**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Desempenho de bezerros leiteiros recebendo probiótico contendo
Bacillus subtilis e *Bacillus licheniformis***

Thais Manzoni Torrezan

Dissertação apresentada para obtenção de título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2016**

Thais Manzoni Torrezan
Médica Veterinária

Desempenho de bezerros leiteiros recebendo probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*

Orientadora:
Profa Dra **CARLA MARIS MACHADO BITTAR**

Dissertação apresentada para obtenção de título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Torrezan, Thais Manzoni

Desempenho de bezerros leiteiros recebendo probiótico *contendo Bacillus subtilis e Bacillus licheniformis* / Thais Manzoni Torrezan. - - Piracicaba, 2016.
63 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Bezerro 2. Diarreia 3. Probiótico 4. Microrganismos intestinais I. Título

CDD 636.214
T694d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Ao grupo de Pesquisa em Metabolismo Animal e àqueles que de alguma forma terão conhecimentos adicionados pela leitura deste trabalho,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades diárias de crescimento,

Aos meus pais, pelo eterno exemplo de vida,

Ao meu marido pelo companheirismo e apoio em todos os momentos,

A Profa. Dra. Carla Bittar, pela oportunidade e orientação,

As meninas da salinha que além de companheiras de trabalho, se tornaram grandes amigas!

Aos estagiários e funcionários que ao longo desse período contribuíram para a realização desse trabalho,

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Sistema Imune de bezerros.....	17
2.2 Manejo.....	19
2.3 Diarreia em bezerros.....	19
2.4 Probióticos.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Análise estatística.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	53

“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: Nada é por acaso. Por isso temos que nos preocupar em fazer nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

Chico Xavier

RESUMO

Desempenho de bezerros leiteiros recebendo probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*

O objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação de um probiótico composto por cepas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, fornecidos via sucedâneo lácteo, no que se refere ao escore e pH fecal, contagem de microrganismos intestinais, parâmetros sanguíneos e desempenho geral dos animais. Foram utilizados 24 animais da raça Holandês que receberam 4L/dia de sucedâneo comercial (15PB:15EE), além de livre acesso a água e concentrado inicial. O desaleitamento ocorreu na 8ª semana de vida. Os animais foram distribuídos em delineamento de blocos casualizados, em dois tratamentos: 1) Controle – sem a suplementação de probiótico; 2) Suplementação de 2g/d ($1,6 \times 10^9$ UFC) de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* via sucedâneo lácteo. Semanalmente foram realizadas pesagens e aferições de medidas corporais (altura de cernelha, perímetro torácico e largura de garupa); e colheitas de sangue para determinação de glicose, proteína total, ureia e albumina, além de determinação de hematócrito. Foram colhidas amostras semanalmente para contagem de bactérias ácido lácticas e enterobactérias e determinação de pH fecal. O monitoramento do consumo de concentrado e do escore fecal foi realizado diariamente. O peso corporal, o ganho de peso médio diário e as medidas corporais não foram alteradas ($P>0,05$) pela suplementação do probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*; muito embora tenham apresentado efeito significativo de idade dos animais ($P<0,001$). O escore fecal, pH fecal e consumo de concentrado diário também não foram afetados pela suplementação com probiótico. No entanto, o consumo de concentrado e o pH fecal sofreram influência da idade em resposta ao crescimento natural dos bezerros. A contagem de bactérias ácido lácticas foi maior que número de enterobactérias durante todo o período ($P<0,05$). Apenas as enterobactérias sofreram efeito da idade ($P<0,05$), enquanto as bactérias ácido lácticas permaneceram variando, porém dentro de um padrão constante. Os parâmetros sanguíneos também não foram afetados pela suplementação com probiótico ($P>0,05$) mas todos, com a exceção da albumina, tiveram influência da idade ($P<0,001$). A suplementação com o probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* via sucedâneo não apresentou benefícios no desempenho ou no metabolismo de bezerros leiteiros, bem como não reduziu a ocorrência de casos de diarreia.

Palavras-chave: Bezerro; Diarreia; Probiótico; Microrganismos intestinais

ABSTRACT

Performance of calves receiving probiotic containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*

The objective of this study was to evaluate the supplementation of a probiotic containing strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, supplied via milk replacer, with regard to fecal score and pH, intestinal microorganisms count, blood parameters and overall performance of the animals. Twenty-four Holstein calves were utilized and received 4L/d of liquid diet consisting of commercial milk replacer (20CP:15EE), and had free access to water and starter concentrate. Weaning occurred at the 8th week of age. Animals were distributed in a randomized block design, in the following treatments: 1) Control - without supplementation with probiotic, 2) Supplementation: 2g/d of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* (1.6×10^9 CFU), via milk replacer. Every week calves were weighted and body measurements were taken (hip width, withers height and heart girth). Blood samples were drawn weekly for determination of hematocrit, glucose, total protein, urea and albumin. Fecal samples were weekly collected for lactic acid bacteria and enterobacteria counting and fecal pH determination. Concentrate starter intake and fecal scores were monitored daily. Body weight, average daily gain, and corporal measurements were not affected ($P>0.05$) by the supplementation of probiotic; however, presented a significant age effect ($P<0.001$). The fecal score, fecal pH and starter intake were not affected by probiotic supplementation ($P>0.05$). However, starter intake and fecal pH were affected by age due to calves' natural growth. The acid lactic bacteria count was higher than the count of enterobacteria during the whole evaluation period. Only enterobacteria were affected by the age of animals, while acid lactic bacteria remained constant despite little variations. Blood parameters were also not affected by supplementation of probiotic ($P>0.05$), but all of them, except albumin concentrations, were influenced by age ($P<0.001$). The supplementation with probiotic containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* via milk replacer presented no benefits in dairy calves performance or metabolism and did not reduced the occurrence of diarrhea.

Keywords: Calf; Diarrhea; Probiotics; Intestinal microorganisms

1 INTRODUÇÃO

Bezerros leiteiros recém nascidos estão sujeitos a ocorrência de diarreia e outros problemas gastrointestinais, os quais resultam em alta taxa de morbidade e possível aumento de mortalidade (NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM - NAHMS, 2007).

Em bezerros, a diarreia é um problema consequente de vários fatores, podendo ser isolados ou mais comumente, combinados, os quais estão relacionados com ambiente impróprio, animal mal manejado, nutrição inadequada e incapacidade do sistema imunológico em combater agentes patológicos (BENESI, 1999). É muito importante reduzir a prevalência de infecções gastrointestinais em bezerros jovens, pois quando doentes nessa fase, tem seu crescimento futuro e sua produtividade comprometidos (ROSMINI et al., 2004).

Originalmente, os probióticos para animais de produção foram baseados nos potenciais efeitos benéficos (FULLER, 1999), e posteriormente utilizados em alternativa aos antibióticos, visando à manutenção do equilíbrio da flora intestinal, harmonizando a função digestiva e melhorando a sanidade do animal. Os animais saudáveis, em geral, caracterizam-se por apresentar um bom funcionamento do aparelho intestinal, o que garante o equilíbrio da microbiota. Este fator é fundamental para o bom desenvolvimento ou mesmo para incremento da produção (MEYER et al., 2001).

Os probióticos são definidos como suplemento alimentar de microorganismos vivos os quais os benefícios afetam o animal hospedeiro melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER et al., 1989). Segundo Vanbelle et al. (1990), os probióticos são microrganismos naturais do intestino, os quais após uma dosagem oral efetiva, são capazes de estabelecer-se no trato gastrintestinal e manter ou aumentar a microbiota natural, ajudando a prevenir a colonização por microrganismos patogênicos, assegurando melhor utilização dos nutrientes. Além disso, tem sido mostrado que não produzem resistência a drogas ou resíduos de drogas quando ingeridos diretamente por animais ou seres humanos (HOLZAPFEL et al., 2001; SCHAREK et al., 2005; GUO et al., 2006).

Há inúmeros trabalhos verificando a utilização de probióticos em bezerros, pois as primeiras semanas de vida são muito importantes para seu desenvolvimento e produção futuros. Alguns destes trabalhos mostram melhora no desempenho dos

animais (KAWAKAMI et al., 2010; KOWALSKI et al., 2009; JATKAUSKAS et al., 2010; SOLO et al., 2014), diminuição na incidência de diarreia (BATISTA et al., 2008; JATKAUSKAS et al., 2010; KIM et al., 2011), enquanto outros autores não tiveram efeitos significativos (BAYATKOUHSAR et al., 2013; FRIZZO et al., 2010). O se destaca em alguns destes trabalhos é que os efeitos esperados dos probióticos apresentam-se mais significativos quando os animais estão sob estresse (TIMMERMAN et al., 2005; CRUYAGEN et al., 1995, RIDELL et al., 2010), o que ocorre geralmente até as 2 primeiras semanas de vida.

O objetivo deste estudo foi avaliar se a suplementação de probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, fornecido via sucedâneo, pode beneficiar bezerros leiteiros no que se refere a saúde, o desempenho geral e metabolismo de bezerros leiteiros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistema imune de bezerros

Devido ao tipo de placenta (sindesmocorial) presente nos ruminantes, não há transferência de anticorpos ou qualquer tipo de células de defesa da mãe para o feto (CORTESE, 2009), o que torna o bezerro recém-nascido quase totalmente dependente da transferência passiva de Ig através do consumo de colostro logo após o nascimento (TIZARD, 2009). Apesar de todos os componentes imunes essenciais estarem presentes no neonato, estes não são funcionais até os bezerros completarem 2 a 4 semanas de vida e só se tornarão totalmente desenvolvidos na puberdade (REBER et al., 2006).

Deste modo, bezerros após o nascimento apresentam o sistema imune ainda imaturo, devido também a ausência de contato com patógenos devido a proteção do útero, que limita a ativação dos fagócitos e a entrada destas células de defesa nos tecidos. Alguns fatores maternos, influências hormonais do parto e carência de anticorpos circulantes nos tecidos também são responsáveis por essa imaturidade imunológica. É de extrema necessidade a ingestão de colostro para fornecer ao recém-nascido proteção imunológica durante pelo menos 2 a 4 semanas de vida (CHASE et al., 2008)

Qualquer resposta imune adquirida produzida por um recém-nascido deve ser uma resposta primária realizada em um período de intervalo prolongado e com baixas concentrações de anticorpos. Assim, seu funcionamento não pode ser comparado ao de um animal adulto, conseqüentemente, algumas doenças podem ser brandas ou imperceptíveis na mãe, mas severas ou letais para o recém-nascido (TIZARD, 2009).

As infecções no recém-nascido ocorrem preferencialmente quando os anticorpos da mãe diminuem a níveis onde não oferecem mais proteção. No entanto, ainda exercem uma inibição no desenvolvimento da resposta imune do bezerro, pois é reconhecido que a imunidade passiva é um obstáculo para a indução de uma imunização ativa (MOREIN et al., 2002). Sendo assim, o bezerro apresenta uma “janela” de vulnerabilidade imunológica (Figura 1), período de maior susceptibilidade a infecções. A estabilização da concentração da proteína sérica reflete a produção

endógena das imunoglobulinas pelo bezerro, mas que só iniciará após pelo menos 1 ou 2 semanas de vida (HUSBAND et al., 1972).

