

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA DE VACAS DA
RAÇA HOLANDESA IMUNIZADAS E NÃO IMUNIZADAS
CONTRA ROTAVÍRUS PARA SEUS BEZERROS**

**Thaís Gomes Rocha
Médica Veterinária**

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA DE VACAS DA
RAÇA HOLANDESA IMUNIZADAS E NÃO IMUNIZADAS
CONTRA ROTAVÍRUS PARA SEUS BEZERROS**

Thaís Gomes Rocha

Orientador: Prof. Dr. José Jurandir Fagliari

Coorientadores: Profa. Dra. Maria da Glória Buzinaro

Dr. Luiz Francisco Zafalon

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária (Clínica Médica Veterinária)**

2013

R672t Rocha, Thaís Gomes
Transferência de imunidade passiva de vacas da raça Holandesa
imunizadas e não imunizadas contra rotavírus para seus bezerros /
Thaís Gomes Rocha. -- Jaboticabal, 2013
xxiii, 146 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: José Jurandir Fagliari

Banca examinadora: Viviani Gomes, Raimundo Souza Lopes,
Annelise Carla Camplesi dos Santos, Luis Guilherme de Oliveira
Bibliografia

1. Diarreia. 2. Resposta imune passiva. 3. Vacinação. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.47:636.23

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA IMUNIZADAS E NÃO IMUNIZADAS CONTRA ROTAVÍRUS PARA SEUS BEZERROS

AUTORA: THAÍS GOMES ROCHA

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE JURANDIR FAGLIARI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ FRANCISCO ZAFALON

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA DA GLORIA BUZINARO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOSE JURANDIR FAGLIARI

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. ANNELEISE CARLA CAMPRESI DOS SANTOS

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. VIVIANI GOMES

Universidade de São Paulo / São Paulo/SP


Prof. Dr. RAIMUNDO SOUZA LOPES

Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Data da realização: 17 de dezembro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

THAÍS GOMES ROCHA – nascida em 17 de outubro de 1981 na cidade do Rio de Janeiro – RJ, filha de Marly Gomes Rocha e Rui Lavoura Rocha, enteada de Alberto Cordovil de Macedo (*in memoriam*) e Teresa Isabel Pereira da Costa. Foi bolsista do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq – UFRRJ) no ano de 2004, e graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – RJ no ano de 2005. Participou do Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica de Grandes Animais no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - Universidade Estadual Paulista - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, no período de 01 de fevereiro de 2006 a 31 de janeiro de 2008 sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Carlos Marques. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Mestrado), Área de concentração Clínica Médica Veterinária, em março de 2008, sob a orientação do Prof. Dr. José Jurandir Fagliari e coorientação do Prof. Dr. Alexandre Amstalden Moraes Sampaio, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - Câmpus de Jaboticabal, sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo número 2007/57783-6) e defendendo dissertação intitulada “*Transferência de imunidade passiva em bezerros de vacas da raça Canchim*”. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Doutorado), Área de concentração Clínica Médica Veterinária, em março de 2010, sob a orientação do Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, e coorientação da Profa. Dra. Maria da Glória Buzinaro e do Dr. Luiz Francisco Zafalon, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - Câmpus de Jaboticabal, sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo número 2010/10677-0).

Epígrafe

OS FILHOS

“Vossos filhos não são vossos filhos.

São os filhos e as filhas da ânsia da vida por si mesma.

Vêm através de vós mas não de vós.

E embora vivam convosco, não vos pertencem.

Podeis outorgar-lhes vosso amor, mas não vossos pensamentos,

Porque eles têm seus próprios pensamentos.

Podeis abrigar seus corpos, mas não suas almas;

Pois suas almas moram na mansão do amanhã, que vós não podeis visitar nem mesmo em sonho.

Podeis esforçar-vos por se como eles, mas não procureis fazê-los como vós;

Porque a vida não anda para trás e não se demora com os dias passados.

Vós sois os arcos dos quais vossos filhos são arremessados como flechas vivas.

O Arqueiro mira o alvo na senda do infinito e vos estica com toda a sua força para que suas flechas se projetem, rápidas e para longe.

Que vosso encurvamento na mão do Arqueiro seja vossa alegria;

Pois assim como Ele ama a flecha que voa, também ama o arco que permanece estável.”

O TRABALHO

“Disseram-vos que a vida é escuridão; e no vosso cansaço, repetis o que os cansados vos disseram.

E eu vos digo que a vida é realmente escuridão, exceto quando há um impulso.

E todo impulso é cego, exceto quando há saber.

E todo saber é vão, exceto quando há trabalho.

E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor.

E quando trabalhais com amor, vós vos unis a vós próprios e uns aos outros, e a Deus.”

O Profeta
Gibran Khalil Gibran

Dedicatória

A meus pais, Rui e Marly, e à minha madrasta tia Teresa, pelo apoio, interesse e pelo constante incentivo na busca dos meus objetivos pessoais e profissionais.

Ao meu padrasto Beto (*in memoriam*), por tantos ensinamentos e tanto amor dedicados por todos esses anos, você preencheu nossas vidas e, com sua sabedoria, fez de mim uma pessoa muito melhor. Te amo para sempre, meu xodó.

