A	0,94 ± 0,1 A	0,94 ± 0,1	0,509
T4 8h	33 ± 4,1 A	34,9 ± 4,1 A	34,2 ± 4,2 A	38,2 ± 6,1 A	38,8 ± 4,5 A	37,7 ± 6,2 A	0,91 ± 0,1 B	0,89 ± 0,1 B	0,90 ± 0,1	0,440
T1 0d	31 ± 2,0 B	31,6 ± 2,2 B	31 ± 2,0 B	34,9 ± 4,3 B	35,7 ± 4,0 B	34,2 ± 4,3 B	0,90 ± 0,1 B	0,85 ± 0,1 C b	0,91 ± 0,1 a	0,026
p =	< 0,0001	0,014	< 0,0001	0,005	0,05	0,02	0,029	0,023	0,361	-

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018) Notas: Letras Maiusculas representam diferença significativa dentro de um mesmo grupo, enquanto as letras minusculas representam diferença significativa entre grupos. **T1** = chegada; **T48h**= 48 horas; **T10d**= 10 dias de confinamento.

Quadro 1. Frequência de bactérias do gênero *Bacillus* spp. Provenientes da nasofaringe de bovinos positivos e negativos para *M. varigena* identificadas pela técnica de MALDI-TOF no decorrer de 10 dias de chegada ao confinamento.

Animais	T1		T48h		Sub-total		T10d		Total geral	
<i>Bacillus</i> spp.	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Positivos <i>M. varigena</i> (n=15)	15	0	13	2	13	2 a	9	6	8	7
Negativos <i>M. varigena</i> (n=32)	30	2	22	10	20	12 b	14	18	2	30
X²	-		-		2,85		1,08		13,52	
p =	-		-		0,09		0,30		0,0001	

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018) Notas: Letras Maiusculas representam diferença significativa dentro de um mesmo grupo, enquanto as letras minusculas representam diferença significativa entre grupos. **T1** = chegada; **T48h** = 48 horas; **T10d** = 10 dias de confinamento; **+** = Animais positivos para *Bacillus* spp.; **-** = Animais negativos para *Bacillus* spp.; X² = Valor de Chi-quadrado

6.2 RELAÇÕES DOS PESOS CORPÓREOS (KG) DOS ANIMAIS E SUAS RESPECTIVAS PERDAS DE PESO (%) NO TRANSPORTE.

Na figura 1 está exibida a relação entre o peso corpóreo na saída dos bovinos em geral e a perda de peso ocorrida durante o transporte. Quanto mais leve o peso corpóreo na saída maior foi a perda de peso durante o deslocamento ($r = 0,865$; $p < 0,0001$).

Figura 1. Relação do peso corpóreo (kg) nos bovinos em geral, na saída, e a perda de peso (%) ocorrida no transporte.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Na figura 2 está apresentada a relação entre o peso corpóreo na saída dos bovinos positivos para *M. varigena* e a perda de peso ocorrida durante o transporte. Quanto mais leve o peso corpóreo na saída maior foi a perda de peso durante o deslocamento ($r = 0,993$; $p < 0,0001$).

Figura 2. Relação do peso corpóreo (kg) nos bovinos em bovinos positivos para *M. varigena*, na saída, e a perda de peso (%) ocorrida no transporte.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Na figura 3 está apresentada a relação entre o peso corpóreo na saída dos bovinos negativos para *M. varigena* e a perda de peso ocorrida durante o transporte. Quanto mais leve o peso corpóreo na saída maior foi a perda de peso durante o deslocamento ($r = 0,905$; $p < 0,0001$).

Figura 3. Relação do peso corpóreo (kg) nos bovinos em bovinos negativos para *M. varigena*, na saída, e a perda de peso (%) ocorrida no transporte.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

6.2.1 RELAÇÕES ENTRE OS PESOS CORPÓREOS (KG) E AS VARIÁVEIS SANGUÍNEAS (VG, DVP E VP) ESTUDADAS PARA AVALIAR A DESIDRATAÇÃO E A PERDA DE PESO DECORRENTE.

Na figura 4 está exibida a relação entre o peso corpóreo dos bovinos, como um todo, no momento de saída e o percentual de volume globular (VG) na chegada dos animais ao confinamento. Quanto mais leves foram os bovinos maior o VG na chegada ($r = -0,406$; $p = 0,005$). A mesma correspondência existiu para os bovinos positivos para *M. varigena* ($r = -0,670$; $p = 0,008$; figura 5). Contudo, tal relação não foi significativa nas rezes negativas para *M. varigena* ($r = -0,257$; $p = 0,156$; figura 6)

Figura 4. Relação entre o peso corpóreo (kg) dos bovinos em geral, no momento da saída, e o volume globular (%) na chegada dos mesmos.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Figura 5. Relação entre o peso corpóreo (kg) dos bovinos positivos para *M. varigena*, no momento da saída, e o volume globular (%) na chegada dos mesmos.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Figura 6. Relação entre o peso corpóreo (kg) dos bovinos negativos para *M. varigena*, no momento da saída, e o volume globular (%) na chegada dos mesmos.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Na figura 7 está mostrada a relação do peso corpóreo de todos os animais na saída e o DVP % na chegada. Quanto maior o peso corpóreo menor foi o déficit do volume plasmático (DVP %) ($r = 0,414$; $P = 0,005$). Em tempo, esse índice foi calculado empregando-se o VG de normalidade (VG1) o obtido no 10º dia de confinamento e o o VG do momento de chegada como VG2. Esse VG de normalidade foi baseado nas informações de Warriss et al. (1995) em que os autores confirmaram que o peso corpóreo e as variáveis bioquímicas retornam aos eu normal a partir do 5º dia do transporte. ,

Figura 7. Relação entre o peso corporal de todos os animais (kg) no momento de saída e o Déficit do Volume Plasmático (DVP %) na chegada.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Quando foram confrontados os resultados do peso corpóreo (kg) no momento da saída dos animais positivos para *M. varigena* e o déficit de volume plasmático (%), como descrito acima, verificou-se que quanto mais leve foram os bovinos maior foi o déficit de volume plasmático dos mesmos ($r = 0,718$; $p = 0,003$) demonstrados na Figura 8.

Figura 8. Relação entre o peso corporal (kg) dos animais positivos para *M. varigena* e o percentual de déficit do volume plasmático (DVP %), no momento da chegada.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Contudo, tal significância não foi constatada quando se compararam as mesmas variáveis dos bovinos negativos ($r = 0,241$; $p = 0,184$) na figura 9 esta expressa a relação entre o peso corpóreo (kg) e o DVP % no dia zero, na chegada dos animais.

Figura 9. Relação entre o peso corporal (kg) e o déficit de volume plasmático (DVP %), dos animais negativos para *M. varigena*, no dia da chegada.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Existiu uma relação significativa ($p < 0,016$; $r = 0,649$) entre o DVP % e a perda de peso corpóreo percentual em animais positivos (figura 10), para *M. varigena*, quando essas variáveis foram calculadas subtraindo-se o dia zero do dia 2. Assim, quanto maior a perda de peso durante a adaptação maior o DVP no período. Quando foi estudada essa mesma relação nos animais negativos (figura 11) existiu um baixo coeficiente de correlação, embora este fosse significativo ($r = 0,361$; $p = 0,046$)

Figura 10. Relação entre a perda de peso corpóreo (%) calculados pela diferença percentual do dia zero menos o 2º dia de permanência no confinamento nos animais positivos.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Figura 11. Relação entre a Diferença do Peso Corpóreo e o déficit do volume plasmático do dia 0 menos o dia 2 (%), nos animais negativos.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Na figura 12 esta expressa a relação entre o DVP % e a diferença de VG do dia 10 menos o dia 0 de confinamento. Tal relação foi altamente significativa ($p < 0,0001$; $r = 0,979$).

Figura 12. Relação entre a diferença do volume globular e o déficit do volume plasmático do dia 10 menos o dia 0 (chegada) de confinamento.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

6.2.2 TEORES DE GLOBULINA SÉRICA EM RELAÇÃO AO PESO DOS ANIMAIS

Na figura 13 estão apresentadas as relações do peso corpóreo e dos teores de globulina sérica de todos os animais do estudo no 10º dia de confinamento. Não houve significância ($r = -0,005$; $p = 0,975$) entre os teores de globulina sérica em relação ao peso geral dos animais.

Figura 13. Relação entre o peso corporal(kg) de todos os animais e os teores de globulina sérica (g/L) no 10º dia de confinamento

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Na figura 14 estão apresentadas as relações do peso corpóreo e dos teores de globulina sérica nos **animais positivos** para *M. varigena*. Quanto mais leve for o animal maior será o teor de globulina presente no dia 10 do confinamento ($r = -0,611$; $p = 0,020$)

Figura 14. Relação entre o peso corporal dos animais (kg) positivos e os teores de globulina sérica (g/L) dos animais no 10º dia de confinamento.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Na figura 15 estão apresentadas as relações do peso corpóreo e dos teores de globulina sérica nos **animais negativos** para *M. varigena*. Não sendo observada diferença ($r = -0,063$; $p = 0,732$) entre o peso corpóreo dos animais e seus respectivos teores de globulina no 10º de confinamento.