Figura 1 - A janela da susceptibilidade a doenças infecciosas. Durante o período marcado pelas flechas, tanto os anticorpos do colostro quanto os anticorpos produzidos pelo próprio animal estão em níveis insuficientes para prevenir uma infecção (Adaptado de MOREIN et al., 2002)

O estresse tem um grande impacto no sistema imune dos bezerros, assim como ocorre com animais mais velhos. Há inúmeros fatores que podem afetar o sistema imune e alguns são únicos ao animal recém-nascido, como o parto, que é um processo com impacto significativo devido a liberação de corticosteroides que acabam por deprimir o sistema imune. Outros fatores que também podem deprimir o sistema imune temporariamente em bezerros são: castração, descorna, desaleitamento e mudança de ambiente (CORTESE, 2009).

O estado imunológico debilitado do bezerro pode ser um dos fatores predisponentes para ocorrência de diarreia nas primeiras semanas de vida, por pouco colostro fornecido, colostro fornecido tardiamente ou ainda fornecimento de colostro de baixa qualidade. Além desses motivos, o acúmulo de agentes infecciosos no ambiente (pouca ventilação, ausência de período de quarentena, baixa higiene do ambiente em geral) e fatores nutricionais também podem ser fatores predisponentes (WATTIAUX, 1994).

2.2 Manejo

Cuidar de bezerros durante a fase de aleitamento, é possivelmente o manejo mais intensivo em uma fazenda leiteira. Diferentemente de animais adultos, especialmente as vacas em lactação, onde erros podem ser percebidos em reduções na produção de leite, pequenos erros no manejo podem levar o recém-nascido à morte. O ambiente físico no qual o animal vive e o seu manejo são um dos componentes importantes que determinam suas respostas a nutrição, agentes infecciosos e estresse (ROY, 1980; KLEIN-JOBSTL et al., 2014). Além disso, a saúde do bezerro, o desenvolvimento funcional de seu trato digestório, crescimento e desenvolvimento de seu corpo, irão influenciar o desempenho futuro desse animal (BROWN, 1998).

A susceptibilidade dos bezerros às doenças e a resposta aos agentes patogênicos não dependem apenas do grau de proteção proporcionado pelo colostro materno, mas também da exposição aos patógenos ambientais e da condição de saúde do animal. Bezerros com imunidade adequada podem desenvolver doenças se o desafio imposto pelo ambiente for elevado ou se o colostro não possui imunoglobulinas contra um determinado patógeno, o qual não foi apresentado às mães. Bezerros que recebem nutrição inadequada, criados em locais inadequados, sem higiene ou submetidos a estresse, têm grande risco de desenvolver doenças, pois nestas situações o desafio vai além da capacidade do sistema imune do bezerro (COELHO, 2009).

Goodger e Theodore (1986) listaram quatro objetivos principais que um manejo de bezerros eficiente deve alcançar: 1. Fornecer colostro ao bezerro o mais rápido possível após o nascimento, de forma que este absorva anticorpos que proporcionarão imunidade passiva, 2. Reduzir estresse e diminuir a exposição a patógenos, 3. Oferecer dieta adequada, certificando-se de que o animal está nutrido para enfrentar doenças, 4. Oferecer tratamento adequado para os animais doentes.

2.3 Diarreia em bezerros

A diarreia em bezerros não é uma doença isolada, e sim uma síndrome clínica associada a várias doenças que se caracterizam por diarreia (STOLTENOW; VINCENT, 2003). A diarreia resulta de qualquer distúrbio do trato gastrointestinal

decorrente de processo patofisiológico resultando em anormalidades fisiológicas como alteração do fluxo osmótico intestinal, exsudação, aumento de secreção de líquidos, queda da capacidade de absorção, inflamação do tecido epitelial e movimento peristáltico intestinal alterado (GUANDALINI; VAZIRI, 2011). A diarreia abrange numerosos fatores infecciosos e não infecciosos, os quais incluem: exposição a patógenos, condições ambientais, manejo, estado nutricional e estado imunológico (KLEIN-JOBSTL et al., 2014). A combinação de alguns desses fatores associados a atenção insuficiente ao animal recém-nascido estão normalmente associados a episódios de diarreia (STOLTENOW; VINCENT, 2003).

Grande mortalidade e morbidade podem comprometer o sucesso da criação de bovinos leiteiros, principalmente, devido ao seu impacto no custo de produção, e a diarreia é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em bezerros (KROGH, 1983). Em estudo realizado por Santos e Bittar (2015), em 179 fazendas em diferentes regiões do Brasil, concluíram que as principais doenças que afetam bezerros na fase de aleitamento são diarreia (48%), tristeza parasitária (21%), pneumonia (22%) e verminoses (5%).

Em muitas situações quando os animais estão ou ficaram doentes, seu desenvolvimento e desempenho podem ficar comprometidos. Em geral, índices de mortalidade de até 5% entre o nascimento e os três primeiros meses de idade são considerados aceitáveis (ROY, 1990). No Brasil, dados sobre taxas de mortalidade de bezerros em rebanhos leiteiros são escassos, Frois et al. (1994) encontraram taxas alcançando 14,9%. Segundo Machado Neto et al. (2004), o tamanho do rebanho, o manejo do colostro e do aleitamento, o local onde os bezerros são criados, a idade de acesso ao concentrado e o período em que ocorre o desaleitamento são os principais fatores que influenciam a mortalidade neonatal.

Normalmente os animais com até 6 semanas são os mais afetados, e o diagnóstico é caracterizado pela frequente excreção de fezes líquidas (menos de 10% de conteúdo seco) (MILLEMANN, 2009). A sintomatologia que o animal doente apresenta é uma resposta à infecção e inflamação, como orelhas caídas, pelos arrepiados, perda de apetite, sonolência, febre e reduzida atividade social (HART, 1988). Muitos desses patógenos que causam a diarreia, podem ser identificados como apenas um agente etiológico ou uma combinação deles, sendo predominantemente transmitidos pela via oral-fecal de fezes de animais infectados para a via oral de animais susceptíveis (BARRINGTON et al., 2002).

Um diagnóstico preciso não é frequentemente necessário, porque isso não afeta o tratamento, o qual se dá normalmente por protocolos de reidratação, terapia de suporte, antibióticos e algumas medidas higiênicas. Os agentes normalmente atuam em uma faixa etária específica, pela própria susceptibilidade dos animais nessa determinada idade, o que pode ajudar na identificação do agente causador e possivelmente aplicação de tratamento mais específico (MILLEMANN, 2009).

Segundo NAHMS (2007), 23,9% das bezerras tiveram algum episódio de diarreia nos EUA, porém, alguns autores encontraram taxas de incidência de diarreia tão altas quanto 80%, sendo comuns taxas de diarreia maiores que >50% (CORNAGLIA et al., 1992; WRIGHT et al., 1995). Novilhas com histórico de tratamento por diarreia foram 2.5 vezes mais propensas a serem vendidas por algum problema que apresentaram, quando comparadas a outros animais, e tem 2.9 vezes mais chances de parir após 900 dias de idade do que novilhas que não apresentaram quadros de diarreia (WALTNER-TOEWS et al., 1986). Quigley et al. (1994) relata que a morte de bezerros durante a fase de aleitamento chega aos 8,4% e que 52% destes óbitos é devido a diarreia causada por dois fatores, a falta de higiene do ambiente e utensílios utilizados e a ingestão inadequada de colostro. Com isso, a diarreia e suas consequências como acidose e desidratação, são o principal motivo de mortalidade de bezerros antes do desaleitamento (NAYLOR; ZELLO; ABEYSEKARA, 2006; LEAL et al., 2008).

Curtis et al. (1988), em estudo com bezerras leiteiras, relataram que a ocorrência de diarreia aos 14 dias de idade era fator de risco para doenças respiratórias e de mortalidade entre 15 e 90 dias de idade. Além das perdas econômicas, a diarreia no rebanho é importante por conta das complicações na saúde pública. Numerosos agentes infecciosos que causam diarreia em animais são zoonoses e tem sido associados à doenças de origem alimentar. Além disso, problemas associados a resíduos de antibióticos em alimentos podem ocorrer quando há a tentativa dos produtores em controlar essas doenças na fazenda.

2.4 Probióticos

A microbiota intestinal de bezerros é uma comunidade complexa que tem importante papel na nutrição e saúde do animal (FRIZZO et al., 2011). Além disso, é responsável por síntese de vitaminas, conversão de compostos tóxicos a resíduos

não tóxicos, estimulação do sistema imune, manutenção do peristaltismo intestinal, integridade da mucosa intestinal, e também tem papel importante na barreira contra a colonização por patógenos (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2008). Bactérias ácido lácticas (BAL) e alguns microrganismos relacionados são os primeiros a colonizarem o trato intestinal de recém nascidos. Esses microrganismos possuem efeito benéfico, possivelmente pela barreira microbiológica que fazem no intestino, impedindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas (HEYMAN; MÉNARD, 2002).

Animais saudáveis têm microbiota balanceada que os permite ter crescimento adequado. No entanto, quando bezerros estão sob condições de estresse, especialmente em alguns sistemas de criação, ocorre um desbalanceamento da microbiota e a população de *Lactobacillus* e *Bifidobacterias* pode diminuir enquanto os microrganismos patogênicos aumentam (FULLER, 1989). Esse ecossistema está sob influência do status de saúde do hospedeiro, o que de certa forma é influenciado pelo meio ambiente. A saúde do sistema gastrointestinal pode ser definida como a habilidade de manutenção do equilíbrio da flora com constante mudança do ecossistema do trato gastrointestinal (MELIN et al., 1997).

Tannock e Savage (1974) constataram que quando ratos são privados de se alimentar, de beber água e de ter uma local para descansar por 2 dias, um grande número de salmonelas e coliformes são encontrados em seu intestino, enquanto o número de *Lactobacillus* diminuem. Estudos recentes têm consistentemente documentado que bezerros que adquiriram diarreia têm a microflora no intestino alterada, independentemente da idade e do agente etiológico causal (SMITH, 1962; YOUANES et al., 1987).

Por muitos anos, os antibióticos têm sido utilizados com fins terapêuticos (para tratamentos de doenças) e subterapêuticos (como aditivos alimentares para melhorar o crescimento e aumentar a eficiência alimentar) em animais. Glynn et al. (1998) indicaram aumento de 0.6% para 34% em um intervalo de tempo de 16 anos na resistência microbiana de patógenos que afetam os humanos, principalmente pelo uso indiscriminado de antibióticos nos animais. Este fato tem feito órgãos governamentais de alguns países do mundo recomendar ou até mesmo proibir o uso dessas substâncias para fins que não sejam terapêuticos. Quigley et al. (1997) apontaram que antibióticos ainda são eficazes na redução da severidade da diarreia em bezerros, o que suporta dados mais antigos que mostram que os antibióticos melhoram o desempenho, particularmente quando esses animais estão submetidos

a estresse. Quando esses animais não estão sob estresse considerável, os benefícios do uso de antibióticos não são tão significativos (QUIGLEY, 2001).

Os antibióticos como promotores de crescimento agem reduzindo a população de bactérias patogênicas e modificam a microflora no intestino dos animais (RADOSTITS et al., 1994). Infelizmente, esses tipos de tratamento também deprimem a atuação de bactérias não patogênicas. Além disso, há a preocupação com a presença de resíduos medicamentosos em produtos alimentícios com a possível transferência de genes de resistência bacteriana. Por essa razão, soluções alternativas têm sido buscadas tanto para o menor risco de alimentos de origem animal conterem resíduos quanto visando a maior lucratividade dos produtores (ALEXOPOULOS et al., 2004)

Há um grande número de preparações comerciais disponíveis com o objetivo de promover a colonização de bactérias desejáveis no intestino pela aplicação de microrganismos vivos (não necessariamente originadas do hospedeiro) e/ou misturas de metabólitos necessários para promover seu crescimento (SISSONS, 1988).