A meu marido Leonardo, pela cumplicidade, amor e estímulo, pelo colo nas horas de cansaço extremo, pelas dicas de “expert” no Excel, enfim, por toda a colaboração, direta e indireta para a realização de mais esse projeto. Estar com você torna todas as coisas sempre muito melhores.

Ao nosso filho Henrique, mal posso esperar para conhecê-lo! Você é muito amado, e me deu forças para enfrentar muitos desafios e a priorizar aquilo que realmente importa. Obrigada por fazer de nós pessoas melhores!

À minhas irmãs, Geiza e Débora, pelo amor incondicional.

Às amigas, Fê, Lu, Lá e Cá, que mesmo à distância, estão sempre próximas.

À minha amiga Fernanda Dornelas, por sacrificar seus momentos de descanso para me ajudar, por conseguir tempo mesmo quando parecia impossível para “quebrar aquele galho” e por sempre ter um sorriso no rosto.

Ao amigo Ketherson, pelo tempo e disposição dedicados a esse projeto.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, por sua serenidade, dedicação e compreensão, pelo voto de confiança e pelos ensinamentos de valor inestimável em todas as etapas do experimento.

À Prof^a. Dr^a. Maria da Glória Buzinaro, pela coorientação e pelas sugestões para a melhoria do projeto.

Ao Dr. Luiz Francisco Zafalon, pela colaboração e coorientação.

Ao Prof. Dr. Hélio José Montassier, pelas sugestões e orientação de grande valor para a realização de parte das análises desse projeto.

Ao Prof. Dr. Fábio Gregori pela contribuição nas análises de PCR.

Ao Prof. Dr. Amauri Alfieri pela disponibilização das amostras de rotavírus para o ensaio imunoenzimático.

Ao prof. Dr. José Carlos Barbosa, pela ajuda na realização e interpretação das análises estatísticas.

Aos membros da banca do Exame Geral de Qualificação Prof^a. Dr^a. Annelise Carla Camplesi dos Santos, Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira, Prof. Dr. Luiz Carlos Marques e Dr^a. Daniela Gomes da Silva pelas sugestões no Exame Geral de Qualificação.

Aos membros da banca de Defesa de Tese, Prof^a. Dr^a. Annelise Carla Camplesi dos Santos, Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira, Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes e Prof^a. Dr^a. Viviani Gomes, pelas contribuições de valor inestimável ao nosso trabalho.

À Fazenda Agrindus e ao Sistema de Leite do Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste, por permitirem a coleta de amostras para a realização desse projeto.

Aos funcionários da Fazenda Agrindus, em especial Tonho e Tina, pela colaboração, pelos momentos agradáveis de convivência e pela disposição em ajudar nas coletas.

Aos funcionários do Sistema de Leite do CPPSE, São Carlos, em especial Didoné e Juarez, pela ajuda e pela dedicação na colaboração para a coleta de amostras.

Aos médicos veterinários Péricles Ricardo Lacerda e Silva e Raul Mascarenhas Santana pela ajuda prestada.

Aos alunos de iniciação científica, Camila Bortoletto e Rodolfo Amorim Leão dos Santos, pelo apoio e dedicação à realização da segunda etapa desta pesquisa.

Aos funcionários do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Unesp, Renata, Cláudia e Paulo pelo apoio, amizade, carinho e pela ajuda na realização dos exames laboratoriais e eletroforese necessários para a concretização desta pesquisa.

À Lurdinha, pela ajuda e incentivo.

À FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade de ingressar nos programas de aprimoramento e pós-graduação.

À FAPESP, pela concessão de recursos financeiros (bolsa de estudos Processo número 2010/10677-0 e auxílio Processo número 2011/02414-1) para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xx
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 Considerações gerais.....	1
1.2 Epidemiologia do rotavírus bovino	2
1.3 Patogenia e achados clínicos na infecção por rotavírus bovino.....	5
1.4 Diagnóstico laboratorial de rotavirose	5
1.5 Imunidade passiva e proteção contra a infecção por rotavírus	6
1.6 Exames laboratoriais em animais jovens	8
1.7 Hipótese e Justificativa.....	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivos Gerais.....	11
2.2 Objetivos Específicos	11
2.2.1 Experimento 1	11
2.2.2 Experimento 2	11
2.2.3 Experimento 3	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Rebanhos.....	13
3.2 Animais	13
3.3 Grupos experimentais	15
3.3.1 Experimento 1	15
3.3.2 Experimento 2	15
3.3.3 Experimento 3	16
3.4 Coleta e preparação das amostras.....	16
3.4.1 Amostras obtidas das vacas	16