Figura 15. Peso corporal dos animais negativos para *M. varigena* em relação ao teor de globulina sérica (g/L) no 10º dia de confinamento.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

6.2.3 RELAÇÃO ENTRE O PESO CORPÓREO E A RELAÇÃO ALBUMINA/GLOBULINA

Na figura 16 estão apresentadas as relações do peso corpóreo e da relação A:G geral de todos os bovinos. Mostrando que não houve diferença estatística ($r = -0,096$; $p = 0,523$) entre a relação A:G e o peso corpóreo no dia 10 do confinamento.

Figura 16. Relação entre o peso corpóreo (kg) e a relação Albumina/Globulina de todos os animais no 10º dia de confinamento.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Na figura 17 estão apresentadas as relações do peso corpóreo e da relação A:G dos bovinos positivos para *M. varigena*. Quanto mais pesado foi o animal maior foi sua relação A:G presente no dia 10 do confinamento ($r=0,532$; $p=0,041$).

Figura 17. Relação entre o peso corporal (kg) e a relação Albumina/Globulina dos bovinos positivos para *M. varigena*. no 10º dia de confinamento.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Contudo, nos animais negativos não existiu correlação linear significativa entre o peso corpóreo e a Relação Albumina/Globulina (A:G) ($r = -0,091$; $p = 0,619$) no 10º d de confinamento demonstrada na figura 18.

Figura 18. Relação entre o peso corporal dos animais (kg) negativos e a relação Albumina/Globulina, no 10º d de confinamento.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

6.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Os 96 *swabs* de naso-faringe dos animais examinados (T0 e T1) foram negativos para o isolamento de *Manheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni*. Foram isoladas 24 estirpes identificadas pelo MALDI-TOF MS como *Manheimia varigena* com scores entre 1,7 e 1,9 a partir de suabes de 16 animais de duas origens.

Das 24 estirpes, 22 foram isoladas de 15 animais no momento da chegada dos mesmos (T0) e duas estirpes foram isoladas de um animal (A28) 48 horas após o alojamento (T1). Dentre os animais provenientes da origem 1 (H1) foi isolada *M. varigena* em 11 animais (11/24- 45,8%), dentre os animais da origem 2 (H2) foi isolada *M. varigena* de 5 animais (5/24- 20,8%). Estes resultados são descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Descrição das 24 estirpes isoladas a partir dos 16 bovinos avaliados.

Identificação da estirpe	Animal	Rebanho	Coleta	Agente isolado
3.1	A3	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
6.6	A6	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
8.1	A8	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
10.1	A10	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
10.4	A10	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
10.5	A10	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
10.6	A10	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
12.2	A13	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
13.1	A14	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
15.4	A16	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
16.1	A17	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
16.2	A17	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
17.1	A18	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
17.2	A18	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
18.1	A19	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
18.2	A19	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
22.1	A23	H1	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
23.1	A24	H2	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
28.5	A30	H2	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
30.2	A32	H2	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
30.3	A32	H2	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
34.2	A37	H2	T0	<i>Mannheimia varigena</i>
74.5	A28	H2	T1	<i>Mannheimia varigena</i>
74.9	A28	H2	T1	<i>Mannheimia varigena</i>

Notas: Animais provenientes do município de São Sebastião do Paraíso – MG (**H1**);
Animais provenientes do município de Itamogi – MG (**H2**);
Chegada ao confinamento (**T0**); 48 horas após a chegada (**T1**).

6.3.1 Identificação por sequenciamento genético parcial (16S rRNA) e análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)

As estirpes isoladas foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA para confirmação da espécie e comparação com outros membros do gênero *Manheimia*. Apesar da grande proximidade entre *M. varigena* e *M. granulomatis*, a análise filogenética apresentada na Figura 6 indica que os isolados brasileiros provenientes deste estudo se agrupam com as estirpes de *M. varigena* de bancos de cultura internacionais apresentando identidade nucleica > 98,3 % (Quadro 2). As 20 estirpes de origem Mexicana, inclusas nesta comparação, apresentaram alta identidade (aproximadamente 98 %) em relação às estirpes do presente estudo; no entanto, estas apresentam maior proximidade às estirpes de referência de *M. varigena* (> 99,5% de identidade).

A caracterização das 24 estirpes de *M. varigena* isoladas no presente estudo pelo AFLP revelou a presença de 13 perfis de restrição identificados como P1 a P13 (Figura 19). Os 13 perfis obtidos foram distribuídos em dois grandes agrupamentos com menos de 70% de similaridade; o primeiro grupo reuniu 16 estirpes, sendo 13 da origem 1 e 3 estirpes da origem 2, enquanto que o segundo grupo é formado por 8 estirpes sendo 3 da origem 1 e 4 da origem 2. O AFLP indicou uma tendência em agrupar as estirpes de acordo com o animal de origem; no entanto, alguns animais apresentaram estirpes com perfis diferentes como as estirpes isoladas dos animais 17 (P5 e P6), 19 (P9 e P11) e 28 (P8 e P13).

Imagem 2 – Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as espécies de *Mannheimia* com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Os valores de *bootstrap* apresentados nos ramos correspondentes foram avaliados a partir de 500 réplicas.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018)

Quadro 2 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos do gene 16S rRNA para as estirpes estudadas.

[illegible]

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018);

Figura 20 – Dendrograma ilustrando as relações entre os perfis de restrição das estirpes de *Mannheimia varigena* caracterizadas pelo polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados.

Fonte: (DIAS, M.R.B., 2018);

Animais provenientes do município de São Sebastião do Paraíso – MG (**H1**);

Animais provenientes do município de Itamogi – MG (**H2**);

Chegada ao confinamento (**T0**); 48 horas após a chegada (**T1**).

7. DISCUSSAO

O presente trabalho aborda dois aspectos pouco ou nada estudados em nosso meio, ou seja, a influência do estresse do transporte de bovinos para centros de engorda e a presença na nasofaringe de bactérias patogênicas ou comensais, possivelmente agressivas ao trato respiratório, destacando a primeira descrição no país de isolamento de uma nova espécie de *Mannhemia*, a *varigena*, por meio de *swab* nasofaríngeo em bovinos hípidos. Além do mais, o presente estudo também descreve uma pequena modificação do método de coleta do *swab* nasofaríngeo.

A técnica de *swab* nasal baseou-se na metodologia descrita em bezeros, por (GODINHO et al., 2007), que empregaram zaragatoa adaptada à amostragem microbiológica uterina de éguas, com 76 cm de comprimento. Porém, devido a dificuldade em se obter o equipamento importado e seu elevado custo (10 vezes superior ao empregado), optou-se no presente estudo utilizar *swab* convencional de 15 cm acoplado a uma alça extensora que nesta ocasião foi uma pinça cirúrgica de modelo *allis*, também com 15 cm de comprimento, dando ao conjunto um alcance de aproximadamente 25 cm de profundidade a partir da entrada da narina, permitindo com este abarcamento, acesso a nasofaringe para coleta (Imagem D e E). Tal *swab* é de fácil disponibilidade, com custo muito baixo. Trabalhou-se com duas pinças, e enquanto se empregava uma a outra era submetida a antissepsia por flambagem. Além do manipulador do *swab*, uma segunda pessoa auxiliava na abertura de material esterilizado e um terceiro colaborador ficava responsável pela contenção do animal no tronco. Demorava-se em média de 3 min para realizar toda a operação.

Os animais do presente ensaio viajaram das fazendas de origem até o confinamento numa distância considerada curta, grande parte em estradas com boa pavimentação e qualidade. Tais condições são semelhantes ao grande estudo feito pelo (COSTA; QUINTILIANO; TSEIMAZIDES, 2013) que descreveu que o deslocamento de bovinos pela região Sudeste é de até 400 km, em estradas que, segundo os próprios caminhoneiros, eram de regulares (35%) a boas (53%) e em menor porcentagem ruins (12%). Os animais utilizados no experimento viajaram em torno de 4 h e 10 min percorrendo entre 160 a 167 km em estradas asfaltadas e de terra. Assim, o presente trabalho reproduziu uma condição frequentemente encontrada em nossa região em relação à distância e o tipo de pavimentos trafegados no deslocamento de bovinos da região Sudeste. O peso médio dos animais transportados para confinamentos é muito próximo ao verificado em nosso meio (373 ± 28 kg), semelhante ao descrito por (LOPES; BAPTISTA, 2017) que identificou um peso médio na entrada de um confinamento padrão na região Sudeste de 366 ± 20 kg.