Probióticos são microrganismos vivos, os quais não produzem resistência e nem deixam resíduos em alimentos quando fornecidos diretamente a humanos ou animais (HOLZAPFEL et al., 2001; SCHAREK et al., 2005; GUO et al., 2006). Como uma alternativa aos antibióticos, os probióticos tem sido extensivamente utilizados em alimentos por indústrias alimentícias durante as últimas décadas (SOLIS PEREYRA; LEMONNIER, 1993; GUO et al., 2006). O termo “probiótico” é definido como “suplemento de microrganismos vivos” que podem afetar benéficamente o animal hospedeiro que o ingeriu, melhorando o balanço microbiano intestinal (FULLER, 1989). Esse termo tem sido utilizado para descrever culturas de microrganismos viáveis, extratos de cultura, preparações enzimáticas ou várias combinações desses produtos (YOON; STERN, 1995).

Os seus efeitos estão relacionados a habilidade das bactérias ácido lácticas em garantir a implantação no sistema gastrintestinal melhorando o balanço microbiano e estimulando o sistema imune. A persistência de bactérias ácido lácticas no trato gastrointestinal deve ser mantido no mínimo por alguns dias para gerar alguns efeitos benéficos (HEYMAN; MÉNARD, 2002).

O resultado da suplementação dos mesmos microrganismos probióticos pode ser diferente, mesmo quando testados em animais da mesma espécie, por esta

razão, alguns autores (GARDINER et al., 2004; TIMMERMAN et al., 2004) têm recomendado a administração de um inóculo formado por uma mistura de diferentes cepas. No entanto, um consenso não tem sido alcançado com relação a efetividade destes produtos em reduzir a prevalência de doenças gastrintestinais em bezerros (MUSA et al., 2009). Entender como os probióticos exercem seu efeito benéfico é motivo de debates atualmente. A seleção de uma cepa adequada de microrganismos deve ser a primeira exigência para seu uso. A composição da preparação varia desde aqueles que contém uma cepa, àqueles que contém várias cepas. Os produtos que contém vários microrganismos normalmente atuam em um espectro maior e espera-se que o mesmo atue em diferentes espécies de animais hospedeiros e contra infecções microbianas (TIMMERMAN et al., 2004).

Probióticos encontrados numa forma viável no trato gastrintestinal são resultados de: (a) o número de bactérias ácido lácticas inoculadas que são capazes de sobreviver as barreiras biológicas, (b) o seu crescimento no lúmen intestinal e a saturação no nicho intestinal e (c) evacuação devido à dificuldade de adesão ao epitélio intestinal (FRIZZO et al., 2010a).

O uso convencional dos probióticos na modulação da saúde gastrointestinal, como na melhoria a intolerância a lactose, no aumento da resistência natural a doenças infecciosas no trato gastrointestinal e na diminuição da diarreia e de timpanismo, têm sido investigado e documentado (LIONG, 2007). Em experimentos clínicos, probióticos têm sido reportados em melhorar o crescimento de animais domésticos, incluindo vacas (DOREAU; JOUANY, 1998), bezerros recém nascidos e leitões (KYRIAKIS et al., 1999) e galinhas (TELLEZ et al., 2001). O que os produtores esperam de um produto probiótico, é a melhora no desempenho e conversão alimentar para a espécie desejada, redução na mortalidade, morbidade e benefícios para o consumidor pela melhora na qualidade dos produtos de origem animal (MUSA et al., 2009). A ação benéfica dos probióticos sempre deve visar manter a microbiota intestinal balanceada, de forma que o animal esteja pronto para se defender da colonização por patógenos (MORRILL et al., 1995).

Para ser um probiótico, uma cepa de bactéria necessita preencher alguns critérios: deve ser saudável, deve resistir aos ácidos gástricos e a bile, deve aderir as células epiteliais intestinais, deve ser capaz de permanecer longos períodos no trato digestivo, produzir substâncias antimicrobianas, modular respostas imunes e resistir a processos industriais (MUSA et al., 2009).

O evento que determinou o desenvolvimento do probiótico para animais foi a descoberta que pintinhos recém nascidos poderiam ser protegidos contra colonização de salmonela intestinal quando recebiam uma dose de suspensão de conteúdo intestinal de galinhas adultas saudáveis (NURMI; RANTALA, 1973).

Os microrganismos mais utilizados incluem aqueles derivados de *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* (HEYMAN; MÉNARD, 2002). Para ruminantes, além desses também temos *Enterococcus*, *Propionibacterium*, cepas de *Megasphaera elsdenii* e *Prevotella bryantii* e produtos contendo leveduras como o *Saccharomyces* e *Aspergillus* (SEO et al., 2010). Bactérias de probióticos têm sido efetivas em aves, suínos e bovinos jovens. A combinação de diferentes cepas nos probióticos pode aumentar seus efeitos benéficos quando comparado com probióticos contendo apenas um tipo de microrganismo, por causa do seu efeito sinérgico de adesão (COLLADO et al., 2007).

Muitas pesquisas com probióticos procuram estudar cepas de bactérias ácido lácticas, porém diferentemente destas, os *Bacillus* não são encontrados no trato gastrointestinal. *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* são cepas muito semelhantes geneticamente, e são conhecidas por produzirem enzimas (amilases e proteases) (REY et al., 2004), produzirem vitamina K (YANAGISAWA; SUMI, 2004) e substâncias antimicrobianas como a bacitracina, além de terem efeitos imunoestimulantes (RIDEELL et al., 2010). Todos estes efeitos benéficos ao animal tem levado a condução de inúmeros estudos abrangendo diferentes espécies animais recebendo essas duas cepas (RIDEELL et al., 2010; ALEXOPOULOS et al., 2004; SAMANYA; YAMAUCHI, 2002; KUSTOS et al., 2004; DIZAJI; PIRMOHAMMADI, 2009)

Quatro mecanismos foram resumidos para explicar os efeitos de proteção dos probióticos: antagonismo pela produção de substâncias antimicrobianas (VANDENBERGH, 1993); competição com os patógenos pelos locais de adesão ou por fontes de nutrientes (GUILLOT, 2003); imunomodulação do hospedeiro (ISOLAURI et al., 2001); e inibição da produção de toxinas bacterianas (BRANDÃO et al., 1998). Os três primeiros mecanismos são atribuídos as bactérias ácidos lácticas, enquanto os dois últimos são mais atribuídos a leveduras.

Os probióticos têm demonstrado melhora na taxa de crescimento animal. Os microrganismos utilizados têm mostrado eficácia com relação a microbiota intestinal, melhorando consumo de alimentos, taxa de conversão alimentar, ganho de peso

diário e peso vivo em aves, suínos, ovinos, caprinos, bovinos e equinos (CHIOFALO et al., 2004; LI et al., 2006; TORRES-RODRIGUEZ et al., 2007; SAMLI et al., 2007; CASEY et al., 2007). Probióticos têm efeito positivo em vários processos digestivos, especialmente celulolíticos e na síntese de proteína microbiana (YOON; STERN, 1995). São estabilizadores de pH ruminal e lactato, aumentam a absorção de alguns nutrientes e apresentam efeito de promotor de crescimento que pode ser comparado ao tratamento com avilamicina (MOUNTZOURIS et al., 2007). Os animais suplementados com probióticos tem efeito benéfico nas produções de leite subsequentes, gordura e proteína (SARA et al., 2002, KRITAS et al., 2006). Parâmetros de sangue e do leite em suínos foram significativamente melhorados, como mostrado pelo valor mais elevado de colesterol sérico que normalmente ocorre durante a lactação, foi mais pronunciado em animais que receberam probiótico, além de concentração lipídica total e aumento da gordura e proteína do leite, levando também a um melhor desempenho da leitegada (ALEXOPOULOS et al., 2004).

No caso de bezerros, onde as primeiras semanas de vida são de extrema importância para o desenvolvimento e produção futuros do animal, há inúmeros trabalhos verificando a utilização de probióticos. Muitos destes trabalhos mostram melhora no desempenho (KAWAKAMI et al., 2010; KOWALSKI et al., 2009; JATKAUSKAS et al., 2010; SOLO et al., 2014), diminuição na incidência de diarreia (BATISTA et al., 2008; JATKAUSKAS et al., 2010; KIM et al., 2011), enquanto outros autores não tiveram efeitos significativos (BAYATKOUHSAR et al., 2013; FRIZZO et al., 2010). O que alguns deles salienta é que os efeitos esperados dos probióticos ficam mais expressivos quando os animais estão sob estresse (TIMMERMAN et al., 2005; CRUYAGEN et al., 1995, RIDELL et al., 2010), o que ocorre geralmente até as 2 primeiras semanas de vida.

Além disso, há estudos que mostram o efeito de probióticos associados a melhora no sistema imune, como melhora na resistência a doenças e redução do risco de alergias. No organismo de um animal saudável, o probiótico estimula resposta imune não específica e aumenta o sistema de proteção (CESLOVAS et al., 2005). O probiótico que aumenta os níveis de imunoglobulinas tem mais efeitos positivos no crescimento, produção e habilidade de resistência a doenças (CETIN et al., 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Bezerreiro Experimental “Evilásio de Camargo” do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo. Foram utilizados 24 bezerros machos da raça Holandês, provenientes do rebanho da Fazenda Agrindus Ltda, Descalvado, SP, Brasil. Após o nascimento, os animais receberam 4 L/d de colostro, em duas refeições diárias, até o segundo dia de vida e então transportados ao bezerreiro experimental. No bezerreiro experimental foram alojados individualmente em abrigos tropicais, sendo contidos por corrente de 1,80 m de comprimento, fixada ao solo em uma das extremidades e acopladas a uma coleira, impedindo deste modo o contato físico entre os bezerros. Os abrigos são de estrutura de madeira e cobertura de zinco com suporte para comedouro e balde para água. Este sistema de criação permite mudar o abrigo de lugar diariamente de modo que o bezerro esteja sempre em local seco e limpo de fezes. Os abrigos foram dispostos em local plano com gramado, orientados com a lateral sentido leste-oeste para que em todo momento do dia o animal possuísse sombra ao seu alcance.

Os animais foram distribuídos em blocos, considerando-se o peso ao nascer, e então alocados em um dos tratamentos: 1) suplementação com probiótico Bioplus (Ouro Fino SA, Ribeirão Preto, SP, Brasil), na dose de 2g/d, a qual foi adicionada ao sucedâneo lácteo no momento do seu fornecimento; e 2) controle, com sucedâneo fornecido sem adição de probiótico. O sucedâneo foi fornecido no volume de 4 L/d (Feedtech, De Laval Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil), dividido em duas refeições diárias (7h e 17h), e os animais tiveram livre acesso ao concentrado inicial comercial (Ração Bezerra Ag Milk Agrocere Multimix Nutrição Animal Ltda., Rio Claro, São Paulo, Brasil) e água. O concentrado farelado foi fornecido toda manhã, *ad libitum* pesando-se a sobra do dia anterior, de forma a se obter o consumo diário de concentrado. A mistura do sucedâneo com probiótico foi feita na ESALQ/USP, de acordo com as instruções do fabricante do probiótico.