3.4.2 Amostras obtidas dos bezerros	17
3.5 Análises laboratoriais	18
3.5.1 Parâmetros bioquímicos do soro sanguíneo e da secreção láctea	18
3.5.2 Leucograma	20
3.5.3 Ensaio imunoenzimático indireto (EIE indireto) para a quantificação dos títulos de imunoglobulinas anti-rotavírus	20
3.5.4 Análise da presença de rotavírus nas fezes por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	23
3.5.5 Genotipagem das amostras positivas para rotavírus	25
3.6 Análise Estatística	26
4 RESULTADOS	28
4.1 Experimento 1	28
4.1.1 Avaliação do soro sanguíneo das vacas	28
4.1.1.1 Proteína total	28
4.1.1.2 Globulinas	29
4.1.1.3 Imunoglobulina A (IgA) pela técnica de SDS-PAGE	29
4.1.1.4 Ceruloplasmina pela técnica de SDS-PAGE	30
4.1.1.5 Transferrina pela técnica de SDS-PAGE	32
4.1.1.6 Imunoglobulina G (IgG) pela técnica de SDS-PAGE	33
4.1.1.7 Haptoglobina pela técnica de SDS-PAGE	34
4.1.1.8 α_1 -glicoproteína ácida pela técnica de SDS-PAGE	34
4.1.1.9 Avaliação dos títulos de imunoglobulina G total anti-rotavírus pela técnica de EIE indireto	35
4.1.2 Avaliação do soro lácteo	36
4.1.2.1 Gamaglutamiltransferase	36
4.1.2.2 Proteína total	37
4.1.2.3 Imunoglobulina A (IgA) pela técnica de SDS-PAGE	37
4.1.2.4 Imunoglobulina G (IgG) pela técnica de SDS-PAGE	38
4.1.2.5 Avaliação dos títulos de imunoglobulina G total anti-rotavírus pela técnica de EIE indireto	38
4.2 Experimento 2	39
4.2.1 Idade de manifestação de diarreia	39

4.2.2 Leucograma	40
4.2.2.1 Contagem de leucócitos	40
4.2.2.2 Neutrófilos bastonetes	41
4.2.2.3 Neutrófilos segmentados	41
4.2.2.4 Linfócitos	42
4.2.2.5 Monócitos	43
4.2.2.6 Eosinófilos	44
4.2.2.7 Basófilos	44
4.2.3 Análises Bioquímicas	44
4.2.3.1 Gamaglutamiltransferase	44
4.2.3.2 Proteína total	46
4.2.3.3 Globulinas	47
4.2.3.4 Cálcio ionizado	48
4.2.3.5 Cloretos	50
4.2.3.6 Sódio	50
4.2.3.7 Potássio	50
4.2.3.8 Concentração sérica de ureia e creatinina	50
4.2.3.9 Imunoglobulina A (IgA) pela técnica de SDS-PAGE	50
4.2.3.10 Ceruloplasmina pela técnica de SDS-PAGE	51
4.2.3.11 Transferrina pela técnica de SDS-PAGE	53
4.2.3.12 Imunoglobulina G (IgG) pela técnica de SDS-PAGE	54
4.2.3.13 Haptoglobina pela técnica de SDS-PAGE	55
4.2.3.14 α_1 -glicoproteína ácida pela técnica de SDS-PAGE	56
4.2.4 Títulos de imunoglobulina G total anti-rotavírus pela técnica de EIE indireto	58
4.2.5 Avaliação das fezes dos bezerros	59
4.2.5.1 Escore	59
4.2.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de rotavírus nas fezes	60
4.2.5.3 Reação em cadeia da polimerase precedida de retro-transcrição (RT-PCR) e genotipagem para determinação da estirpe de rotavírus circulante	61

4.3 Experimento 3	62
4.3.1 Idade de manifestação de diarreia	63
4.3.2 Leucograma	63
4.3.2.1 Contagem de leucócitos	63
4.3.2.2 Neutrófilos bastonetes	64
4.3.2.3 Neutrófilos segmentados	64
4.3.2.4 Linfócitos	65
4.3.2.5 Monócitos	66
4.3.2.6 Eosinófilos	67
4.3.2.7 Basófilos	67
4.3.3 Análises Bioquímicas	68
4.3.3.1 Gamaglutamiltransferase	68
4.3.3.2 Proteína total	70
4.3.3.3 Globulinas	71
4.3.3.4 Cálcio ionizado	73
4.3.3.5 Cloretos	73
4.3.3.6 Sódio	75
4.3.3.7 Potássio	75
4.3.3.8 Concentração sérica de ureia e creatinina	77
4.3.3.9 Imunoglobulina A (IgA) pela técnica de SDS-PAGE	78
4.3.3.10 Ceruloplasmina pela técnica de SDS-PAGE	80
4.3.3.11 Transferrina pela técnica de SDS-PAGE	82
4.3.3.12 Imunoglobulina G (IgG) pela técnica de SDS-PAGE	83
4.3.3.13 Haptoglobina pela técnica de SDS-PAGE	85
4.3.3.14 α_1 -glicoproteína ácida pela técnica de SDS-PAGE	86
4.3.4 Títulos de imunoglobulina G total anti-rotavírus pela técnica de EIE indireto	87
4.3.5 Avaliação das fezes dos bezerros	88
4.3.5.1 Escore	88
4.3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de rotavírus nas fezes	90
4.3.5.3 Reação em cadeia da polimerase precedida de retro-transcri-	

ção (RT-PCR) e genotipagem para determinação da estirpe de rotavírus circulante	90
5 DISCUSSÃO	91
6 CONCLUSÕES	115
7 REFERÊNCIAS	117
8 IMPLICAÇÕES	132
APÊNDICES	134
Apêndice A	135
Apêndice B	137
Apêndice C	143
Apêndice D	145

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

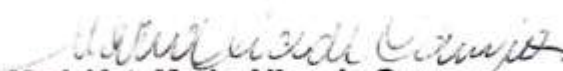
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 015110/10 do trabalho de pesquisa intitulado **"Transferência de imunidade passiva de vacas da raça Holandesa imunizadas e não imunizadas contra rotavírus: parâmetros hematológicos, imunoglobulinas, proteínas de fase aguda, e resposta imune humoral sérica e de mucosa de bezerras"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 20 de Julho de 2010.