A taxa de lotação dos caminhões empregados era aparentemente normal (44cm linear/animal), seguindo as recomendações de bem-estar animal ligadas ao transporte, relatadas por (COSTA; QUINTILIANO; TSEIMAZIDES, 2013) de 44 cm lineares/animal. Tudo indica que a viagem não foi exaustiva, pois nenhum animal se encontrava deitado no caminhão quando da chegada ao confinamento, fato muito comum em garrotes jovens, principalmente nos trechos finais de percursos prolongados (GRANDIN, 1997)

Infelizmente, por questões de logística não foi possível acompanhar as variáveis sanguíneas antes do embarque dos animais. Mesmo assim, considerou-se como um padrão normal, principalmente para as variáveis sanguíneas, os valores encontrados no 10º dia da chegada ao confinamento, pois segundo (WARRISS et al., 1995), existe recuperação do peso e do status bioquímico dos bovinos transportados a partir do 5º dia do desembarque, desde que mantidos em boas condições de manejo e de bem-estar, fato que ocorreu na propriedade de chegada.

O registro do peso corpóreo dos animais identificou que existiu diferença entre essa variável de saída e da 48^a h nos animais em geral e nos positivos, com uma tendência nos negativos (tabela 2). Contudo, quando a perda de peso passou a ser contabilizada percentualmente ao peso corporal ficou nítido que os animais positivos perderam mais peso que os negativos durante a viagem ($p = 0,045$), deixando de existir tal diferença no período de adaptação ($p = 0,117$) (tabela 2).

Quando o peso *per se* foi levado em consideração não foi encontrada diferença entre os positivos e negativos pelo transporte ($p = 0,98$) existindo a mesma quando o peso foi corrigido pela perda percentual ($p = 0,045$) (tabela 2). Essa diferença deixou de existir, no primeiro caso, pois os pesos médios na chegada diminuíram-se por igual, diluindo essa homogeneidade quando os dados foram corrigidos percentualmente

O porcentual de perda de peso pelo transporte é variável dependendo da idade do animal, condição corporal, densidade de lotação no caminhão, ingestão prévia de alimentos duração a viagem, entre muitos outros fatores (Barnes; Smith; Lalman, (FIKE; SPIRE, 2006) (WITH, T. PROVISIONS, S. SHORTHOSE, 2010). Esses primeiros autores identificam que essa perda não parece estar firmemente associada com o peso dos bovinos, mas sim com o grau de condição corporal, ou seja, quanto mais gordo menor esse efeito.

Um trabalho norte-americano, Mayes et al. (1979) Apud. (GRANDIN, 2007), empregando bovinos com peso corpóreo de abate (± 500 kg) e deslocados ao matadouro por 5 h, semelhante ao atual, perderam não mais que 2%. Porém, no presente estudo o porcentual de perda pela viagem foi numericamente superior (2,6 %) nos animais positivos, chegando em 13,3 % (2/15) a perderem 3,3% (figura 2). Sem dúvida, essa maior perda percentual, em relação aos bovinos terminados é provida pela menor idade e peso dos animais empregados no presente ensaio.

A influência do peso corpóreo, na perda percentual foi demonstrada de forma muito clara e inequívoca no presente trabalho, quer seja nos animais

como um todo, nos positivos e nos negativos, respectivamente figuras 1, 2 e 3, indicando que nesse caso não existiu interferência da positividade pela *M. varigena*, mas sim pelo peso inicial. Esse dado de certa forma coloca em dúvida as afirmações de Barnes et al. Apud. (FIKE; SPIRE, 2006) que não existe uma alta correlação das perdas no transporte com o peso corpóreo, mas sim com a condição corporal. Embora, os animais não apresentassem discrepâncias quando a sua condição corporal, que variava de 2,75 a 3,5, a altíssima correlação ($r= 0,865$; figura 1) entre peso e perda identifica que essa a variável é muito importante para se estimar um grau de dano gerado pelo transporte.

Barnes et al. Apud. (FIKE; SPIRE, 2006) são categóricos em afirmar que em viagens longas jovens garrotes perdem em torno de 25% de peso a mais que bovinos prontos para o abate. Embora a viagem realizada não tenha sido longa e admitindo-se que bois terminados percam 2%, a perda de peso média (2,6%) foi superior a 25% (30%) indicando que talvez garrotes da raça Nelore sofram um pouco mais que os taurinos empregados nos Estados Unidos, mesmo se os zebuínos forem submetidos a viagens mais curtas. (GRANDIN, 1997) manteve taurinos e bovinos cruzados com gado Brahman num tronco de contenção por grande período. Os teores de cortisol a essa forma de estresse foram bem maiores nos cruzados com zebuínos, apoiando a hipótese acima. O assunto é palpitante, porém ainda precisa ser melhor avaliado.

Embora tenha ocorrido uma perda continuada de peso, iniciada no transporte e mantida no período de adaptação, nos grupos em geral ($p = 0,006$) e positivos ($p = 0,05$), quando os dados foram corrigidos percentualmente em nenhum dos três agrupamentos ocorreu diferença de peso entre a chegada e as 48 h ($p= 0,351$) (tabela 2). Isso indica que o transporte possivelmente tenha uma influência maior na perda de peso que o período de adaptação. Isso será melhor compreendido na discussão da dinâmica do déficit de volume plasmático no decorrer do processo.

Os presentes resultados associados aos descritos por Barnes et al. Apud (FIKE; SPIRE, 2006) contrapõe as afirmações de (KNOWLES; WARRISS, 2000) e (EARLEY; BUCKHAM SPORER; GUPTA, 2017) que 24 h de estabulação, após a chegada ao destino, são suficientes para recuperar adequadamente as variáveis fisiológicas (peso corpóreo) e biológicas (volume globular, hidratação etc.).

Infelizmente, não foi possível detectar a ingestão individual de matéria seca nesse período crítico de adaptação, mas constatou-se visualmente que os garrotes mais leves além de mais arredios e tímidos ficavam mais afastados do cocho enquanto os mais erados se alimentavam ou permaneciam ao lado do comedouro. Em poucos dias o grupo mais leviano foi se integrando aos mais pesados e dividindo o cocho de forma mais fraterna.

Segundo várias revisões, cerca de 50 % do peso perdido na viagem é proveniente da falta de ingestão de alimentos e água e eliminação de fezes e urina durante o trajeto, e os demais 50% da perda de fluidos extracelulares e intracitoplasmáticos da musculatura, órgãos e do volume sanguíneo. Vários trabalhos sugerem que o prolongado transporte (24 h), provoca, além da perda de peso, desidratação nos animais, baseados no aumento do volume globular, contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e proteína total, na chegada ao destino (TARRANT et al., 1992; KNOWLES; WARRISS, 2000; FIKE; SPIRE, 2006); (WITH, T. PROVISIONS, S. SHORTHOSE, 2010). Mesmo assim, (GAY, 1972), acompanhando garrotes de 272 kg numa longa viagem, com duração de 24 h, sugeriram que de uma perda real de 8,5% de peso corpóreo, dos quais 2% a 2,5 % teriam ocorrido primariamente devido a uma perda de volume sanguíneo. Mas nenhum destes trabalhos estimou com precisão esse déficit de volume plasmático, tornando as conclusões especulativas.

Ainda nessa linha, (TARRANT et al., 1992) acompanharam bois de 600 kg para o abate numa viagem de 24 h e verificaram que com a perda de peso equivalente a 2% ocorreu um aumento de volume globular 5% após a chegada ao destino. Na tabela 3 comparou-se o volume globular em três momentos e

verificou-se que nos animais em geral ocorreu idêntica elevação de 5% ($p = 0,014$), entre o momento de chegada e o 10º dia, porém nos animais positivos para *M. varigena* foi na ordem de 7,8% ($p = 0,018$) e nos negativos apenas de 4% ($p = 0,307$). Essa variável quando confrontada com o peso vivo na chegada apresentou resultado semelhante, pois ocorreu correlação linear significativa no grupo em geral ($r = -0,406$; $p = 0,005$) (figura 4), aumentando essa correlação nos positivos ($r = -0,670$; $p = 0,008$; figura 5) e inexistindo a significância nos negativos ($r = -0,257$; $p = 0,156$; figura 6). Em outras palavras, quanto mais leve for o animal maior será a sua hemoconcentração após transporte, destacando-se tal efeito nos bovinos positivos para *M. varigena*. Tal constatação não tinha ainda sido descrita na literatura sobre o assunto.

Embora o VG tenha fornecido resultados auspiciosos da hemoconcentração, segundo Boyd (1981) Apud. (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997) a perda *vera* de fluidos no sangue é melhor avaliada pelo déficit de volume plasmático DVP que pelo VG. A primeira variável é calculada a partir de valores seriados do valor normal menos o alterado, o que não foi feito em nenhum dos trabalhos supracitados que estudaram a hemoconcentração devido ao transporte.

Porém, quem avalia criticamente a tabela 3 percebe de forma clara, tirando por base os animais positivos, que enquanto o VG foi capaz que identificar uma diferença significativa ($p = 0,018$), o DVP não o foi ($p = 0,376$), colocando em cheque as premissas de Boyd (1981) Apud (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997) de um cálculo mais detalhado a partir desses dados mostra que enquanto o coeficiente de variação ($\pm 7,14\%$) foi muito pequeno no caso do VG, o mesmo índice foi exageradamente alto ($\pm 172,27\%$) no DVP, inviabilizando diferença significativa entre os grupos analisados nessa última variável.