Amostras de concentrado e sucedâneo foram colhidas durante o período experimental e moídas em moinho de facas com peneira com crivos de 1 mm para a determinação de matéria seca (MS) e extrato etéreo de acordo com Campos et al. (2002); proteína bruta (PB) através de combustão, conforme método de Dumas, utilizando-se o analisador de nitrogênio modelo FP-528 (Leco Corporation, St.

Joseph, MI, EUA) e fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) pelo método descrito por Van Soest, Robertson e Lewis (1991). Os valores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados de acordo com a equação proposta por Weiss (1993) e os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados através da equação (1):

$$(1) \text{ CNF (\%MS)} = 100 - (\text{PB} + \text{EE} + \text{FDN} + \text{MM}),$$

Onde,

PB, EE, FDN e MM são expressos em % da MS

A composição bromatológica do concentrado inicial e sucedâneo lácteo, utilizados durante o experimento estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição químico-bromatológica do sucedâneo lácteo e concentrado inicial

	Alimentos	
	Sucedâneo ¹	Concentrado ²
Matéria Seca, %	96,05	90,68
Matéria Mineral, % MS	6,16	7,16
Proteína Bruta, % MS	20,05	24,57
Extrato Etéreo, % MS	15,46	4,29
FDN, % MS	0,65	18,12
Nutrientes digestíveis totais (NDT)	-	83,05
Energia Bruta, Mcal/kg	4.557,92	-

¹Feedtech, De Laval Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil (12,5% de sólidos); ²Ração Bezerra Ag Milk Agroceres Multimix Nutrição Animal Ltda

Os animais foram pesados ao nascer e semanalmente, em balança mecânica, sempre antes do fornecimento da dieta líquida do período da manhã, até a 8ª semana de vida, quando se encerrou o período experimental. Foram também tomadas semanalmente medidas de altura na cernelha e largura na garupa com o auxílio régua graduada em centímetros; e perímetro torácico com o auxílio de fita flexível, também graduada em centímetros.

O monitoramento do escore fecal foi realizado através de observações visuais diárias, utilizando-se adaptações do método descrito por Larson et al. (1977), quanto a fluidez das fezes. As fezes foram classificadas em normal (1); mole (2); corrente (3); aquosa (4) ou consistência líquida (5).

Amostras de fezes foram colhidas da ampola retal de todos os animais semanalmente, a partir da 2^o semana, para medição de pH e identificação e contagem de ovos de endoparasitas por grama de fezes. O pH fecal foi medido logo após a coleta das amostras, sendo utilizados aproximadamente 10g de fezes frescas homogeneizadas com 10 mL de água destilada, e leitura direta em pHmetro (Tec-5, Tecnal Ltda., Piracicaba, SP, Brasil). Para a contagem de endoparasitas, foi utilizado o método de Gordon e Whitlock (1939), onde 4g de fezes foram homogeneizadas com 56 mL de solução de cloreto de sódio hipersaturada. A solução era homogeneizada e em seguida peneirada, sendo colocada com auxílio de uma seringa de 20 mL na câmara de McMaster, para leitura em microscópio (Bioval, Curitiba, PR, Brasil) depois de descansar de 2 a 4 minutos.

Uma alíquota foi utilizada para contagem dos microrganismos intestinais conforme Kawakami et al. (2011). Cerca de 1g de amostra foi homogeneizado em 9 mL de água destilada esterilizada, para a realização de diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} . De cada diluição foram retiradas alíquotas de 50µl para contagem de enterobactérias e bactérias ácido-láticas (BAL). Placas Petrifilm™ (3M do Brasil®, Sumaré, SP, Brasil) foram utilizadas para contagem de enterobactérias. As mesmas foram incubadas a $32,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ em incubadora BOD Modelo TE-402 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) por 24 ± 2 horas. Após o período de incubação, a contagem prosseguiu, considerando as colônias vermelhas com zonas amarelas e/ou colônias vermelhas com bolhas de gás, com ou sem bordas amarelas como positivas para enterobactérias. A contagem de BAL também foi realizada com auxílio de placas do tipo Petrifilm® AC (3M do Brasil®, Sumaré, SP, Brasil), as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose com gerador de atmosfera de anaerobiose (ANAEROBAC, Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil), em estufa BOD Modelo TE-402 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) por 48 ± 3 horas.

As placas utilizadas para contagem continham de 30 a 300 colônias. Os valores das contagens foram correlacionados com as respectivas diluições e os resultados apresentados em unidades formadoras de colônia (UFC). Para ajustar as contagens as amostras de fezes foram submetidas a secagem em estufa a 105°C , para determinação de MS, de forma que o peso inicial da amostra pudesse ser corrigido. Assim, os valores foram expressos em UFC/g de MS de fezes.

Amostras de sangue foram colhidas semanalmente, a partir da segunda semana de vida, sempre duas horas após o fornecimento da dieta da manhã,

através de punção da jugular; utilizando-se tubos vacuolizados contendo fluoreto de sódio como antiglicolítico e EDTA de potássio como anticoagulante. Uma alíquota do sangue foi destinada para a determinação de hematócrito, sendo o restante das amostras centrifugadas a 2000 x g, durante 20 minutos, a temperatura de 4° C para a obtenção do plasma. O plasma foi armazenado em microtubos plásticos os quais mantidos em freezer para posterior determinação de glicose plasmática, proteína total, albumina e N-uréico.

As amostras de sangue destinadas para hematócrito, colhidas semanalmente, foram acondicionadas em tubos capilares para micro hematócrito (Classcyto®), sem heparina, preenchendo-se cerca de $\frac{3}{4}$ dos tubos. Uma extremidade do tubo foi vedada com o auxílio de um isqueiro. Os tubos capilares foram centrifugado em centrífuga de microhematócrito – Modelo SPIN 1000 (MICROSPIN), a 12.000 x g, por 10 minutos. Após centrifugação, a leitura dos valores de hematócrito foi realizada em régua própria para este fim, e os resultados expressos em porcentagem.

A análise de glicose plasmática foi realizada utilizando-se kit enzimático GLICOSE HK LIQUIFORM (LABTEST Diagnóstica S.A.) por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorbância de 505nm com leitura feita em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA 200 (CELM, Barueri, SP, Brasil).

As concentrações de proteínas totais foram obtidas através do kit enzimático PROTEINAS TOTAIS – Ref: 99-250 (LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorbância de 540 nm em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil). Para o ensaio foram utilizados 400 µl de amostra ou solução padrão (4g/dL), incubados por 1 minuto a 37°C juntamente com solução reagente. Após incubação, as amostras, juntamente com o reagente formam um composto de cor purpura, cuja absorbância foi relacionada com a concentração de proteínas totais.

As concentrações de albumina foram determinadas a partir do kit enzimático ALBUMINA – Ref: 19 (LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorbância de 620 nm em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil). O método utiliza reagente de cor pipetado na amostra (relação amostra/reagente: 1:101) e após o período de incubação, foi realizada a leitura da absorbância para obtenção dos valores de albumina plasmática em g/dL.

A determinação de ureia foi feita através do sistema enzimático UREA UV Liquiform – Ref.: 104 (LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) por fotometria em ultravioleta usando cinética de dois pontos (tempo fixo), utilizando filtro de absorvância de 340 nm em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA 200 (CELM, Barueri, SP, Brasil).

3.1 Análise estatística

Os dados de desempenho como peso corporal, consumo de concentrado e ganho de peso diário foram analisados como medidas repetidas no tempo através do procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (9.1), conforme modelo (1). Para efeito de comparação de médias foi utilizado o teste t de Student, sendo as médias estimadas através do método dos quadrados mínimos (LSMEANS), com nível de significância de 5%.

$$(1) Y_{ijk} = \mu + T_i + I_j + TI_{ij} + B_k + e_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} = variável resposta

μ = média geral

T_i = Efeito de tratamento

I_j = efeito de idade

TI_{ij} = interação Tratamento X Idade

B_k = Efeito de bloco

e_{ijk} = erro experimental

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostram que o consumo de concentrado não foi afetado pela suplementação de probiótico ($P>0,05$). Do mesmo modo, não houve efeito significativo para a interação Tratamento x Idade, houve, como esperado, efeito significativo para a idade ($P<0,0001$) com aumentos constantes até a oitava semana de vida dos animais, devido à crescente necessidade de consumir alimento sólido com o avançar da idade (QUIGLEY, 2001).

Tabela 2 – Consumo de concentrado (g/dia), peso corporal (kg) e ganho de peso diário (g/d) de bezerros suplementados ou não com probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo

	Tratamentos			P< ⁽²⁾		
	Controle	BioPlus	EPM ⁽¹⁾	T	I	T x I
Consumo de concentrado, g/d	372,8	362,0	28,59	0,89	<0,0001	0,72
Peso Vivo, Kg						
Inicial	36,5	35,4	0,82	0,48	-	-
Final	57,4	57,2	1,99	0,92	-	-
Média do período total	43,3	43,1	0,67	0,93	<0,0001	0,9
Ganho de peso, g/d						
Média do período	367,4	436,9	30,22	0,34	<0,0001	0,72

⁽¹⁾EPM: erro padrão da média

⁽²⁾T: efeito de Tratamento; I: efeito de Idade; TxI: efeito da interação Tratamento x Idade

A ausência de efeito significativo no consumo de bezerros suplementados com probiótico, contendo cepas de bactérias ácido lácticas, também foi observado por Cruywagen et al. (1996) e Kim et al. (2011), que apresentaram valores de consumo semelhantes ao deste trabalho. Frizzo et al. (2011) que também estudaram o efeito de cepas de bactérias ácido lácticas em bezerros, observaram consumo de concentrado até 3 vezes maior que os valores observados no presente estudo, provavelmente devido ao fornecimento dessas cepas sob condições de estresse nutricional.

Outros estudos avaliaram o probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus®), porém observaram sua suplementação em outras espécies animais, obtendo resultados heterogêneos. Em estudo de Wang et al. (2008) com leitões na fase de crescimento, houve aumento de 4,6% no consumo de ração, o que resultou em 69 kg a mais de ração para os animais suplementados. Alexopoulos et al. (2004) também testaram a eficácia de BioPlus® em leitões desmamados,

porém não houve diferença entre o consumo dos animais que receberam o probiótico e os animais do grupo controle. Dizaji e Pirmohammadi testaram BioPlus® em galinhas de postura e também não obtiveram diferenças significativas nos resultados, Rahimi e Khaksefidi testaram o BioPlus® em frangos, também não obtendo diferenças nos valores de consumo.

Segundo Davis e Drackley (1998), quanto mais cedo for introduzido o alimento sólido para os bezerros, mais rápida será a transição de pré-ruminante para ruminante. No entanto, a contribuição nutricional do concentrado para o bezerro durante os primeiros 14 dias de vida é baixa, sendo a dieta líquida a principal fonte nutricional do animal para manutenção e crescimento. O concentrado passa a ter contribuição mais expressiva quando o animal apresenta consumo de pelo menos 450g por dia.

Stamey et al. (2012) afirmam que monitorar o consumo de concentrado antes do desaleitamento é um manejo de extrema importância e recomendam o consumo de pelo menos 1kg/d antes do desaleitamento para assegurar o crescimento contínuo do animal sem prejuízos com a retirada da dieta líquida.

Figura 2 - Consumo de concentrado inicial (g/d) de bezerros recebendo ou não suplementação de probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo

O peso vivo e o ganho de peso diário (Tabela 2) também não sofreram influência da suplementação de probiótico ($P>0,05$). No entanto houve efeito da idade (Figura 3 e 4), já que os animais estavam em crescimento e houve aumento no consumo de concentrado com o avançar da idade (Figura 2). A queda de peso

ocorrida na segunda semana de vida dos animais reflete o aumento dos casos de diarreia ocorridos principalmente durante até os primeiros 15 dias de vida dos bezerros, fato comum na maior parte dos sistemas de criação.