Jaboticabal, 20 de julho de 2010.



Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
 Presidente - CEBEA



Med. Vet. Maria Alice de Campos
 Secretária - CEBEA

TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA IMUNIZADAS E NÃO IMUNIZADAS CONTRA ROTAVÍRUS PARA SEUS BEZERROS

RESUMO - O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta imune humoral de vacas primíparas e pluríparas imunizadas ou não contra rotavírus com vacina comercial inativada e a transferência dessa imunidade para seus bezerros. Para tal, ensaio imunoenzimático indireto (EIE indireto) foi utilizado, sendo constituídos dois grupos e quatro subgrupos experimentais: grupo V1: 24 vacas imunizadas contra rotavírus bovino (BRV), com dois subgrupos - V1n (12 vacas primíparas) e V1v (12 vacas pluríparas) e grupo V2: 24 vacas não imunizadas contra BRV, com dois subgrupos - V2n (12 vacas primíparas) e V2v (12 vacas pluríparas). Os bezerros também foram alocados em grupos e subgrupos, de acordo com a distribuição de suas mães para a avaliação da imunidade humoral sérica, da cinética de parâmetros hematológicos, bioquímicos e da excreção de rotavírus nas fezes nos trinta primeiros dias de vida. Os bezerros foram ainda realocados, de acordo com a ocorrência de diarreia no primeiro mês de vida, sendo constituídos os grupos A (sem diarreia), B (diarreia, negativos para a detecção de rotavírus) e C (diarreia, positivos para rotavírus). Os dados foram submetidos à análise de variância, e o teste de Tukey e o teste de correlação de Pearson foram empregados, considerando-se as diferenças significativas quando $P < 0,05$. Nas vacas dos grupos V1 e V2, não foi verificada influência do número de parições sobre os parâmetros séricos analisados, enquanto que na análise do colostro, verificou-se maiores teores de IgA e IgG em vacas do subgrupo V1v. A imunização pré-parto aumentou significativamente os títulos séricos de IgG anti-BRV, sendo os maiores títulos verificados também nos animais do subgrupo V1v. Os bezerros que receberam colostro dessas vacas (grupo B1) também apresentaram maiores títulos de IgG anti-BRV, quando comparados ao grupo B2, no entanto, a vacinação da vaca e a transferência de imunidade passiva aos bezerros não impediram a ocorrência de infecção por esse vírus. Nos bezerros, verificou-se ainda maior média de idade de manifestação de diarreia nos animais do grupo B1, bem como maiores teores séricos de proteína total, globulinas, IgA e IgG nos animais do subgrupo B1v. 6,97% das 330 amostras de fezes coletadas apresentavam-se diarreicas, com maior percentual de ocorrência de diarreia nos bezerros do subgrupo B2n. Os genótipos de rotavírus detectados foram G6P[11] no grupo B1 e G6P[5] no grupo B2, genótipos diferentes dos presentes na vacina comercial. Avaliando-se os momentos de manifestação de diarreia, verificou-se menores teores de globulinas e IgG e maiores concentrações de ceruloplasmina no grupo C, quando comparado ao grupo B, no entanto, não foi constatada diferença quanto aos títulos de IgG anti-rotavírus entre os grupos A, B e C. Esses resultados mostram que a imunização passiva não protegeu os bezerros, uma vez que foi constatado um maior número de casos de diarreia nos bezerros do grupo vacinado e que, de fato, o número de parições da vaca interfere na proteção conferida aos bezerros.

Palavras-chave: diarreia, resposta imune passiva, vacinação, imunoglobulinas, proteínas de fase aguda, rotavirose