A despeito dessa vantagem abordada no parágrafo acima, o volume globular *per se* tirado num único dia (figura 4) não fornece com precisão a real perda de fluido plasmático e o grau de desidratação. Por outro lado, tais constatações se apresentam de forma muito mais evidente no DVP (figura 7),

identificando que cinco garrotes se apresentaram com ligeiro superávit de fluidos (valores de $y > \text{zero}$), oito não mudaram seu *status* ($= \text{zero}$) e 33 apresentaram diferentes graus de déficit ($< \text{zero}$). Tal qual o VG nos animais positivos, quanto menor o peso maior o grau de DVP ($r = 0,718$; $p = 0,003$; figura 8), não ocorrendo a mesma significância nas rezes negativas ($r = 0,241$; $p = 0,184$; figura 9).

Chama a atenção na tabela 3 e figura 8 que embora os animais positivos tivessem aumentado seu volume globular em torno de 5% o DVP identificou que alguns valores de déficits de fluido plasmático (4/15; 26,7%) foram iguais ou superiores aos 20 %, denotando destacada hemoconcentração e possivelmente maior grau de desidratação absoluta.

Na prática clínica somente é detectada desidratação quando a perda de fluidos corpórea geral é no mínimo 5% (CONSTABLE et al., 2016). (OLIVEIRA, 2018), induziu acidose láctica ruminal em bovinos e identificou não apenas o DVP, mas também o grau de desidratação clínica (intensa, moderada, leve ou ausente). Esse autor evidenciou que o grau de desidratação leve (5%) coadunava com valores de DVP entre 12% a 19%; grau moderado (6 % a 7 %) entre 20% a 30 % de DVP, e grau intenso (8% ou mais) superior a 30% de DVP. Analisando individualmente os dados e levando por base os achados de Oliveira (2018) em relação ao DVP (figura 7), 20 % (9/45) à chegada alguns bovinos apresentaram desidratação leve e 17,8% (8/45) desidratação moderada. Assim, comparando-se a estimativa do status de hidratação pelo volume globular e o DVP identificou-se de forma mais transparente e quantitativa que o DVP fornece dados mais absolutos que o volume globular, este último exaltado por muitos autores (TARRANT et al., 1992); (KNOWLES; WARRISS, 2000), (FIKE; SPIRE, 2006); (WITH, T. PROVISIONS, S. SHORTHORSE, 2010)

A tabela 4 exhibe a perda percentual de volume plasmático sobre o peso total e sobre % de peso perdido. Como era de se esperar, tal qual ocorreu com as médias de DVP, não existiram diferenças entre grupos e dentro de grupos empregando-se como denominador o peso corpóreo. Provavelmente, por ter

um maior número de repetições existiu uma tendência ($p = 0,095$) da influência do transporte ser superior a da adaptação no grupo em geral.

Contudo, quando os dados de déficit de volume plasmático foram calculados com a perda de peso total encontrou-se significância dentro dos grupos geral ($p = 0,015$) e positivos ($p = 0,004$) com menores valores no período de adaptação em relação ao efeito do transporte *per se* (tabela 4). Em outras palavras, o transporte provocou uma perda significativa no fluido plasmático, principalmente, nos bovinos positivos, sendo recuperado no período de adaptação, provavelmente pela ingestão de água. Esse resultado espelha o que aconteceu com esses animais em seguida ao transporte, quando se analisa o volume globular (figura 5) e o déficit de volume plasmático (figura 8) dos animais positivos. Além da ingestão posterior da água que corrige parcialmente a desidratação, contribui para essa significância o fato que os animais continuaram a perder peso corpóreo durante as 48 horas de adaptação (tabela 2).

Do ponto de vista quantitativo, o presente trabalho contribui decisivamente para discutir as ilações feitas por (GAY, 1972) que sugeriram que o transporte prolongado pode gerar uma perda tão representativa do volume plasmático, podendo chegar a um valor médio de 29,4% (2% de perda de volume plasmático de uma perda total de peso de 8,5%). No presente trabalho a perda porcentual máxima durante o transporte foi um caso isolado de 9,36 % com valores médios de 4,9% (tabela 4), muito longe do estimado por (GAY, 1972)

Poder-se-ia contra-argumentar que no supracitado trabalho norte-americano os animais foram transportados por 24 horas e que tinham o peso corpóreo médio mais leve (272 kg), assim como eram um pouco mais jovens. Porém, estudos de perda de peso causados pelo transporte confirmam que esse fenômeno ocorre com maior intensidade nas primeiras três a quatro horas (1% do PC/hora), sendo menor nas próximas 10 h (0,25% do PC/hora), diminuindo mais ainda nas horas subsequentes Barnes et al. Apud. (FIKE; SPIRE, 2006). Em relação ao peso e a idade, comparou-se até agora na

literatura animais desmamados com bovinos prontos para o abate, destacando-se que estes últimos perdem nas mesmas circunstâncias cerca de 25% menos que os mais jovens.

Considerando que o peso médio dos garrotes empregados por (GAY, 1972), tinha 272 kg, e partir dos cálculos para se estimar o volume sanguíneo, estes deveriam ter ao redor de 15,5 L de sangue, o qual corrigido pelo volume globular médio (34,8 % – (AYRES, 1994) obter-se-ia em média um total de 10,1 L de volume plasmático. Dessa forma, seguindo-se as ilações de (GAY, 1972) animais que perdessem 2% de seu peso vivo em volume sanguíneo teriam um decréscimo de 5,44 L de plasma e os que perdessem 2,5% um valor de 6,8 L. Transformado esses dados da perda de volume plasmático em DVP % obter-se-iam valores de 53,9% e de 67,3 %, respectivamente. Tais DVPs são altíssimos e foram atingidos em bovinos com acidose láctica ruminal, induzida por administração de oligofrutose, que exigiu intenso tratamento de correção da desidratação (SOUSA, 2017). Assim, frente aos argumentos e cálculos mostrados nos parágrafos acima sugere-se que os autores norte-americanos superestimaram a perda de volume plasmático, porém para se obter os dados reais necessitar-se-ia de ser repetido o experimento proposto por esses autores.

O trabalho de Boyd (1981) Apud. (FIKE; SPIRE, 2006), embora consagrado e relevante, não atentou para fazer uma estimativa rápida e prática do DVP a partir de um dado de VG, em bovinos. Como a obtenção do valor de DVP exige a sequência de uma série de cálculos (vide material e métodos), o presente trabalho facilitou essa tarefa e identificou uma alta correlação entre o VG e o DVP ($r = 0,979$; $p < 0,0001$) e forneceu uma fórmula mais prática e rápida de se estimar o DVP por meio do VG: ($y = 0,57 + 4,24 * VG$) onde o VG é a diferença do valor (%) normal, que pode ser um valor médio de referência para bovinos, menos o alterado (figura 12). Em tempo, um estudo paulista de valores de referência de machos da raça Nelore, com 20 a 24 meses, identificou valor médio de 34,7% para o VG (AYRES, 1994)

Outra evidência novidadeira do presente trabalho foi a relação importante que existiu, nos bovinos positivos ($r = 0,649$; figura 10), e em menor grau nos negativos ($r = 0,361$; figura 11) entre a perda de peso percentual durante o dia 0 ao dia 2 e o DVP correspondente, ou seja, quanto maior a perda de peso durante a adaptação, maior a propensão à desidratação no período. Essa evidência foi sugerida, mas não comprovada por (GRANDIN, 1997) e (TAYLOR et al., 2010a). O transporte exaustivo pode levar à desidratação, mas isso seria facilmente corrigido em seguida à chegada (CONSTABLE et al., 2016). O presente trabalho mais uma vez sugere que o estresse do transporte também interfere temporariamente, não só no apetite, mas também no consumo de água, em especial nos animais de menor porte que perdem mais peso no processo global de deslocamento e adaptação a um novo ambiente. Quanto a recuperação deve ser levada em consideração o preceito emanado por (CAMP et al., 1981) que o tempo requerido para os bezerros voltarem o peso original está diretamente relacionado a perda no transporte.

Era de esperar que os teores de albumina (A) e globulina (G) estivessem maiores na chegada e na 48^ah, que no 10^o d, visto que nos dois primeiros tempos as concentrações estavam mais altas devido à hemoconcentração, verificado pelo aumento do DVP, ocorrendo retorno dos valores fisiológicos no dia 10 (tabela 5). Contudo, esse efeito de hemoconcentração foi devidamente corrigido quando foi calculado o índice das duas variáveis supracitadas (A:G).