Mokhber-Dezfouli et al. (2007) testaram um probiótico composto por mistura de bactérias ácido lácticas e fungos, por um período de 90 dias. Durante os dois primeiros meses, os animais do tratamento e grupo controle, também não apresentaram diferenças entre seus pesos vivos. Porém, os animais apresentaram pesos ao final de 60 dias, 34% maiores do que os pesos dos animais do tratamento do presente estudo.

Jatkauskas e Vrotniakiene (2010) testaram uma cepa de bactéria ácido láctica, *Enterococcus faecium*, e tiveram grande diferença entre os pesos vivos dos bezerros quando comparados os grupos tratamento e controle, com valores de até 7,6 kg maiores no grupo que recebeu probiótico, em 56 dias de experimento. Sun et al. (2010), utilizou cepas de *Bacillus subtilis natto* durante a fase de aleitamento em bezerros suplementados no sucedâneo. Os animais suplementados apresentaram a eficiência alimentar 18% maior do que os animais do grupo controle. Nesse experimento, os animais eram desaleitados conforme consumo, o que resultava em animais do grupo suplementado serem desaleitados uma semana mais cedo do que os animais do grupo controle, além de finalizarem o aleitamento mais pesados.

Figura 3 – Peso vivo (kg) de bezerros recebendo ou não suplementação de probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo

O ganho de peso médio diário não foi afetado pela suplementação com probiótico (Tabela 2). Pode-se observar que há uma redução no ganho de peso dos

animais da primeira para a segunda semana de experimento, o qual pode ser devido ao estresse da viagem, estresse de mudança de ambiente e volume de sucedâneo limitado, o que pressiona o animal a iniciar a ingestão de concentrado (Figura 4). Essa inclusão de uma nova alimentação, pode causar perda de peso, devido ao intervalo entre o animal iniciar o consumo até alcançar a ingestão suficiente. Observa-se também que durante a quarta e a quinta semana, houve uma diminuição no ganho de peso, provavelmente pelo aumento da diarreia nas duas semanas anteriores.

Sun et al. (2010) utilizaram cepas de *Bacillus* durante o aleitamento em bezerros, obtendo resultados significativos. Os animais suplementados apresentaram ganho de peso diário 12% maior, sem aumento no consumo de concentrado, houve assim, uma melhora na eficiência alimentar desses animais, o que é de extremo interesse para o sistema de criação de bezerras. Link e Kovac (2006) testaram BioPlus® em suínos desmamados, observando ganho de peso 14% maior nos grupos que consumiram probiótico comparando aos grupos que não consumiram. Alexopoulos et al. (2004) utilizaram BioPlus® em porcas prenhas, obtendo resultados benéficos para a leitegada, como diminuição da diarreia e da mortalidade e aumento do peso ao desmame. Mas além desses resultados, as porcas suplementadas apresentaram aumento no consumo no pós parto de até 11,5Kg nos 14 dias após a parição.

Figura 4 – Ganho médio diário (g/d) de bezerros recebendo ou não suplementação de probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo

Tabela 3 – Altura de cernelha, perímetro torácico e largura de garupa de bezerras recebendo ou não suplementação de probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* via sucedâneo

Parâmetro	Tratamento		EPM ⁽¹⁾	P < ⁽²⁾		
	Controle	BioPlus		T	I	T x I
Altura na cernelha, cm						
Média do período total	74,7	80,9	0,23	0,70	<,0001	0,86
Ganho, cm/semana	0,84	1,01	0,66	0,35	0,001	0,88
Perímetro torácico, cm						
Média do período total	80,1	80,4	0,40	0,71	<,0001	0,39
Ganho, cm/semana	1,78	2,03	0,63	0,49	0,01	0,64
Largura da garupa, cm						
Média do período total	20,3	22,1	0,09	0,68	<,0001	0,86
Ganho, cm/semana	0,40	0,42	0,12	0,99	0,62	0,79

⁽¹⁾EPM: erro padrão da média

⁽²⁾T: efeito de Tratamento; I: efeito de Idade; TxI: efeito da interação Tratamento x Idade

As medidas de crescimento não foram afetadas pela suplementação com probiótico e também não houve efeito para a interação Tratamento x Idade, houve sim, efeito significativo para Idade ($P < 0,0001$; Tabela 3; Figura 5). Apesar da ausência de efeito significativo, os animais suplementados com probiótico apresentaram médias numéricas de ganhos semanais maiores do que o grupo controle, principalmente nos parâmetros de perímetro torácico e altura de cernelha.

As mensurações corporais são facilmente aferidas e de extrema importância para o sistema de criação, além disso, são bons indicadores de falhas de manejo, seja alimentar, sanitário ou de mão de obra. Essas medidas permitem o acompanhamento do crescimento das bezerras para o sucesso do programa de criação de novilhas e, se necessário, são realizadas alterações no manejo. As taxas de crescimento em bezerras devem ser controladas, para garantir um desenvolvimento ósseo correto juntamente com o crescimento dos tecidos, para evitar ganhos de peso excessivos e comprometimento da produção de leite futura e também promover a entrada na puberdade de animais mais precoces (BAILEY; MURPHY, 1999).

Figura 5 - Altura da cernelha, perímetro torácico, e largura de garupa de bezerros recebendo ou não suplementação de probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo

Ridell et al. (2010) testaram a adição de probiótico contendo *Bacillus* no sucedâneo e no concentrado e também não observaram efeito da suplementação nas medidas corporais. No estudo de Jenny et al. (1991), o qual testava dois probióticos, um contendo uma mistura de microorganismos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis* e *Bacillus subtilis*) e outro contendo somente *Bacillus subtilis*, observou valores numericamente maiores de altura de cernelha e perímetro

torácico do que no presente trabalho, no entanto também não foram encontradas diferenças estatísticas.

Frizzo et al. (2010), testando uma mistura de 3 cepas de bactérias ácido lácticas, apresentaram dados de perímetro torácico próximos aos apresentados no presente estudo. Por outro lado, os dados de altura de cernelha foram até 10 cm maiores tanto para o grupo controle quanto para o grupo suplementado com probiótico. Apesar disso, também não houveram diferenças significativas entre os grupos.

A maioria dos dados de ganho/semana de altura na cernelha do presente estudo estão abaixo da média recomendada por Hoffman (1997), que indica valores médios em torno de 1,3 cm/semana para animais da raça Holandês, porem a média de altura de cernelha do grupo suplementado com probiótico, está dentro do valor recomendado de 80,6 cm em 60 dias de vida dos animais. Os resultados observados demonstram que tanto os animais recebendo probióticos como os animais do tratamento controle obtiveram crescimento positivo contínuo de acordo com a evolução da idade.

Figura 6 – Escore fecal de bezerros recebendo ou não suplementação de probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo

A diarreia é a principal causa de morbidade e mortalidade em bezerros, resultando em grandes perdas devido a medicamentos, assistência veterinária e muitas vezes pelo prejuízo no desenvolvimento do animal e consequentemente em sua produção futura.

No presente estudo não houveram diferenças significativas entre o escore fecal dos bezerros do grupo suplementado por probiótico e dos animais do grupo controle (Figura 6) ao longo das 8 semanas de experimento. Segundo Larson et al. (1977), escores maiores ou iguais a 3 são considerados diarreia, o que no presente estudo, se verificou principalmente na segunda semana de vida dos animais. Henrichs et al. (2009) obteve escores fecais similares em seus animais, independente do tratamento, exibindo um padrão típico assim como no presente estudo, com um pico na segunda semana seguido por declínio e estabilização em escore 1 em torno da sexta semana de vida dos animais. Kowalski et al. (2010) também realizou um experimento onde testou as mesmas cepas bacterianas utilizadas no presente estudo, utilizando animais a partir de 15 dias de idade, onde também não obteve diferenças com relação ao escore fecal dos bezerros que utilizaram o probiótico e os animais do grupo controle.

Os dados estatísticos do OPG não estão apresentados pois não houve presença ovos de endoparasitos nos animais, em nenhum momento do experimento, tanto no grupo que recebeu suplementação, quanto nos animais do grupo controle.

Houve uma tendência de efeito da suplementação com Bioplus no pH fecal de bezerros em aleitamento ($P=0,07$), com diferença significativa nas semanas 1 ($P=0,02$) e semana 2 ($P=0,01$), mas sem efeito significativo no restante do período avaliado. Quando observados os valores de pH, nota-se um menor valor (5,78) para o BioPlus® na primeira semana de tratamento, o que sugere que nessa semana os animais apresentavam maior população de bactérias benéficas para sua saúde intestinal (bactérias produtoras de ácido láctico). Já na segunda semana, o valor de pH fecal para o grupo controle apresenta-se menor do que o tratamento (6,19 vs. 6,66), o que pode ser relacionado com o período de maior incidência de diarreia e de provável mudança no perfil de microrganismos presentes no intestino, sugerindo um aumento na população de enterobactérias apesar do consumo do probiótico.

Figura 7 – pH das fezes de bezerros recebendo ou não suplementação de probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo

A contagem de enterobactérias apresentou-se menor durante todo o período avaliado em relação ao número de bactérias ácido-láticas (BAL) (Tabela 4). Além disso, a contagem de enterobactérias apresentou efeito para idade ($P < 0,04$), ocorrendo uma grande diminuição de colônias conforme o passar das semanas (Figura 8). O mesmo efeito porém, não ocorreu com as BAL, que apresentou variação ao longo das semanas, contudo, mantendo um mesmo padrão de colonização.

Tabela 4 – Média da contagem de enterobactérias e bactérias ácido lácticas ($\log_{10}$ UFC/g MS) de bezerros recebendo ou não suplementação de probiótico (BioPlus) contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* via sucedâneo

log 10 UFC/g MS	Tratamentos			$P <^{(2)}$		
	Controle	BioPlus	EPM ⁽¹⁾	T	I	TxI
Enterobactérias	6,79	7,38	0,82	0,62	0,04	0,94
Bactérias ácido-láticas	10,86	10,54	0,39	0,56	0,64	0,42
pH fecal médio	6,78	6,74	0,06	0,64	0,04	0,13

⁽¹⁾EPM: erro padrão da média

⁽²⁾T: efeito de Tratamento; I: efeito de Idade; TxI: efeito da interação Tratamento x Idade

As BAL compreendem um vasto número de gêneros e espécies, além disso são gram positivas, catalase negativas e crescem sob ambientes microaerófilos até

estritamente anaeróbicos. Os gêneros mais importantes incluem: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, entre outros (KLEIN et al., 1998).

Bezerros nascem com o trato gastrointestinal estéril, mas aos 3 dias de vida possuem, predominantemente em sua flora, coliformes, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. A diarreia que ocorre em bezerros tem sido relacionada a diminuição da flora benéfica e aumento do número de coliformes nas fezes (QUEZADA-MENDOZA et al., 2011), e os possíveis benefícios das BAL, incluem supressão do crescimento de coliformes pela sua implantação do trato gastrointestinal, possivelmente diminuindo ocorrência de diarreias (ELLINGER et al., 1980)

Ellinger et al. (1980) forneceram *Lactobacillus acidophilus* durante 3 semanas para bezerros, verificando menor contagem de colônias de enterobactérias nos animais suplementados, porém o número de BAL foi maior nos animais do grupo controle. Isso pode ser explicado por dados da literatura (HENRICHS et al., 2009; RIDELL et al., 2010; FRIZZO et al., 2010) que defendem que a suplementação de probióticos só é efetiva quando os animais estão sob condições de estresse. Jenny et al. (1991) ao fornecer uma mistura probiótica contendo *Lactobacillus* e *Bacillus* a bezerros durante 30 dias, também não obteve aumento da contagem fecal de BAL. Segundo esses mesmo autores, a contagem de BAL mantendo-se sempre maior que a de enterobactérias, revela uma flora intestinal já balanceada, que provavelmente não será afetada pelo uso de probióticos.