PASSIVE IMMUNITY TRANSFER FROM HOLSTEIN COWS, IMMUNIZED OR NOT IMMUNIZED AGAINST ROTAVIRUS TO ITS CALVES

ABSTRACT – The aim of this study was to evaluate the humoral immune response of primiparous and multiparous cows immunized with an inactivated commercial vaccine against rotavirus, as well as the passive immunity transfer to its calves through indirect enzymatic immunoassay (EIE); thus, two groups and four subgroups were formed: Group V1: 24 cows immunized with a commercial inactivated vaccine against BRV, comprising two subgroups - V1n (12 first gestation cows) and V1v (12 second or later gestation cows) and Group V2: 24 cows not immunized against BRV, comprising two subgroups - V2n (12 first gestation cows) and V2v (12 second or later gestation cows). The calves were also allotted into groups and subgroups according to its mother's distribution, in order to evaluate humoral immune response in serum, the kinetics of hematological and biochemical parameters, the acute phase proteins response, and rotavirus excretion in feces throughout the first 30 days of life. The same calves were also redistributed into groups according to the occurrence of diarrhea in the first month of life as Group A (no diarrhea), group B (diarrhea, but negative to rotavirus detection) and group C (diarrhea, positive to rotavirus detection). Data were submitted to variance analysis and Tukey's test was performed in order to compare mean values of parameters and establish differences between groups; differences were considered significant when $P < 0,05$. Pearson's correlation test was also performed in some of the studied parameters, and was considered significant when $P < 0,05$. In group V1 and V2 cows, there was no influence of lactation number in the serum parameters analyzed, whilst in the colostrum whey, higher levels of IgA and IgG were noted in V1v cows when compared to the other Subgroups. Prepartum immunization of cows with a commercial vaccine against rotavirus effectively raised titers of specific IgG against rotavirus in its blood serum, with higher titers in Subgroup V1v when compared to the other Subgroups. Calves that received colostrum from these cows (Group B1) also presented higher titers of specific IgG against rotavirus, when compared to Group B2, even though the vaccination of cows and passive immunity transfer to the calves did not prevent the occurrence of BRV infection. Group B1 calves also presented diarrhea at an older age, as well as higher levels of total protein, globulins, IgA and IgG in B1v calves, when compared to the other Subgroups. 6,97% of the 330 fecal samples taken were diarrheic, and Subgroup B2n calves presented the higher percentage of diarrhea occurrence. Rotavirus genotypes detected were G6P[11] in Group B1 and G6P[5] in Group B2. The evaluation of the diarrhea manifestation period showed lower levels of globulins and IgG and higher levels of ceruloplasmin in Group C when compared to Group B, but specific IgG titers against BRV were not different among groups A, B, and C. These results demonstrate that passive immunity did not effectively protect calves against rotavirus diarrhea, as a higher incidence of cases was found in the vaccinated group, and that in fact, the number of parturitions of cows influences the protection of its calves.

Keywords: diarrhea, passive immunity response, vaccination, immunoglobulins, acute phase proteins, rotavirus infection

LISTA DE ABREVIATURAS

A/P – valor amostra/positivo
A – adenina
C – citosina
G – guanina
T – timina
BRV - rotavírus bovino
cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar
DO – densidade óptica
dsRNA – *double strand ribonucleic acid* (ácido ribonucleico de fita dupla)
EIE – ensaio imunoenzimático
FTIP – falha na transferência de imunidade passiva
GGT - gamaglutamiltransferase
IgA – imunoglobulina A
IgG – imunoglobulina G
IgG1 – imunoglobulina G1
IgG2 – imunoglobulina G2
IgM – imunoglobulina M
NRC – *Nutritional requirements council*
NSP – *non-structural protein* (proteína não estrutural)
PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR – reação em cadeia da polimerase
PFAs – proteínas de fase aguda
p/v – peso/volume
q.s.p. – quantidade suficiente para
RNA – ácido ribonucleico
TIP – transferência de imunidade passiva
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio
VP – *viral protein* (proteína viral)

LISTA DE TABELAS

	Página
<p>Tabela 1. Média e desvio-padrão da concentração sérica de proteína total (g/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupo V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).....</p>	28
<p>Tabela 2. Média e desvio-padrão da concentração sérica de globulinas (g/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupo V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).....</p>	29
<p>Tabela 3. Média e desvio-padrão da concentração sérica de imunoglobulina A (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupo V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).....</p>	30
<p>Tabela 4. Média e desvio-padrão da concentração sérica de ceruloplasmina (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupo V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).....</p>	31
<p>Tabela 5. Média e desvio-padrão da concentração sérica de transferrina (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupo V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).....</p>	32
<p>Tabela 6. Média e desvio-padrão da concentração sérica de imunoglobulina G (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupo V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).....</p>	33
<p>Tabela 7. Média e desvio-padrão da concentração sérica de haptoglobina (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupo V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).....</p>	34

- Tabela 8.** Média e desvio-padrão da concentração sérica de α_1 -glicoproteína ácida (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupo V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0)..... 34
- Tabela 9.** Média e desvio-padrão dos títulos séricos de imunoglobulina G específica anti-rotavírus de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupo V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0)..... 35
- Tabela 10.** Média e desvio-padrão da atividade de gamaglutamiltransferase (U/L) no soro lácteo de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v) imediatamente após o parto (0) e com um dia de lactação..... 36
- Tabela 11.** Média e desvio-padrão da concentração de proteína total (g/dL) no soro lácteo de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v) imediatamente após o parto (0) e com um dia de lactação..... 37
- Tabela 12.** Média e desvio-padrão da concentração de imunoglobulina A (mg/dL) no soro lácteo de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v) imediatamente após o parto (0) e com um dia de lactação..... 37
- Tabela 13.** Média e desvio-padrão da concentração de imunoglobulina G (mg/dL) no soro lácteo de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v) imediatamente após o parto (0) e com um dia de lactação..... 38
- Tabela 14.** Média e desvio-padrão dos títulos de imunoglobulina G no soro lácteo de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v) imediatamente após o parto (0) e com um dia de lactação..... 39

Tabela 15. Média e desvio-padrão da contagem de leucócitos (μL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	40
Tabela 16. Média e desvio-padrão da contagem de neutrófilos segmentados (μL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	42
Tabela 17. Média e desvio-padrão da contagem de linfócitos (μL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	43
Tabela 18. Média e desvio-padrão da atividade de gamaglutamiltransferase sérica (U/L) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	45
Tabela 19. Média e desvio-padrão da concentração sérica de proteína total (g/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	46
Tabela 20. Média e desvio-padrão da concentração sérica de globulinas (g/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	47
Tabela 21. Média e desvio-padrão da concentração sérica de cálcio ionizado (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	49