Enquanto que as rezes negativas não apresentaram diferença nesse índice (A:G), entre os momentos 0, 48h e 10^o d ($p = 0,177$), tanto os animais em geral ($p = 0,029$) como os positivos ($p = 0,05$) revelaram menores valores já na 48^a h e no 10^od, em relação ao dia da chegada (tabela 5). Além disso, o presente trabalho identificou que apenas nos bovinos positivos ocorreu uma relação negativa ($r = -0,611$; $p = 0,02$ figura 14) entre o peso do animal à chegada e a produção de globulina, identificando que garrotes mais leves produziram maior quantidade dessa fração proteica. Isso indica que a produção de globulinas foi estimulada a partir do transporte se mantendo alta até o 10^o

dia, a qual foi mais produzida nos bovinos mais leves e positivos para *M. varigena* (tabela 5 e figura 14).

O estresse de transporte em bovinos hígidos, mesmo por curta duração (4 a 6h), estimula a produção temporária, por até 48 h, de proteínas de fase aguda, quer seja a amiloide sérica, como principalmente a haptoglobina (LOMBORG et al., 2008). Assim, teoriza-se que o primeiro pico de produção de globulinas, no presente trabalho, seja devido as proteínas de fase aguda, que têm uma meia vida curta, não ultrapassando 96h, mas acredita-se que a manutenção da hiperglobulinemia no 10º d seja advinda da produção de gama globulinas que são sintetizadas já nos primeiros dias pós-estresse, quiçá por estímulo da presença temporária de *M. varigena* (tabela 5) (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997).

O estado de hidratação é fundamental na manutenção de uma série de atividades na homeostase dos animais (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010); (EARLEY; BUCKHAM SPORER; GUPTA, 2017). Seria lógico afirmar que quanto menor for a homeostase do fluido plasmático menor o será a dos fluidos que afluem aos pulmões. No concernente ao trato respiratório uma adequada hidratação está ligada a dois processos. Um deles é a plena movimentação dos cílios da mucosa respiratória para eliminar partículas maiores que adentram o trato respiratório. O outro processo está ligado a produção do muco ciliar, tanto nas camadas externas do trato anterior respiratório como nas vias aéreas pulmonares. Aí são produzidas secreções líquidas pelas glândulas submucosas e as células taças que fornecem uma camada de proteção contra partículas inaladas, aerossóis, vapores e patógenos microbianos. Essas secreções contêm substâncias antimicrobianas, pró e anti-inflamatórias, imunomoduladoras e cicatrizantes de microferidas locais. É sabido que essas secreções reduzem a colonização de *Mannhemia haemolytica* nesse trato. Porém, quadros de desidratação sistêmica diminuem a produção dessas substâncias tornando-as mais viscosas e aumentando a produção de substância mucoide, a qual pode proporcionar colonização de patógenos bacterianos, acúmulo de partículas inaladas e menor vibração ciliar.

Uma das hipóteses do surgimento da “febre do transporte” (*shipping fever*), que nada mais é que uma broncopneumonia de origem bacteriana, desencadeada alguns dias após o transporte em bovinos jovens, está diretamente correlacionada a intensidade de perda de peso, no processo (CAMP et al., 1981). Certamente, quanto maior a perda de peso maior será a desidratação, por perda de fluidos intra e extracelular, somado aos efeitos do estresse que levam à imunodepressão sistêmica e a quebra nos mecanismos de defesa pulmonares contra agentes patogênicos aos pulmões (FIKE; SPIRE, 2006); (CONSTABLE et al., 2016).

O presente trabalho evidenciou que quanto mais leve foi o peso corpóreo mais intensa foi a perda de fluidos sanguíneos (figura 7), fato este muito destacado nos animais positivos para *M. varigena* (figura 8). Essa bactéria tem passado despercebida da grande literatura que revisa o assunto doença respiratória em bovinos, a qual destaca na sua grande maioria das vezes, entre as bactérias, a *Mannheimia haemolytica*, a *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* e *Mycoplasma bovis*.

Cepas primariamente diagnosticadas como *Mannheimia haemolytica*, posteriormente foram identificadas como *M. varigena* foram isoladas de casos de pneumonia, mastite, e septicemia, assim como de cavidade oral, rúmen e intestinos em bovinos por (ANGEN et al., 1999), na Dinamarca. Dois anos após esses autores reclassificaram essa bactéria, aparentemente descrita como complexo-*Pasteurella haemolytica*, pois as mesmas não se enquadravam quanto ao perfil tradicional de DNA e de características bioquímicas fermentativas deste gérmen, denominando o novo gênero como *varigena* : *varia* = variada e *gena* de origem diferente (ANGEN et al., 1999). Nesse último trabalho os autores citaram, que a despeito das características diferentes supracitadas, a *M. varigena* era tão patogênica como sua aparentemente análoga *M. haemolytica*. Contudo, (BISGAARD, 1993) e (BLACKALL; BISGAARD; STEPHENS, 2002) isolaram *M. varigena* da nasofaringe de bovinos adultos hígidos, afirmando que esta bactéria faz parte da flora normal do trato respiratório.

Mais tarde, a luz do trabalho dinamarquês, (RÉRAT et al., 2012) fizeram um levantamento microbiológico em 40 casos de complexo respiratório bovino isolando em 16 % deles *M. varigena*, as quais eram resistentes a uma gama de antibióticos, com exceção da gentamicina e florfenicol.

O presente trabalho comprova pela primeira vez em nosso meio a presença de *M. varigena* na nasofaringe de bovinos hígidos. Assim esse gênero de bactéria tem que ser melhor investigada toda vez que se procura estudar a etiologia microbiana dos problemas respiratórios em bovinos. No Brasil, recentemente foi publicado importante alfarrábio sobre doenças infecciosas em animais domésticos (MEGID; RIBEIRO; PAES, 2016). No capítulo que trata sobre mannheimiose em ruminantes os supracitados autores descrevem de maneira sucinta essa nova espécie, não citando seu isolamento no Brasil.

Algumas perguntas que não calam surgem deste trabalho. A primeira delas é se a presença de *M. varigena* na nasofaringe de parte dos animais é causa ou efeito do surgimento do estresse em bovinos transportados? Por que em boa parte dos animais não foi encontrada *M. varigena* em seu trato respiratório no decorrer do estudo? Por que a *M. varigena* encontrada no dia da chegada desapareceu da microbiota nas avaliações subsequentes? Por que bovinos positivos não desenvolveram quadros respiratórios?

Infelizmente, não foi possível realizar a coleta de *swab* da nasofaringe no momento da saída dos animais, o que poderia ajudar a responder a primeira pergunta. Mas, acredita-se que possivelmente os animais positivos já possuíam albergada a bactéria anteriormente a viagem, pois (BISGAARD, 1993), (BLACKALL; BISGAARD; STEPHENS, 2002) isolaram *M. varigena* da nasofaringe de muitos bovinos adultos hígidos, afirmando que esta bactéria faz parte da microbiota normal do trato respiratório. Estudando a microbiota da nasofaringe de garrotes jovens confinados, que apresentaram ou não quadros respiratórios, (HOLMAN et al., 2015) identificaram em 80% dos bovinos doentes a presença de *M. haemolytica* e em 60% dos sadios a mesma presença dessa bactéria no dia da chegada ao confinamento.

Tanto os animais positivos como os negativos para *M. varigena*, no presente trabalho, foram submetidos teoricamente a mesma intensidade de estresse, provavelmente não alterando a presença dessa bactéria na nasofaringe, embora fosse observado que animais mais desidratados e que perderam mais peso (figura 10) albergassem a bactéria no trato respiratório anterior.

A resposta para a segunda pergunta formulada acima, sobre o que fez com que boa parte dos animais não fossem identificados como positivos para *M. varigena* merece reflexão. Nesta última década ocorreu um grande avanço no estudo da microbiota do trato anterior respiratório de bovinos (HOLMAN; TIMSIT; ALEXANDER, 2015; SUÁSTEGUI-URQUIJO et al., 2015; TIMSIT et al., 2016; HOLMAN et al., 2017a). Boa parte desses trabalhos ratificaram as observações feitas por (CORBEIL et al., 1985) que existem grupos de bactérias na nasofaringe que estimulam ou refreiam a multiplicação de outras bactérias que podem se tornar patogênicas no trato respiratório posterior, como as dos gêneros *Mannheimia*, *Pasteurella*, *Histophilus* e *Mycoplasma*.

Três trabalhos, identificaram essa microbiota antes e após o transporte de desmamados para o confinamento, constatando que dentro dos primeiros dias de chegada ao novo ambiente existe uma dinâmica de diferentes populações dominantes na nasofaringe, as quais são variáveis se os bovinos foram ou não tratados metafilaticamente com certos antibióticos (HOLMAN et al., 2015, 2017a; TIMSIT et al., 2016). Independente dos tratamentos realizados, evidenciou-se nesses estudos que onde existiam a manutenção de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* nos primeiros dias de confinamento a frequência de problemas respiratórios era menor ou mínima e o isolamento de *Mannheimia* spp. reduzido.