Figura 8 – Contagem de bactérias ácido lácticas e enterobactérias (log 10 UFC/ g MS) de bezerros recebendo ou não suplementação de probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo

Todos os animais apresentaram diarreia em algum momento do experimento, levando-se em conta os parâmetros de Larson et al. (1977), onde é considerado diarreia, escores fecais maiores ou iguais a 3.

Apesar do efeito proposto pelo probiótico ser o de aumentar a população de bactérias benéficas no trato digestório dos animais, fazendo com que a competição pelas bactérias prejudiciais seja maior e consequentemente diminuir a diarreia, não foi observado esse efeito já que o número de dias em diarreia dos animais que foram suplementados com probiótico foi maior do que os animais do grupo controle. Diferentemente do que foi encontrado no experimento de Kritas et al. (2006) testando o mesmo probiótico, BioPlus®, porém utilizando cordeiros onde verificou-se

13,1% de mortalidade no grupo controle, contra 7,8% de mortalidade (causadas por diarreia) nos animais suplementados com probiótico. Abe et al. (1995) testaram a suplementação de bactérias ácido lácticas em bezerros até a 8ª semana de vida, obtendo 7 vezes mais casos de diarreia nos animais do grupo controle.

Tabela 5 – Número de animais doentes, dias doentes, dias em tratamento e mortalidade dos bezerros que receberam ou não probiótico

	Controle	BioPlus
Nº animais doentes		
diarreia*	15	15
Tristeza	2	3
pneumonia	2	2
Dias doentes (diarreia)	12,4	14,9
Dias em tratamento (diarreia)		
soro oral	11	19
antibiótico	2	4
Mortalidade	3	1

*Todos os animais apresentaram diarreia em algum período do experimento

Os perfis metabólicos e alterações hematológicas são importantes para o monitoramento da adaptação do animal a vida extra uterina. Além disso, auxiliam na identificação de possíveis falhas de manejo e no diagnóstico de doenças como a tristeza parasitária, de grande ocorrência em nossa região, além de transtornos metabólicos e doenças nutricionais.

Tabela 6 – Parâmetros sanguíneos de bezerros recebendo ou não suplementação de probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* via sucedâneo

Variáveis	Tratamentos		EPM ⁽¹⁾	P< ⁽²⁾		
	Controle	Probiótico		T	I	T x I
Hematócrito, %	21,2	20,5	0,61	0,61	<,0001	0,28
Ureia, mg/dL	19,5	18,8	1,44	0,69	0,02	0,06
Glicose, mg/dL	102,7	104,4	1,47	0,811	0,023	0,789
Proteína total, g/dL	7,0	7,2	0,17	0,532	<,0001	0,192
Albumina, g/ dL	2,5	2,5	0,64	0,849	0,13	0,266

⁽¹⁾EPM: Erro padrão da média

⁽²⁾T: Efeito de Tratamento; I: efeito de Idade; TxI: efeito de interação Tratamento x Idade

O hematócrito corresponde, em porcentagem, ao volume de hemácias em relação ao volume total de sangue. Valores do hematócrito podem variar conforme a hidratação do animal, a desidratação e redução no volume plasmático resultam em valores mais altos, hipervolemia e aumento no volume plasmático resultam em valores mais baixos (DELFINO et al., 2012).

Os valores médios de hematócrito não foram afetados pela suplementação de probiótico ($P > 0,05$). Nas primeiras semanas, os valores de hematócrito apresentaram-se mais altos, e com o avanço da idade, os valores de hematócrito diminuíram ($P > 0,0001$), até a sexta semana, quando então houve novo aumento até a oitava semana. Essa queda até a sexta semana de vida está de acordo com outros dados na literatura (TAO et al., 2012; HULBERT et al., 2011), mas o aumento que ocorre nas duas últimas semanas pode ser devido a desidratação.

Figura 9 – Valores de hematócrito (%) de bezerros suplementados ou não com probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo

A concentração de ureia não foi afetada ($P>0,05$) pela suplementação de probiótico, houve, no entanto, efeito da idade ($P<0,05$). Assim que o animal nasce, os rins assumem a função de excreção que antes era realizada pela placenta, além de também ser encarregado do balanço hidroeletrólítico, por isso a influência da idade dos bezerros sobre os níveis de ureia sérica, revelando o crescente avanço da eficiência da função renal com o avançar da idade.

O presente estudo apresenta valores de ureia dentro de valores esperados para o período de vida dos animais, a diferença encontrada com relação a outras pesquisas pode ser justificada pela grande sensibilidade dos níveis de ureia a fatores de manejo como a nutrição, em função da ingestão proteica (BENESI, 2005). Quanto maior for a ingestão de proteínas na ração, maior é a concentração de ureia sanguínea e quando a ingestão de proteínas é insuficiente, a concentração de ureia diminui (GONZÁLEZ; SILVA, 2003).

Feitosa et al. (2009) buscando dados para fazer valores de referência em bezerros de até 30 dias, encontrou valores de ureia que variavam de 6,6 mg/dL a 29,14 mg/dL. Gregory et al. (2004) obteve valores de $18,49 \pm 4,5$ mg/dL em bezerras de até 3 meses de idade.

Figura 10 – Concentrações plasmáticas de ureia (mg/dL) ao longo das semanas de bezerros suplementados ou não com probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo

A glicose indica o metabolismo energético do animal, e segundo Wittwer et al. (2000), o organismo mantém um forte controle enzimático e hormonal deste metabólito, o que pode tornar sua concentração plasmática constante independente da dieta. Nas primeiras semanas de vida, os bezerros têm praticamente 100% de sua glicose absorvida originada da ingestão da dieta líquida, o que torna os valores plasmáticos de glicose nessa fase muito semelhantes a valores observados em monogástricos. Porém, conforme ocorre o desenvolvimento ruminal, a glicose passa a ter origem no AGCC absorvidos pelo rúmen, fazendo com que as concentrações de glicose plasmática diminuam.

A suplementação com probiótico não afetou ($P > 0,05$) a concentração média de glicose durante as 8 semanas de experimento (Tabela 6). A interação Tratamento x Idade também não apresentou-se significativa, porém houve efeito da idade ($P < 0,05$), assim como observado por Quigley et al. (1991) que encontraram valores de 114mg/dL em bezerros com 1 semana de vida e valores em torno de 76 mg/dL em bezerros depois de 2 a 3 semanas já desaleitados. Esses dados estão em acordo com Mohri et al. (2006) que em bezerros com 24-48h de vida encontraram valores de glicose de 115mg/dL e em bezerros com 56 dias de vida encontraram valores em torno de 72 mg/dL. No presente estudo não foi possível observar decréscimos mais acentuados de valores, pois não houve medições após o desaleitamento, onde seria o período de maior evidência.

Figura 11 - Concentrações plasmáticas de glicose ao longo das semanas em bezerros suplementados ou não com probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo

A proteína total não apresentou efeito da suplementação de probiótico ($P > 0,05$). Apresentou efeito da idade, ocorrendo queda após a primeira semana, devido a diminuição de proteínas circulantes ingeridas do colostro, e após a 6ª semana um aumento significativo, provavelmente devido ao início da produção pelo próprio animal (KANECO et al., 2000). Outro motivo possível é devido ao aumento da ingestão de proteína pela dieta, já que a diminuição das proteínas totais no plasma está relacionada a deficiência na alimentação, quando descartadas causas patológicas. Esse parâmetro pode ser usado para avaliar a eficiência da alimentação dos animais (GONZÁLEZ et al, 2000).

Ridell et al. (2010) verificaram que bezerros suplementados durante 56 dias com probiótico contendo *Bacillus*, também apresentaram elevação nas concentrações séricas de proteínas totais a partir da 5ª semana de vida. Lima et al (2012) encontraram média da concentração de proteína total em bezerros alimentados com leite integral mais baixas do que comparadas ao do presente estudo, de 5,84 mg/dL em 6 semanas de experimento. Egli e Blum (1998) também encontraram valores médios entre 5,4 e 5,8 mg/dL em bezerros até 56 dias de idade. Mohri et al. (2006) encontraram valores variáveis entre 6 e 7 mg/dL, com valores mais próximos ao 7mg para animais até 24 horas de vida.

Figura 12 - Concentrações plasmáticas de proteína sérica total ao longo das semanas em bezerros suplementados ou não com probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo

A concentração sérica de albumina, assim como os outros parâmetros, não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos, e nem efeito com relação a idade ($P>0,05$).

A concentração de albumina no sangue pode variar de acordo com os valores proteicos contidos na ração, porém esse efeito é observado mais tardiamente no sangue. Uma vez que é sintetizada no fígado, seus valores dependem da capacidade de síntese. É a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, correspondendo a aproximadamente 50% das proteínas circulantes, participando de muitas reações no organismo (GONZÁLEZ et al, 2000).

A secreção de albumina é estimulada pela queda na pressão osmótica, mas também pode ser afetada por mudanças patofisiológicas como durante processos inflamatórios ou infecciosos quando há redução na secreção. Com o aumento da idade, a proteína plasmática aumenta como resultado de um pequeno decréscimo na albumina e progressivo aumento das globulinas (KANEKO et al., 2000).

Jezek et al. (2005) obteve resultados com tendências semelhantes ao presente estudo, com média em 8 semanas de 2,72 g/dL. Egli e Blum (1997) observaram queda nos valores de albumina do dia 0 para o dia 1 de vida dos bezerros, seguida de aumento e de concentrações que permaneceram estáveis até os 84 dias. A rápida queda das concentrações de albumina foi possivelmente o resultado da hemodiluição após a primeira refeição, e o aumento subsequente, deve-se provavelmente, a ingestão proteica.

Figura 13 - Concentrações plasmáticas de albumina ao longo das semanas em bezerros suplementados ou não com probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo

Os resultados reportados na literatura sobre o uso de probióticos para fins terapêuticos ou como promotor de crescimento em bezerros são heterogêneos, não consistentes e nem sempre positivos. A resposta do animal ao uso de probióticos é influenciada pelo tipo de produto, pela dose utilizada, idade e raça do animal, tipo de exploração e de manejo, uso concomitante de antibióticos e o ambiente de criação.

5 CONCLUSÃO

Nas condições de manejo nutricional e de instalações impostas durante o presente estudo, a suplementação com o probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (BioPlus) via sucedâneo não apresentou benefícios no desempenho ou no metabolismo de bezerros leiteiros, bem como não reduziu a ocorrência de casos de diarreia.

REFERÊNCIAS

ABE, F.; ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Effect of administration of Bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, p. 2838-2846, 1995.

ALEXOPOULOS, C.; GEORGOULAKIS, I.E.; TZIVARA, A.; KYRIAKIS C.S.; GOVARIS, A.; KYRIAKIS, S.C.; SIOCHU, A.; KYRIAKIS, S.C. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 88, p. 381–392, 2004.