Tabela 22. Média e desvio-padrão da concentração sérica de imunoglobulina A (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	51
Tabela 23. Média e desvio-padrão da concentração sérica de ceruloplasmina (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	52
Tabela 24. Média e desvio-padrão da concentração sérica de transferrina (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	53
Tabela 25. Média e desvio-padrão da concentração sérica de imunoglobulina G (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	54
Tabela 26. Média e desvio-padrão da concentração sérica de haptoglobina (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	56
Tabela 27. Média e desvio-padrão da concentração sérica de α_1 -glicoproteína ácida (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	57
Tabela 28. Média e desvio-padrão dos títulos séricos de imunoglobulina G específica anti-rotavírus de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.....	58

- Tabela 29.** Características das fezes e percentual de amostras normais e diarreicas coletadas de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), do nascimento aos 30 dias de idade..... 60
- Tabela 30.** Resultado da análise da reação em cadeia da polimerase precedida por retrotranscrição (RT-PCR) e do sequenciamento nas fezes positivas para rotavírus pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 61
- Tabela 31A.** Média e desvio-padrão da contagem de leucócitos (μL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C)..... 63
- Tabela 31B.** Média ajustada por mínimos quadrados da contagem de leucócitos (μL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia..... 64
- Tabela 32.** Média e desvio-padrão da contagem de neutrófilos segmentados (μL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C)..... 65
- Tabela 33A.** Média e desvio-padrão da contagem de linfócitos (μL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C)..... 66

Tabela 33B. Média ajustada por mínimos quadrados da contagem de linfócitos (μL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.....	66
Tabela 34A. Média e desvio-padrão da atividade sérica de gamaglutamiltransferase (U/L) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).....	68
Tabela 34B. Média ajustada por mínimos quadrados da atividade de gamaglutamiltransferase (U/L) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.....	69
Tabela 35A. Média e desvio-padrão da concentração sérica de proteína total (g/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).....	70
Tabela 35B. Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de proteína total (g/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.....	71
Tabela 36A. Média e desvio-padrão da concentração sérica de globulinas (g/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).....	72
Tabela 36B. Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de globulinas (g/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.....	72

- Tabela 37A.** Média e desvio-padrão da concentração sérica de cloretos (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C)..... 74
- Tabela 37B.** Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de cloretos (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia..... 74
- Tabela 38.** Média e desvio-padrão da concentração sérica de sódio (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C)..... 75
- Tabela 39A.** Média e desvio-padrão da concentração sérica de potássio (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C)..... 76
- Tabela 39B.** Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de potássio (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia..... 76
- Tabela 40.** Média e desvio-padrão da concentração sérica de ureia (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C)..... 77

Tabela 41. Média e desvio-padrão da concentração sérica de creatinina (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).....	78
Tabela 42. Média e desvio-padrão da concentração sérica de imunoglobulina A (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).....	79
Tabela 43A. Média da concentração sérica de ceruloplasmina (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).....	80
Tabela 43B. Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de ceruloplasmina (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.....	81
Tabela 44A. Média da concentração sérica de transferrina (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).....	82
Tabela 44B. Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de transferrina (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.....	83

Tabela 45A. Média da concentração sérica de imunoglobulina G (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).....	84
Tabela 45B. Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de imunoglobulina G (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.....	85
Tabela 46. Média da concentração sérica de haptoglobina (mg/dL) dos bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).....	86
Tabela 47. Média da concentração sérica de α_1 -glicoproteína ácida (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).....	87
Tabela 48. Média e desvio-padrão dos títulos séricos de imunoglobulina G anti-rotavírus (valor A/P) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).....	88
Tabela 49A. Características das fezes e percentual de amostras diarreicas e normais coletadas de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).....	89

Tabela 49B. Características das fezes e percentual de amostras normais e diarreicas coletadas de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C)..... 90

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do rotavírus nas fezes. Padrão (P) e amostras positivas (+), nas quais é possível observar os segmentos de RNA do vírus (identificados de 1 a 11), e amostras negativas (-).....	25
Figura 2. Teor sérico de proteína total (g/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).....	29
Figura 3. Teor sérico de imunoglobulina A (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).....	30
Figura 4. Teor sérico de ceruloplasmina (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).....	31
Figura 5. Teor sérico de transferrina (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).....	32
Figura 6. Teor sérico de imunoglobulina G (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).....	33
Figura 7. Títulos séricos de imunoglobulina G específica anti-rotavírus de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).....	36

- Figura 8.** Contagem de leucócitos ($X10^3/\mu\text{L}$) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 41
- Figura 9.** Contagem de neutrófilos segmentados ($/\mu\text{L}$) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 42
- Figura 10.** Contagem de linfócitos ($/\mu\text{L}$) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 43
- Figura 11.** Atividade sérica de gamaglutamiltransferase (U/L) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 45
- Figura 12.** Teor sérico de proteína total (g/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 47
- Figura 13.** Teor sérico de globulinas (g/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 48
- Figura 14.** Teor sérico de cálcio ionizado (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 49
- Figura 15.** Teor sérico de imunoglobulina A (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 51