Tais bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* atuam por competição e deslocamento ocupando um espaço na nasofaringe ou no epitélio bronquial que poderia ser colonizado por bactérias patogênicas (HOLMAN et al., 2017b) ou pela produção de substâncias antimicrobianas inibidoras de

crescimento, como no caso da *B. licheniformes* que sintetiza a bacitracina (HAAVIK, 1974)

O presente trabalho identificou que foram mais isoladas ($p < 0,0001$) bactérias do gênero *Bacillus* nos bovinos negativos para *M. varigena* que nos positivos ao término do 10º dia de confinamento, ocorrendo uma tendência na 48ª h de maior presença nos negativos ($p = 0,09$) (quadro 1). Três trabalhos identificaram a presença de *Bacillus* na nasofaringe em bovinos jovens hígidos que adentraram o confinamento (HOLMAN et al., 2015, 2017b; TIMSIT et al., 2016). Todos constataram que esse gênero estava mais presente no início do confinamento que após o 10ºd e num deles verificou-se que esse gênero era bem mais abundante nos animais hígidos que nos com problemas respiratórios (HOLMAN et al., 2015).

É merecedora de crédito a citação do importante trabalho nacional de (COUTINHO et al., 2009) que também identificaram em grande percentual de swabs de naso-faringe de bezerros, antes e após a inoculação de *M. haemolytica*, a presença de bactérias do gênero *Bacillus* ssp, mas que surpreendentemente alegaram que os mesmos eram frutos de contaminação durante o processo de coleta e não como comensais da microbiota nasofaríngea deste segmento anatômico.

A terceira pergunta também é intrigante. Duas hipóteses são levantadas para explicar o desaparecimento da *M. varigena* nos animais positivos. A primeira delas é a presença de *Bacillus*, em especial no 10º d, em 47,7% (6/15) desses bovinos, contrapondo provavelmente a presença da *M. varigena* (quadro 1). A outra hipótese, é que ocorreu um aumento na produção de globulinas apenas nos animais positivos, no 10º dia, verificado pela diminuição na relação A:G (tabela 5).

Coincidentemente, as globulinas foram mais produzidas nos bovinos mais leves deste grupo positivo (figura 14), que de alguma forma estavam mais sujeitos ao estresse do transporte, baseando-se pelo maior grau de desidratação (figura 10). Possivelmente, essa debilidade dos animais positivos, associado ao estresse desencadeou uma maior resposta imune a qual poderia

suprimir o crescimento da *M. varigena*. Recentemente, (TIMSIT et al., 2016) compararam seus resultados de isolamentos da microbiota da nasofaringe com os de (MCDANELD, T. G., KUEHN, L.A., KEELE, 2015), encontrando menor frequência de *Mannheimia haemolytica* no primeiro estudo. A diferença principal dos levantamentos foi que (TIMSIT et al., 2016) imunizaram previamente, em duas oportunidades, os bovinos contra a *M. haemolytica*, não ocorrendo o mesmo no outro trabalho. Os primeiros autores alegaram que esses anticorpos seriam os responsáveis por tal supressão no crescimento bacteriano. No presente trabalho, as imunoglobulinas produzidas provavelmente foram inespecíficas, mas de alguma forma podem ter contribuído para o cerceamento da *M. varigena* a partir da chegada no confinamento. Maiores estudos são necessários para avaliar se anticorpos inespecíficos poderiam inibir o crescimento dessa bactéria e invasão da mesma no trato respiratório posterior.

Finalmente, discutem-se os motivos dos bovinos positivos não desenvolverem quadros respiratórios. Acredita-se que embora o transporte e o período de adaptação provocassem inequívoco estresse essa condição não foi suficiente para predispor bovinos a desenvolverem um quadro respiratório, que requeresse um tratamento. Na criteriosa e provocativa revisão sobre a doença respiratória em bovinos jovens (TAYLOR et al., 2010b) discutiram se o envolvimento da *Mannheimia* e da *Pasteurella multocida* tinha caráter contagioso, requerendo assim isolamento dos animais acometidos e tratados, ou se era proveniente de falhas nas defesas respiratórias, causadas principalmente pelo estresse. Embora (TAYLOR et al., 2010a) não emitissem conceito definitivo advogaram que a segunda hipótese seria mais pertinente que a primeira, sugerindo que mais estudos fossem realizados. Os mesmos não tardaram a acontecer e (TIMSIT et al., 2013) demonstraram que a doença não era primariamente causada por transmissão horizontal dos agentes bacterianos, mas sim do surgimento de fatores debilitantes que proporcionavam oportunidade da microbiota residente, com potencial patogênico, de sobrepor o sistema de defesa respiratória do bovino em fragilidade, e invadir os pulmões.

Alguns pontos constatados no presente experimento fortalecem a premissa defendida acima, ou seja, que os bovinos em questão não sofreram grave estresse, a ponto de enfraquecer as defesas respiratórias. Alguns pontos a serem destacados são a idade, o peso e a origem dos animais em questão. Segundo informações os animais do presente trabalho tinham entre 20 e 24 meses, com peso médio na chegada de $372,8 \pm 27,3$ kg de peso corpóreo (menor peso 314 kg) e embora originassem de duas propriedades diferentes, os mesmos foram totalmente criados nessas fazendas, não constando nesses lotes bovinos de compra de outras granjas ou de intermediários (tabela 2). Como já relatado, os bovinos viajaram entre 160 e 167 km

Um exaustivo trabalho epidemiológico de frequência de problemas respiratórios em 102 confinamentos norte-americanos, com média populacional de 10.327 cabeças, identificou que quanto maior o peso corpóreo, indiretamente associado à idade, na entrada menor o risco, sendo máximo (1) em animais com menos de 250 kg, intermediário (0,5) entre 250 e 318 kg e mínimo (0,18) com mais de 318 kg (SANDERSON; DARGATZ; WAGNER, 2008). Esse levantamento também apurou que lotes comprados de intermediários que juntavam bovinos de diferentes origens duplicavam o risco em relação a aquisições de uma única propriedade. Em relação à distância percorrida até o confinamento o trabalho identificou que aumentava o risco em 10% a cada 160 km viajados. No tocante a distância (SCHAKE, L. M., WEBSTER, W. W., & CONWAY JR, 1980) também identificaram que bezerros que viajaram mais de 220 km desenvolveram maior frequência de quadros respiratórios, exigindo maior número de tratamentos e gerando maior mortalidade, que animais menos deslocados. Confrontando esses dados com os observados no presente trabalho identifica-se que os animais apresentaram baixo risco de desenvolver quadros respiratórios, pois, tinham peso relativamente alto, não foram comprados de intermediários e viajaram por distâncias consideradas curtas, não promovendo um grau de estresse que pudesse comprometer seriamente as defesas respiratórias.

Outro ponto destacado por (SCHAKE, L. M., WEBSTER, W. W., & CONWAY JR, 1980) e também notado por (CAMP et al., 1981) foi que em

bovinos jovens quanto maior a perda percentual de peso corpóreo no transporte para o confinamento, notadamente acima de 5,5 % ou mais, maior o risco de surgimento de quadros respiratórios. Felizmente, a perda de peso percentual médio dos bovinos positivos ($2,6 \pm 0,4$ %; valor máximo 3,33 %) foi pequena, aquém do valor citado acima.

A condição corporal também está diretamente relacionada com o risco de surgimento de doenças respiratórias, sendo mais frequente em animais jovens mais leves e menos desenvolvidos (APLEY, 2006). (GRANDIN, 2007) revendo a literatura sobre prevenção de problemas respiratórios em bovinos recém-transportados afirmaram que aqueles provenientes de pastagens pobres em macro e microelementos, não devidamente suplementados, tinham maior morbidade e mortalidade pela doença respiratória. No presente caso a condição corporal dos bovinos foi avaliada como boa (entre 2,75 a 3,5, num escore máximo de 5), principalmente levando-se em consideração que os animais eram mantidos em pastagem e foram comprados no final do período de seca. Além do mais, os dois lotes foram continuamente suplementados com boa fonte de macro e microelementos, não aparentando nenhum sinal externo de deficiência mineral.

A frequência de problemas respiratórios nos confinamentos brasileiros é relativamente baixa quando comparada aos centros de engorda norte-americanos, quer seja pelos índices de morbidade, quer seja pela mortalidade (ORTOLANI, 2016). O principal motivo é que em nossos atuais confinamentos a entrada dos bovinos é mais postergada que nos EUA, que empregam bezerros recém-desmamados, muito mais propensos à doença respiratória. Contudo, está ocorrendo rapidamente uma “norte-americanização” do processo de engorda do Brasil com um incremento de uso de bezerros bem mais jovens, em alguns casos com idade inferior a um ano, para proporcionar maior ganho de peso e melhor qualidade da carne. Com isso, os confinadores passam a ganhar bônus na venda de carcaças tipo *premium*, principalmente, agora em

que ano-a-ano existe uma diminuição na margem de lucro na pecuária de corte. Assim, vaticina-se que dentre em breve aumentar-se-ão os problemas respiratórios nos bovinos confinados, havendo necessidade de se redobrar os cuidados na prevenção desse complexo morboso.