BARRINGTON, G.M.; GAY, J.M.; EVERMANN, J.F. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, Pullman, v.18, p. 7-34, 2002.

BAILEY, T.; MURPHY, J.M. **Monitoring dairy heifer growth**. Blacksburg: Virginia Cooperative Extension; College of Veterinary Medicine, p. 1-4, 1999.

BAYATKOUHSAR, J.; TAHMASEBI, A.M.; NASERIAN, A.A.; MOKARRAM, R.R.; VALIZADEH, R. Effects of supplementation of latic acid bacteria on growth performance, blood metabolites and fecal coliform and lactobacilli of young dairy calves. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.186, p.1-11, 2013.

BENESI, F.J. Síndrome diarreia dos bezerros. **Revista CRMV-ES**, Vitória, v. 2, n. 3, p. 10-13, 1999.

BENESI, F.J.; COELHO, C.S.; LEAL, M.L.R. Parâmetros bioquímicos para avaliação da função renal e do equilíbrio hidroeletrolítico em bezerras sadias, da raça Holandesa, no primeiro mês de vida. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, p. 291-298, 2005.

BRANDAO, R.L.; CASTRO, I.M.; BAMBIRRA, E.A.; AMARAL, S.C.; FIETTO, L.G.; TROPIA, M.J.M. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.564-568, 1998.

BROWN, T. Calf management: birth to weaning. **Tarleton State University**, Stephenville, v. 10, p. 193-208, 1998.

CASEY, P.G.; GARDINER, G.E.; CASEY, G.; BRADSHAW, B.; LAWLOR, P.G.; LYNCH, P.B.; LEONARD, F.C.; STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; HILL, C. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 1858-1863, 2007.

CHAUCHEYRAS-DURAND F.; WALKER, N.D.; BACH, A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, p. 5-26, 2008.

CHASE, C.C.L.; HURLEY, D.J.; REBER, A.J. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, Pullman, v. 24, p. 87-104, 2008.

CHIOFALO, V.; LIOTTA, L.; CHIOFALO, B. Effects of the administration of lactobacilli on body growth and on the metabolic profile in growing Maltese goat kids. **Reproduction Nutrition Development**, Cambridge, v. 44, p. 449-457, 2004.

COELHO, S.G.; GONÇALVES, L.C.; COSTA, T.C.; FERREIRA, C.S. Alimentação de bezerras leiteiras. In: GONÇALVES, L.C; BORGES, I.; FERREIRA, P.D.S. **Alimentação de gado de leite**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2009. cap. 3, p. 50-67.

COLLADO, M.C.; GRZESKOWIAK, L.; SALMINEN, S. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. **Current Microbiology**, New York, v. 55, p. 260–265, 2007.

CORNAGLIA, E.M.; FERNANDEZ, F.M.; GOTTSCHALK, M.; BARRANDEGUY, M.E.; LUCHELLI, A.; PASINI, M.I.; SAIF, L.J.; PARRAUD, J.R.; ROMAT, A.; SCHUDEL, A.A. Reduction in morbidity due to diarrhea in nursing beef calves by use of an inactivated oil-adjuvanted rotavirus: *Escherichia coli* vaccine in the dam. **Veterinary Microbiology**, Champaign, v. 30, p. 191-202, 1992.

CORTESE, V.C. Neonatal immunology. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, Pullman, v. 25, p. 221-227, 2009.

CRUYWAGEN, C.W.; JORDAN, I.; VENTER, L. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation of milk replacer on pre weaning performance of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, p. 483-486, 1996.

CURTIS, C.R.; HOLLIS, N.E.; WHITE M.E.; M.E. Descriptive epidemiology of calfhood morbidity and mortality in New York Holstein herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 5, p. 293-307, 1988.

DAVIS, C.L.; DRACKLEY, J.K. **The development, nutrition, and management of the young calf**. Ames: Iowa State University Press, 1998. 339 p.

DELFINO, L.J.B.; SOUZA, B.B.; ROSANGELA, M.N.; SILVA, W.W. Efeito do estresse calórico sobre o eritrograma de ruminantes. **Agropecuária Científica do Semiárido**, Patos, v. 8, n. 2, p. 1-7, 2012.

DIZAJI, S.B.; PIRMOHAMMADI, R. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and BioPlus 2B on performance of laying hens. **International Journal of Agriculture and Biology**, New York, v. 11, p. 495-497, 2009.

DOREAU, M.; JOUANY, J.P. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 3214-3221, 1998.

EGLI, C.P.; BLUM, J.W. Clinical, haematological, metabolic and endocrine traits during the first three months of life of suckling simmentaler calves held in a cow-calf operation. **Journal of Veterinary Medicine**, New York, v. 45, p. 99-118, 1998.

ELLINGER, D.K.; MULLER, L.D.; GLANTZ, P.J. Influence of feeding fermented colostrum and *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, p. 478-482, 1980.

EWASCHUK, J.B.; ZELLO, G.M.; NAYLOR, J.M. Lactobacillus GG does not affect D-lactic acidosis in diarrheic calves in a clinical setting. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 20, p. 614-619, 2006.

FEITOSA, F.L.F.; PEIRÓ, J.R.; MENDES, L.C.N.; CADIOLI, F.A.; CAMARGO, D.G.; YANAKA, R.; BOVINO, F.; PERRI, S.H.V. Determinação do perfil bioquímico renal sérico de bezerros holandeses e mestiços, na região de Araçatuba/SP. **Ciência Animal Brasileira**, Belo Horizonte, supl. 1, p. 255-259, 2009. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8., 2009, Belo Horizonte. Anais...

FRIZZO, L.S.; ZBRUN, M.V.; SOTO, L.P.; SIGNORINI, M.L. Effect of probiotics on the growth performance in young calves: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 169, p. 147-156, 2011.

FRIZZO, L.S.; SOTTO, L.P.; ZBRUN, M.V.; BERTOZZI, E.; SEQUEIRA, G.; ARMESTO, R.R.; ROSMINI, M. R. Lactic acid bacteria to improve growth performance in young calves fed milk replacer and spray-dried whey powder. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 157, p. 159-167, 2010.

FROIS, M.C.M.; VIEGAS, D.M. Tendência histórica de coeficientes de mortalidade de bezerros em Minas Gerais, 1960 a 1985. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 46, p. 741-747, 1994.

FULLER, R. A review: probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 66, p. 365-378, 1989.

FULLER, R.; TANNOCK, G.W. **Probiotics for farm animals**. Wymondham: Horizon Scientific Press, 1999.

GARDINER, G.E.; CASEY, P.G.; CASEY, G.; BRENDAN LYNCH, P.; LAWLOR, P.G.; HILL, H.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C.; ROSS, R.P. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1895-1906, 2004.

GLYNN, M.K.; BOPP, C.; DEWITT, W.; DABNEY, P.; MOKHTAR, M.; ANGULO, F.J. Emergence of multidrug-resistant salmonella enteric serotype typhimurium DT104 infections in the United States. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 338, p. 1333-1338, 1998.

GOODGER, W.J.; THEODORE, E.M. Calf management practices and health management decisions on large dairies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 69, p. 580-590, 1986.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H.O.; RIBEIRO, L.A. (Ed.). **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: UFRGS. 2000. 106 p.

GUANDALINI S.; VAZIRI, H. **Diarrhea: diagnostic and therapeutic advances**. Washington: Humana Press, 2010. 499 p.

GUILLOT, J.F. Probiotic feed additives. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**, Berlin, v. 26, p. 52-55. 2003.

GREGORY, L.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; D'ANGELINO, F.J.; BENESI, F.J.; BIRGEL, E.H. Valores de referência dos teores séricos da ureia e creatinina em bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. Influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 339- 345, 2004.

GUO, X.; LI, D.F.; LU, W.Q.; PIAO, X.S.; CHEN, X.L. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 90, p. 139–146, 2006.

HART, B.L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, Champaign, v. 12, p. 123-137, 1988.

HEINRICHS, A.J.; JONES, C.M.; ELIZONDO-SALAZAR, J.A.; TERRILL, S.J. Effects of a prebiotic supplement on health of neonatal dairy calves. **Livestock Science**, Champaign, v. 125, p. 149–154, 2009.

HEYMAN, M.; MÉNARD, S. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 59, p. 1-15, 2002.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, p. 365–373, 2001.

HOFFMAN, P.C. Optimum body size of Holstein replacement heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, p. 836-845, 1997.

HUSBAND, A.J.; BRANDON, M.R.; LASCELLES, A.K. Absorption and endogenous production of immunoglobulins in calves. **The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, Adelaide, v. 50, p. 491-498, 1972.

ISOLAURI, E.; SÜTAS, Y.; KANKAANPÄÄ, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, p. 444S–450S, 2001.

JATKAUSKAS, J.; VROTNIAKIENE, V. Effects of probiotic dietary supplementation on diarrhea patterns, faecal microbiota and performance of early weaned calves. **Veterinari Medicina**, Prague, v. 55, p. 494-503, 2010.

JENNY, B.; VANDJK, F.; COLLINS, H.J. Performance and fecal flora of calves fed a *Bacillus subtilis* concentrate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 1968-1973, 1991.

JESEK, J.; KLOPICIC, M.; KLINKON, M. Influence of age on biochemical parameters in calves. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, Poloni, v. 50, p. 211-214, 2006.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2000. 916 p.

KAWAKAMI, S.I.; YAMADA, T.; NAKANISHI, N.; CAI, Y. Feeding lactic acid bacteria and yeast on growth and diarrhea of Holstein calves. **Journal of Animal Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 9, p. 1112-1114, 2010.

KIM, M.K.; LEE, H.G.; PARK, J.A.; KANG, S.K.; CHOI, Y.J. Effect of feeding direct-fed microbial as an alternative to antibiotics for the prophylaxis of calf diarrhea in Holstein calves. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, Seoul, v. 24, n. 5, p. 643-649, 2011.

KLEIN-JOBSTL, D.; IWERSEN, M.; DRILLICH, M. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: a case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 1-10, 2014.

KRITAS, S.K.; GOVARIS, A.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; BURRIEL, A.R. Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* supplementation of ewe's feed on sheep milk production and young lamb mortality. **Journal of Veterinary Medicine. Series A**, Tokyo, v. 53, p. 170-173, 2006.

KOWALSKI, Z.M.; GORKA, P.; SCLAGHECK, A.; JAGUSIAK, W.; MICEK, P.; STRZETELSKI, J. Performance of Holstein calves fed milk-replacer and starter mixture supplemented with probiotic feed additive. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Krakow, v. 18, p. 399-411, 2009.

KYRIAKIS, S.C.; TSILOYIANNIS, V.K.; VLEMMAS, J.; SARRIS, K.; TSINAS, A.C.; ALEXOPOULOS, C.; JANSEGGERS, L. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhea syndrome of piglets. **Research in Veterinary Science**, London, v. 67, p. 223–228, 1999.

KROGH, H.V. Occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves with acute neonatal diarrhea. **Nor Deland Veterinary Medicine**, Norrland, v. 35, p. 346-352, 1983.

KUSTOS, K.; KOVÁCS, D.; GODOR-SURMANN, K.; EIBEN, C. Effect of probiotic BioPlus 2B on performance of growing rabbit. In: 8th WORLDS RABBIT CONGRESS, **Proceedings**, Puebla, 2004. p. 874-879.