- Figura 16.** Teor sérico de ceruloplasmina (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 52
- Figura 17.** Teor sérico de transferrina (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 53
- Figura 18.** Teor sérico de imunoglobulina G (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 55
- Figura 19.** Teor sérico de haptoglobina (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 56
- Figura 20.** Teor sérico de α_1 -glicoproteína ácida (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 57
- Figura 21.** Títulos séricos de imunoglobulina G específica anti-rotavírus de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento..... 59
- Figura 22.** Atividade sérica de gamaglutamiltransferase (U/L) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C)..... 69

- Figura 23.** Teor sérico de globulinas (g/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia..... 73
- Figura 24.** Teor sérico de imunoglobulina A (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C)..... 79
- Figura 25A.** Teor sérico de ceruloplasmina (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C)..... 81
- Figura 25B.** Teor sérico de ceruloplasmina (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia..... 82
- Figura 26A.** Teor sérico de imunoglobulina G (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C)..... 84
- Figura 26B.** Teor sérico de imunoglobulina G (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia..... 85

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Considerações gerais

A diarreia neonatal bovina é considerada uma das doenças mais importantes de bezerros por ser a principal causa de morbidade e mortalidade em animais jovens e resultar em perdas econômicas em razão dos custos com o tratamento e a profilaxia, aumento na susceptibilidade a outras infecções, retardo no desenvolvimento e morte de animais (RADOSTITS et al., 2007).

Essa enfermidade cosmopolita tem caráter multifatorial e pode ser causada por vários patógenos, como rotavírus bovino (BRV), coronavírus, *Escherichia coli* K99 (*E. coli*) e *Cryptosporidium parvum*. García et al. (2000) relataram que esses microrganismos foram detectados em 75 a 95% dos casos de infecções intestinais em bezerros com menos de um mês de idade, e verificaram estreita associação entre a presença de um desses agentes intestinais e a ocorrência de diarreia. Dentre as etiologias virais merece destaque o rotavírus bovino, cuja prevalência estimada em estudos que avaliaram a presença simultânea de diversos enteropatógenos na mesma propriedade foi 20% na Bélgica, 25,1% no Brasil e 59% na Suíça (DE GRAAF et al., 1999; LANGONI et al., 2004; UHUDE et al., 2008).

O BRV tem maior importância epidemiológica em animais com 2 a 8 semanas de idade, antes do desenvolvimento de imunidade ativa (KOHARA; TSUNEMITSU, 2000; DHAMA et al., 2009). Os rotavírus também constituem uma causa importante de diarreia em muitas espécies de mamíferos domésticos neonatos, aves domésticas e seres humanos, nos quais são responsáveis por, aproximadamente, 440.000 mortes de crianças com menos de cinco anos de idade, por ano, em todo o mundo (PARASHAR et al., 2003).

O rotavírus bovino pertence à família *Reoviridae* e o vírion apresenta estrutura icosaédrica, não envelopada, com 32 capsômeros, triplo capsídeo e genoma que contém 11 segmentos de RNA de fita dupla, que codifica ao menos seis proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) e, dependendo da estirpe, cinco ou seis proteínas não estruturais (NSP1 a NSP6) (MURPHY et al., 1999; ESTES, 2001; DHAMA et al., 2009).

Os membros do gênero rotavírus são classificados de acordo com o resultado de análises genóticas e sorológicas. A especificidade dos grupos é determinada pela proteína viral 6 (VP6), que classifica os vírus em sete grupos maiores (denominados A a G). Nos rotavírus do grupo A, que estão entre os agentes enteropatogênicos mais comumente associados à diarreia neonatal em bezerros, a VP6 também inclui antígenos responsáveis pela classificação em subgrupos I; II; Não-I/Não-II; e I + II (GENTSCH et al., 1996; MURPHY et al., 1999; ESTES, 2001).

As propriedades antigênicas dos rotavírus são determinadas pelas proteínas do capsídeo, sendo a diferenciação entre sorotipos baseada em testes de neutralização. Um sistema binário de classificação de sorotipos foi desenvolvido, uma vez que ambas as proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7) carregam epítomos tipo-específicos reconhecidos por anticorpos neutralizantes (MURPHY et al., 1999). Nesse sistema, a VP4 é referida como antígeno P (proteína protease-sensível), e a VP7 como antígeno G (glicoproteína) (ESTES, 2001). Nos rotavírus do Grupo A, 14 sorotipos foram definidos com base em diferentes antígenos VP7 e 8 sorotipos com base em diferentes antígenos VP4 (MURPHY et al., 1999).

1.2 Epidemiologia do rotavírus bovino

As infecções por BRV são ubíquas no ambiente dos animais domésticos e as vacas podem excretar o vírus nas fezes na fase final da gestação, constituindo fonte de infecção para suas crias. Entretanto, é provável que a principal forma de disseminação desse vírus seja de bezerros infectados para aqueles susceptíveis (RADOSTITS et al., 2007).

Na fase aguda da doença, os bezerros podem excretar até 10^{10} partículas virais por grama de fezes e essa excreção continua por 7-8 dias (MURPHY et al., 1999; ESTES, 2001). Segundo Saif, Rosen e Parwani (1994), a maioria dos bezerros é exposta ao BRV por volta da terceira semana de vida, e permanece susceptível até, aproximadamente, 8 semanas de idade. No entanto, ao estudar a prevalência de rotavírus em bezerros com idade entre 1 e 8 semanas de vida que apresentavam diarreia neonatal, por meio da microscopia eletrônica, Nourmohammadzadeh et al. (2012) verificaram maior taxa de prevalência da infecção por rotavírus em bezerros com 2 a 4 semanas de idade.