8. CONCLUSÃO

7.1. Quanto a modificação dos materiais empregados na técnica de *swab* nasofaríngeo conclui-se:

- ❖ Os materiais substituídos tornaram mais barata a amostragem, sem interferir na praticidade da mesma.

7.2. Quanto a constatação microbiológica obtida no *swab* da nasofaringe conclui-se:

- ❖ Pela primeira vez no Brasil foi isolada *Mannheimia varigena* em parte dos bovinos sadios, considerando estes bovinos positivos.

Identificaram-se também bactérias do gênero *Bacillus* spp, que inibem o crescimento de *Mannheimia* spp, principalmente em bovinos negativos, nos dias que se seguiram a chegada ao confinamento.

7.3. Quanto ao estresse provocado pela viagem e pelo período de adaptação conclui-se:

- ❖ Bovinos positivos à *M. varigena* perderam percentualmente mais peso corpóreo durante a viagem que os negativos, não existindo diferença no período de adaptação.
- ❖ Quanto mais leve o bovino, maior foi sua perda de peso corpóreo e seu grau de desidratação durante a viagem, recuperando esta última parcialmente durante a adaptação.

- ❖ Quanto maior a perda de peso durante a adaptação, maior a propensão à desidratação no período.
- ❖ A viagem e o período de adaptação estimularam o aumento de produção de globulinas, em especial nos animais positivos no 10º dia após a chegada.
- ❖ O déficit de volume plasmático (DVP) identifica melhor o grau de desidratação que o volume globular *per se*.
- ❖ A desidratação, identificada pelo DVP, à chegada, foi de grau leve a moderado.
- ❖ Nenhum dos animais positivos para *M. varigena* desenvolveu quadro respiratório aparente.

9. REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M. R.; DERSCHIED, R.; ROTH, J. A. **Innate immunology of bovine respiratory disease***Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 2010. .
- ANGEN, O.; MUTTERS, R.; CAUGANT, D. A.; OLSEN, J. E.; BISGAARD, M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n. 1, p. 67–86, 1 jan. 1999. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-49-1-67>>.
- APLEY, M. **Bovine Respiratory Disease: Pathogenesis, Clinical Signs, and Treatment in Lightweight Calves***Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 2006. .
- AYRES, M. C. C. **Eritrograma de Zebuínos (*Bos indicus*, Linnaeus, 1759) da raça Nelore, criados no Estado de São Paulo, influência dos fatores etário, sexual e do tipo racial**. 1994. Universidade de São Paulo, 1994.
- BISGAARD, M. Ecology and significance of *pasteurellaceae* in animals. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, v. 279, n. 1, p. 7–26, 1993.
- BLACKALL, P. J.; BISGAARD, M.; STEPHENS, C. P. Phenotypic characterisation of Australian sheep and cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varigena*. **Aust Vet J**, 2002.
- BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990.
- CAMP, T. H.; STEVENS, D. G.; STERMER, R. A.; ANTHONY, J. P. Transit Factors Affecting Shrink, Shipping Fever and Subsequent Performance of Feeder Calves. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 6, p. 1219–1224, 1 jun. 1981. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jas/article/52/6/1219-1224/4658260>>.
- CASWELL, J. L. **Failure of Respiratory Defenses in the Pathogenesis of Bacterial Pneumonia of Cattle***Veterinary Pathology*, 2014. .
- CERNICCHIARO, N.; RENTER, D. G.; WHITE, B. J.; BABCOCK, A. H.; FOX, J. T. Associations between weather conditions during the first 45 days after feedlot arrival and daily respiratory

disease risks in autumn-placed feeder cattle in the united states. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 4, p. 1328–1337, 2012.

CHRISTENSEN, H.; KUHNERT, P.; BUSSE, H. J.; FREDERIKSEN, W. C.; BISGAARD, M. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the Pasteurellaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 166–178, 2007.

CHRISTENSEN, H.; KUHNERT, P.; OLSEN, J. E.; BISGAARD, M. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the Pasteurellaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1601–1609, 2004.

CONSTABLE, P. D.; HINCHCLIFF, K. W.; DONE, S. H.; GRÜNBERG, W. **Veterinary medicine : a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses**. [s.l: s.n.]v. 51

CORBEIL, L. B.; WOODWARD, W.; WARD, A. C. S.; MICKELSEN, W. D.; PAISLEY, L. Bacterial interactions in bovine respiratory and reproductive infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 803–807, 1985.

COSTA, M. J. R. P. da; QUINTILIANO, M. H.; TSEIMAZIDES, S. P. **Boas práticas de manejo TRANSPORTE**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/boas-praticas-e-bem-estar-animal/arquivos-publicacoes-bem-estar-animal/transporte.pdf>>. Acesso em: 9 ago. 2018.

COUTINHO, A. de S.; OLIVEIRA FILHO, J. P. de; SILVA, D. P. G. da; OLIVEIRA, A. P. de; MARCONDES, J. S.; CHIACCHIO, S. B.; PAES, A. C.; SIQUEIRA, A. K.; AMORIM, R. M.; GONÇALVES, R. C. Mannheimiose pulmonar experimental em bezerros: swab nasal e nasofaríngeano como auxílio diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 83–88, 2009.

DEDONDER, K. D.; APLEY, M. D. A literature review of antimicrobial resistance in Pathogens associated with bovine respiratory disease. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 16, n. 2, p. 125–34, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26373635>>.

DUFF, G. C.; GALYEAN, M. L. **Board-invited review: Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle****Journal of Animal Science**, 2007. .

EARLEY, B.; BUCKHAM SPORER, K.; GUPTA, S. Invited review: Relationship between cattle transport, immunity and respiratory disease. In: Animal, 3, **Anais...**2017.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, n. 6, p. 368–376, 1981.

FIKE, K.; SPIRE, M. F. **Transportation of Cattle***Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 2006. .

FULTON, R. W.; BLOOD, K. S.; PANCIERA, R. J.; PAYTON, M. E.; RIDPATH, J. F.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. T.; WELSH, R. D.; JOHNSON, B. J.; RECK, A. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 4, p. 464–477, 2009.

GAETA, C. N. **AVALIAÇÃO DA BRONCOPNEUMONIA DE BEZERROS CRIADOS NOS ASSENTAMENTOS DE PRESIDENTE VENCESLAU E PRESIDENTE EPITACIO**. 2016. Universidade de Sao Paulo, 2016. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10136/tde-18102016-104813/pt-br.php>>.

GAY, H. L. S. N. Shrink during Shipment of Feeder Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 35, n. 2, p. 489–494, 1972. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jas/article-abstract/35/2/489/4667129>>.

GODINHO, K. S.; SARASOLA, P.; RENOULT, E.; TILT, N.; KEANE, S.; WINDSOR, G. D.; ROWAN, T. G.; SUNDERLAND, S. J. Use of deep nasopharyngeal swabs as a predictive diagnostic method for natural respiratory infections in calves. **Veterinary Record**, v. 160, n. 1, p. 22–25, 2007.

GRANDIN, T. Assessment of Stress during Handling and Transport. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 1, p. 249–257, 1997.

GRANDIN, T. Handling and Welfare of Livestock in Slaughter Plants. **Livestock Handling and Transport**, p. 386, 2007. Disponível em: <<http://books.google.com/books?id=ATiqTsehGbMC&pgis=1>>.

GRIFFIN, D.; CHENGAPPA, M. M.; KUSZAK, J.; MCVEY, D. S. **Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex***Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 2010. .

HAAVIK, H. I. Studies on the Formation of Bacitracin by *Bacillus Licheniformis*: Effect of Glucose. **Journal of General Microbiology**, 1974. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/81/2/mic-81-2-383.pdf?expires=1534862588&id=id&accname=guest&checksum=1956B92579FC970C5947C757280A1141>>.

HAILS, M. R. Transport stress in animals: a review. **Animal Regulation Studies**, v. 1, n. 4, p. 289–343, 1978.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999. Disponível

em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>.

HANSARD, S. L.; BUTLER, W. O.; COMAR, C. L.; HOBBS, C. S. Blood volume of farm animals. **Journal of Animal Science**, v. 12, n. 2, p. 402–413, 1953. Disponível em: <<http://jas.fass.org/content/12/2/402.abstract>>.

HODGSON, P. D.; AICH, P.; STOOKEY, J.; POPOWYCH, Y.; POTTER, A.; BABIUK, L.; GRIEBEL, P. J. Stress significantly increases mortality following a secondary bacterial respiratory infection. **Veterinary research**, v. 43, p. 21, 2012.

HOLMAN, D. B.; MCALLISTER, T. A.; TOPP, E.; WRIGHT, A. D. G.; ALEXANDER, T. W. The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle that develop bovine respiratory disease. **Veterinary Microbiology**, v. 180, n. 1–2, p. 90–95, 2015.

HOLMAN, D. B.; TIMSIT, E.; ALEXANDER, T. W. The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

HOLMAN, D. B.; TIMSIT, E.; AMAT, S.; ABBOTT, D. W.; BURET, A. G.; ALEXANDER, T. W. The nasopharyngeal microbiota of beef cattle before and after transport to a feedlot. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, 2017a.