LARSON, L.L.; OWEN, F.G.; ALBRIGHT, L.L.; APLEMAN, R.D.; LAMB, R.C.; MULLER, L.D. Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 60, p. 989-991, 1977.

LEAL, M.L.R. Modelo de indução de diarreia osmótica em bezerros holandeses. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1650-1657, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782008000600024>. Acesso em: 28 jan. 2016.

LI, X.; YIN, J.; LI, D.; CHEN, X.J.; ZANG, J.J.; ZHOU, X. Dietary supplementation with zinc oxide increases igf-I and igf-I receptor gene expression in the small intestine of weanling piglets. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 136, p. 1786-1791, 2006.

LINK, R.; KOVAC, G. The effect of probiotic BioPlus 2B on feed efficiency and metabolic parameters in swine. **Cellular and Molecular Biology**, Bratislava, v. 61, p. 783-787, 2006.

LIONG, M.T. Probiotics: a critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemics and perimenopausal treatments. **Nutrition Reviews**, Oxford, v. 65, p. 316-328, 2007.

MACHADO NETO, R.; FARONI, C.E.; PAULETTI, P.; BESSI, R. Levantamento do manejo de bovinos leiteiros recém-nascidos: Desempenho e aquisição de proteção passiva. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 2323-2329. 2004.

MELIN L.; JENSEN, W.; JOHANNISSON, A.; EDEROTH, M.; KATOULI, M.; WALLGREN, P. Development of selected faecal microfloras and of phagocytic and killing capacity of neutrophils in young pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 54, p. 287–300, 1997.

MEYER, P.M.; PIRES, A.V.; BAGALDO, A.R.; SIMAS, J.M.C.; SUSIN, I. Adição de probiótico ao leite integral ou sucedâneo e desempenho de bezerros da raça holandesa. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 215-221, 2001.

MILLEMAN, Y. Diagnosis of neonatal calf diarrhea. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 160, p. 404-409, 2009.

MOHRI, M.; SHARIFI, K.; EIDI, S. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults. **Research in Veterinary Science**, London, v. 83, p. 30-39, 2007.

MOKHBER-DEZFOULI, M.R.; TAJIK, P.; BOLOURCHI, M.; MAHMOUDZADEH, H. Effects of probiotics supplementation in daily milk intake of newborn calves on body weight gain, body height, diarrhea occurrence and health condition. **Pakistan Journal of Biological Science**, Paquistán, v. 10, p. 3136–3140, 2007.

MOREIN, B.; ABUSUGRA, I.; BOMQVIST, G. Immunity in neonates. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 87, p. 207-213, 2002.

MORRILL, J.L.; MORRILL, J.M.; FEYERHERM, A.M.; LASTER, J.F. Plasma protein and a probiotic as ingredients in milk replacers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, p. 902-907, 1995.

MOUNTZOURIS, K.C.; TSIRTSIKOS, P.; KALAMARA, E.; NITSCH, S.; SCHATZMAYR, G.; FEGEROS, K. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating fecal microflora composition and metabolic activities. **Poultry Science**, Oxford, v. 86, p. 309-317, 2007.

MUSA, H.H.; WE, S.L.; ZHU, C.H.; SERI, H.I.; ZHU, G.Q. The potential benefits of probiotics in animal production and health. **Journal of Animal Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 8, p. 313-321, 2009.

NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM. **Reference of dairy cattle health and management practices in the United States**. Collins, 2007. pt. 1, 1007 p.

NURMI, I.E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, Cambridge, v. 241, p. 210-211, 1973.

QUEZADA-MENDOZA, V.C.; HEINRICHS, A.J.; JONES, C.M. The effects of a prebiotic supplement (Prebio Support) on fecal and salivary IgA in neonatal dairy calves. **Livestock Science**, Champaign, v. 142, p. 222-228, 2011.

QUIGLEY, J.D. III. Raising replacement heifers from birth to weaning. **Advances in Dairy Technology**, Ithaca, v. 9, p. 285–314, 1997.

QUIGLEY, J.D. III.; STROHBEHN, R.E.; KOST, C.J.; O'BRIEN, M.M. Formulation of colostrum supplements, colostrum replacers and acquisition of passive immunity in neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 2059–2065, 2001.

QUIGLEY, J.D. III.; MARTIN, K.R.; BEMIS, D.A.; POTGIETER, L.N.D.; REINEMEYER, C.R.; ROHRBACH, W.; DOWLEN, H.H.; LAMAR, K.C. Effects of housing and colostrum feeding on serum immunoglobulins, growth, and fecal scores of jersey calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, p. 893-901, 1995.

RADOSTITS, O.M.; LESLIE, K.E.; FETROW, J. **Food animal production medicine**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. v. 1, 631 p.

RAHIMI, S.; KHAKSEFIDI, A. A comparison between the effects of a probiotic (BioPlus 2B) and an antibiotic (virginiamycin) on the performance of broiler chickens under heat stress condition. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Iran, v. 7, n. 3, p. 23-28, 2006.

REBER, A.J.; LOCKWOOD, A.; HIPPEN, A.R.; HURLEY, D.J. Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 109, p. 139-150, 2006.

REY, M.W.; PREETHI, R.; NELSON, B.A.; BRODY-KARPIN, S.D.; ZARETSKY, E.J.; TANG, M.; LEON, A.L.; XIANG, H.; GUSTI, V.; CLAUSEN, I. G.; OLSEN, P.B.; RASMUSSEN, M.D.; BOLOTIN, A.; LAPIDUS, A.; GALLERON, N.; EHRLICH, S.D.; BERKA, R.M. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. **Genome Biology**, London, v. 5, n. 77, p. 1-12, 2004.

RIDELL, J.B.; GALLEGOS, A.J.; HARMON, D.L.; MCLEOD, K.R. Addition of a *Bacillus* based probiotic to the diet of pre ruminant calves: Influence on growth, health, and blood parameters. **The Journal Applied Research Veterinary Medicine**, Washington, v. 8, n. 1, p. 212-221, 2010.

ROSMINI, M.R., SEQUEIRA, G.J., GUERRERO-LEGARRETA, I., MARTÍ, L.E., DALLA-SANTINA, R., FRIZZO, L., BONAZZA, J.C., 2004. Probiotic production for meat animals: importance of using indigenous intestinal microbiota. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, Cidade do México, v. 3, p. 181–191, 2004.

ROY, J.H. Factors affecting susceptibility of calves to disease. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, p. 650-664, 1980.

ROY, J.H. **The calf: management of health**. 5th ed. Oxford: British Library Cataloguing in Publication Data, 1990. v. 1, 117 p.

SAMANYA, M.; YAMAUCHI, K. Histological alterations of intestinal villi in chicken fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 133, p. 95-104, 2002.

SAMLI, H.E.; SENKOYLU, N.; KOC, F.; KANTER, M.; AGMA, A. Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. **Archives of Animal Nutrition**, London, v. 61, p. 42–49, 2007.

SANTOS, G.; BITTAR, C.M.M. A survey of dairy calf management practices in some producing regions in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 44, p. 361-370, 2015.

SARA, A.; CIGHI, V.; ODAGIU, A.; SICHET, C. Research concerning the effect of the probiotic YEA-SACC- 1026 on productive performances in sheep. **Seria Zootehnie si Biotehнологii**, Romania, v. 57, p. 254-257, 2002

SCHAREK, L.; GUTH, J.; REITER, K.; WEYRAUCH, K.D.; TARAS, D.; SCHWERK, P.; SCHIERACK, P.; SCHMIDT, M.F.G.; WIELER, L.H.; TEDIN, K. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 105, p. 151-161, 2005.

SEO, J.K.; SEON-WOO, K.; KIM, M.H.; SANTI D, KAM, D.K.; JONG, K.H. Direct-fed microbials for ruminant animals. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v. 12, p. 1657-1667, 2010.

SISSONS, J.W. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhea and promote digestion in farm animals-a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 49, p. 1-13, 1989.

SMITH, H.W. Observations on the etiology of neonatal diarrhea (scours) in calves. **Journal of Pathology and Bacteriology**, Edinburgh, v. 84, p. 147-168, 1962.

STAMEY, J.A.; JANOVICK, N.A.; KERTZ, A.F.; DRACKLEY, J.K. Influence of starter protein content on growth of dairy calves in an enhanced early nutrition program. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, p. 3327-3336, 2012.

STOLTENOW, C.L. **Calf scours**: cause, prevention, treatment. Fargo: NDSU Extension Service, 2003. p. 776-779.

SUN, P.; WANG J. Q.; ZHANG H. T. Effects of *Bacillus subtilis natto* on performance and immune function of pre weaning calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign v. 93, p. 5851-5855, 2010.

TANNOCK, G.W.; SAVAGE, D.C. Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, Washington, v. 9, p. 591-598, 1974.

TELLEZ, G.; PETRONE, V.M.; ESCORCIA, M.; T.Y.MORISHITA, T.Y.; C.W. COBB, L. VILLASENOR AND B. PROMSOPONE. Evaluation of avian-specific probiotic and *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella heidelberg*-specific antibodies on cecal colonization and organ invasion of *Salmonella enteritidis* in broilers. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, p. 287-291, 2001.

TIMMERMAN, H.M.; KONING, C.J.M.; MULDER, L.; ROMBOUTS, F.M.; BEYNEN, A.C. Monostrain, multistain and multispecies probiotics: a comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, p. 219-233, 2004.

TIMMERMAN, H.M.; MULDER, L.; EVERTS, H.; VAN ESPEN, D.C.; VAN DER WAL, E.; KLAASSEN, G. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 2154–2165, 2005.

TIZARD, I. **Veterinary immunology**: an introduction. 8th ed. Philadelphia: Elsevier, 1992. 608 p.

TORRES-RODRIGUEZ, A.; DONOGHUE, A.M.; DONOGHUE, D.J.; J.T. BARTON, J.T.; TELLEZ, G.; HARGIS, B.M. Performance and condemnation rate analysis of commercial turkey flocks treated with a *Lactobacillus* sp.-based probiotic. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, p. 444-446, 2007.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, n. 7, p. 543-567, 1990.

VANDENBERGH, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 12, p. 221-238, 1993.

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

WANG, Y.; CHO, J.H.; CHEN, Y.J.; YOON, J.S.; HUANG, Y.; KIM, H.J.; KIM, I.H. The effect of probiotic BioPlus 2B on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs. **Livestock Science**, Champaign, v. 120, p. 35-42, 2009.

WATTIAUX, M.A. **Criação de novilhas**: do nascimento a desmama. Madison: University of Wisconsin, 1994.

WITTIWER, F. Marcadores bioquímicos no controle de problemas metabólicos nutricionais em gado de leite. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H.O.; RIBEIRO, L.A. (Ed.). **Perfil metabólico em ruminantes**: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: UFRGS, 2000. p. 48

WRIGHT, A.K.; GIGER, R.; ARNOLD, T.M.; JANZEN, E.D. An episode of diarrhea in calves of a well-managed dairy herd. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 36, p. 36–38, 1995.

YANAGISAWA, Y.; SUMI, H. Natto Bacillus contains a large amount of water-soluble vitamin K (Menaquinone-7). **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 29, p. 267-277, 2005.

YOUANES, Y.D.; HERDT, T.H. Changes in small intestinal morphology and flora associated with decreased energy digestibility in calves with naturally occurring diarrhea. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 48, p. 719–725, 1987.

YOON, I.K.; STERN, M.D. Influence of direct-fed microbial on ruminant microbial fermentation and performance of ruminants: a review. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, Seoul, v. 8, p. 533-555, 1995.