HOLMAN, D. B.; TIMSIT, E.; AMAT, S.; ABBOTT, D. W.; BURET, A. G.; ALEXANDER, T. W. The nasopharyngeal microbiota of beef cattle before and after transport to a feedlot. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, 2017b.

ISHIZAKI, H.; HANAFUSA, Y.; KARIYA, Y. Influence of truck-transportation on the function of bronchoalveolar lavage fluid cells in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 105, n. 1–2, p. 67–74, 2005.

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

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, p. 661, 890–894, 1997. Disponível em: <<http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>>%5Cnhttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=spsD4WQbL0QC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Clinical+Biochemistry+of+Domestic+Animals&ots=T_f6aJml8f&sig=sKSGfll8B1Rjre6_UTJHLMZSxbl%5Cn<http://books.google.at/books>>.

KNOWLES, T. G.; WARRISS, P. D. **Stress Physiology of Animals During Transport** *Livestock Handling and Transport*, 2000. .

KRÓL, J.; BANIA, J.; FLOREK, M.; PODKOWIK, M.; PLISZCZAK-KRÓL, A.; STARONIEWICZ, Z. Genetic diversity of *Pasteurella dagmatis* as assessed by analysis of the 16S rRNA and rpoB

gene sequences. **Current Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 87–93, 2011.

LOMBORG, S. R.; NIELSEN, L. R.; HEEGAARD, P. M. H.; JACOBSEN, S. Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. **Veterinary Research Communications**, v. 32, n. 7, p. 575–582, 2008.

LOPES, A.; BAPTISTA. **AVALIAÇÃO PRODUTIVA E SANITÁRIA EM BOVINOS CONFINADOS SOB METAFILAXIA ANTIMICROBIANA**. 2017. Universidade Federal de Uberlândia (UFU), 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/18397/1/AvaliacaoProdutivaSanitaria.pdf>>.

MCDANELD, T. G.; KUEHN, L.A.; KEELE, J. W. Evaluating the metagenome of nasal samples from cattle with bovine respiratory disease complex (BRDC). **Animal Science**, v. 93, n. Suppl. s3, p. 566, 2015.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **DONÇAS INFECCIOSAS EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO E DE COMPANHIA**. Editora Gu ed. Rio de Janeiro: ROCA, 2016.

MIGNARD, S.; FLANDROIS, J. P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 3, p. 574–581, 2006.

MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; ARRIGONI, M. D. B.; GALYEAN, M. L.; VASCONCELOS, J. T. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 10, p. 3427–3439, 2009.

OLIVEIRA, F. L. C. de oliveira. **Avaliação comparativa de diferentes aditivos na prevenção da acidose láctica ruminal em bovinos de corte**. 2018. Universidade de São Paulo, 2018.

ORTOLANI, E. L. Sanidade do rebanho X retorno econômico. In: Encontro de confinamento e recriadores da Scot Consultoria, Ribeirão Preto- SP. **Anais...** Ribeirão Preto- SP: Anais, Bebedouro, Scot Serv. Aux. Para Agropecuária, 2016.

ORTOLANI, E. L. Complicações no transporte de gado. **Revista DBO**, p. 112, 2018. Disponível em: <<https://portaldbo.com.br/revista-dbo-edicao-454-agosto-de-2018/>>.

PANCIERA, R. J.; CONFER, A. W. **Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia** *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 2010. .

PETTI, C. a. **Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing**. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2007. .

PIRES, A. V. **Bovinocultura de Corte**. FEALQ ed. [s.l: s.n.]

RÉRAT, M.; ALBINI, S.; JAQUIER, V.; HÜSSY, D. Bovine respiratory disease: Efficacy of different prophylactic treatments in veal calves and antimicrobial resistance of isolated

Pasteurellaceae. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 103, n. 4, p. 265–273, 2012.

RICE, J. a; CARRASCO-MEDINA, L.; HODGINS, D. C.; SHEWEN, P. E. Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 8, n. 2, p. 117–128, 2007.

SANDERSON, M. W.; DARGATZ, D. A.; WAGNER, B. A. Risk factors for initial respiratory disease in United States' feedlots based on producer-collected daily morbidity counts. **Canadian Veterinary Journal**, v. 49, n. 4, p. 373–378, 2008.

SCHAKE, L. M., WEBSTER, W. W., & CONWAY JR, R. C. Effect of origin and shipping distance on feedlot performance of cattle. Effect of origin and shipping distance on feedlot performance of cattle. **Beef cattle research in texas**, p. 90; 91; 92, 1980. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19810156705>>.

SMITH, R. A. Impact of disease on feedlot performance: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 272, 1998. Disponível em: <<https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/76/1/272>>.

SOUSA, R. dos S. **Avaliação de anti-inflamatórios não esteroidais no tratamento da laminite asséptica aguda decorrente de acidose ruminal por oligofrutose em bovinos**. 2017. Universidade de São Paulo, 2017.

SUÁSTEGUI-URQUIJO, Z.; JARAMILLO-ARANGO, C. J.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, F.; URETA, E.; TRIGO-TAVERA, F.; SUÁREZ-GÜEMES, F.; XICOHTENCATL-CORTES, J.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R. Identification and phylogenetic relationship of Mannheimia varigena using the 16S rRNA subunit and the rpoB gene. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1781–1787, 2015.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TARRANT, P. V. Transportation of cattle by road. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 28, n. 1–2, p. 153–170, 1990.

TARRANT, P. V.; KENNY, F. J.; HARRINGTON, D.; MURPHY, M. Long distance transportation of steers to slaughter: effect of stocking density on physiology, behaviour and carcass quality. **Livestock Production Science**, v. 30, n. 3, p. 223–238, 1992.

TAYLOR, J. D.; FULTON, R. W.; LEHENBAUER, T. W.; STEP, D. L.; CONFER, A. W. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? **The Canadian veterinary journal**, v. 51, n. 10, p. 1095–102, 2010a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21197200>>5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articler

ender.fcgi?artid=PMC2942046>.

TAYLOR, J. D.; FULTON, R. W.; LEHENBAUER, T. W.; STEP, D. L.; CONFER, A. W. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for preventive measures? **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 12, p. 1351–1359, 2010b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2978987/>>.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308517/pdf/nar00046-0131.pdf>>.

TIMSIT, E.; ASSIÉ, S.; QUINIOU, R.; SEEGER, H.; BAREILLE, N. Early detection of bovine respiratory disease in young bulls using reticulo-rumen temperature boluses. **Veterinary Journal**, v. 190, n. 1, p. 136–142, 2011.

TIMSIT, E.; CHRISTENSEN, H.; BAREILLE, N.; SEEGER, H.; BISGAARD, M.; ASSIÉ, S. Transmission dynamics of *Mannheimia haemolytica* in newly-received beef bulls at fattening operations. **Veterinary Microbiology**, v. 161, n. 3–4, p. 295–304, 2013.

TIMSIT, E.; WORKENTINE, M.; SCHRYVERS, A. B.; HOLMAN, D. B.; VAN DER MEER, F.; ALEXANDER, T. W. Evolution of the nasopharyngeal microbiota of beef cattle from weaning to 40 days after arrival at a feedlot. **Veterinary Microbiology**, v. 187, p. 75–81, 2016.

TWOMEY, D. F.; CARSON, T.; FOSTER, G.; KOYLASS, M. S.; WHATMORE, a. M. Phenotypic characterisation and 16S rRNA sequence analysis of veterinary isolates of *Streptococcus pluranimalium*. **Veterinary Journal**, v. 192, n. 2, p. 236–238, 2012.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N. K.; FUSSING, V.; GREEN, J.; FEIL, E.; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE, S.; STRUELENS, M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. SUPPL. 3, p. 1–46, 2007.

WARRISS, P. D.; BROWN, S. N.; KNOWLES, T. G.; KESTIN, S. C.; EDWARDS, J. E.; DOLAN, S. K.; PHILLIPS, A. J. Effects on cattle of transport by road for up to 15 hours. **The Veterinary record**, v. 136, n. 13, p. 319–323, 1995.

WHITE, B. J.; RENTER, D. G. Bayesian estimation of the performance of using clinical observations and harvest lung lesions for diagnosing bovine respiratory disease in post-weaned beef calves. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 21, n. 4, p. 446–453, 2009.

WITH, T. PROVISIONS, S. SHORTHORSE, W. et al. Assessment of Stress during Handling and

Transport. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 1, p. 249–257, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.03.016>%5Cn<http://www.cabdirect.org/abstracts/19812263540.html>%5Cn<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1966.pdf>%5Cn<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.018>%5Cn<http://academicjournals.org/journal/JVMAH/article>>.

WOLDEHIWET, Z.; MAMACHE, B.; ROWAN, T. G. Effects of age, environmental temperature and relative humidity on the colonization of the nose and trachea of calves by *Mycoplasma* spp. **British Veterinary Journal**, v. 146, n. 5, p. 419–424, 1990.

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**The Veterinary clinics of North America. Food animal practice, 2015. .