Fatores como o manejo e tamanho do rebanho, o tipo de alojamento, nutrição, estado imune e a presença concomitante de outros patógenos são considerados fatores de risco para a infecção por rotavírus (BARTELS et al., 2010; FREITAS et al., 2011). Além disso, o tamanho da propriedade e o tipo de manejo empregado podem influenciar a pressão de infecção sofrida pelos animais e, dessa forma, a ocorrência ou não de infecção por BRV.

A epidemiologia da diarreia neonatal por rotavírus é complexa em razão da co-circulação de diferentes sorotipos do vírus em uma determinada área geográfica, causada principalmente por mudanças genéticas e por rearranjos genômicos (STEELE; GEYER; GERDES, 2004).

No Brasil, Alfieri et al. (2006) relataram taxa de prevalência de 19,4% de BRV nas fezes de bezerros com diarreia em diversas regiões do país. Esses autores verificaram maior frequência de BRV do Grupo A em animais no primeiro mês de vida, sendo que, após os 60 dias de idade, a frequência de amostras de fezes diarreicas positivas era muito semelhante a das amostras de fezes positivas com consistência normal.

Em um levantamento em rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo, Buzinaro e Freitas (2002) constataram que 9,9% das fezes diarreicas e 1,7% das fezes normais coletadas eram positivas para BRV do Grupo A, e que a maior frequência de infecção foi em bezerros com idade entre 16 e 20 dias.

Langoni et al. (2004), estudando a etiologia de diarreia em bezerros no Estado de São Paulo, constataram que o rotavírus foi o agente etiológico mais prevalente, contabilizando 25,1% dos enteropatógenos detectados em fezes diarreicas de bezerros com até 30 dias de idade.

Freitas et al. (2011), avaliando a prevalência e a caracterização antigênica de amostras de fezes provenientes de rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo, constataram que a prevalência de rotavírus nas propriedades estudadas foi de 6,7%, e que amostras positivas foram obtidas tanto de animais com diarreia quanto daqueles que apresentavam fezes de consistência normal; ademais, notaram relação inversamente proporcional entre a frequência de positividade e a idade, com maior frequência de infecção em bezerros com idade entre 1 e 15 dias. Segundo

esses autores, a associação entre os genótipos G e P circulantes nos rebanhos estudados era G6P[5] e G10P[11].

Silva et al. (2012), avaliando a caracterização molecular de rotavírus bovino do Grupo A nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, verificaram que 5,5% das amostras analisadas foram positivas para rotavírus pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo a associação genotípica G6P[11] a mais prevalente circulando nos rebanhos dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, e G6P[5] a mais prevalente nos Estados de Goiás e Mato Grosso do Sul, o que comprova a existência de importantes diferenças regionais quanto às estirpes de rotavírus circulantes.

Em dois levantamentos sorológicos, um dos quais em 19 municípios do Estado de São Paulo e outro no município de Uruará, no Estado do Pará, constatou-se soropositividade de 30% a 100%, em animais de diversas faixas etárias (BRANDÃO et al., 2002a; BRANDÃO et al., 2002b). Jerez et al. (1987) também verificaram alta ocorrência de anticorpos anti-BRV em um estudo realizado em 27 municípios do Estado de São Paulo, com frequência de ocorrência de 48%.

Em BRVs do Grupo A, as combinações binárias mais comuns, que correspondem às cepas de referência, são: G6P[1] (vírus Nebraska de diarreia de bezerros - NCDV); G6P[5] (cepa UK); G10P[11] (cepa B223) e G8P[1] (cepa A5) (ALKAN et al., 2010). Na Turquia, Alkan et al. (2010) identificaram como genótipos mais comuns G6P[11] e G10P[11], enquanto nos EUA a cepa encontrada mais comumente é G6P[1] (PARWANI et al., 1993).

Em um estudo realizado na Argentina, constatou-se que os genótipos mais prevalentes em rebanhos bovinos leiteiros foram: G10P[11], G6P[11] e G6P[5] (BADARACCO et al., 2012). Fukai et al. (1999) relataram, em surtos de diarreia em bezerros no Japão, alta prevalência do genótipo G8 de BRV do grupo A, sendo as combinações binárias mais comuns G8P[6]+8 e G10P[8]. Segundo esses autores, o genótipo G8 foi o mais prevalente, o que difere dos achados em outras partes do mundo. Ao avaliarem bezerros assintomáticos, também no Japão, Abe et al. (2009) relataram que 5,3% dos animais excretavam rotavírus, e que a maioria das amostras pertencia ao genótipo G10P[11].

1.3 Patogenia e achados clínicos na infecção por rotavírus bovino

Os rotavírus penetram no hospedeiro pela via oral e infectam enterócitos maduros da borda em escova do intestino delgado, em especial nas regiões do duodeno e jejuno, se replicando no citoplasma e ocasionando alterações degenerativas (HALL et al., 1993; MURPHY et al., 1999). A perda rápida de grande quantidade de células leva à substituição do epitélio colunar por enterócitos cuboidais ou escamosos, com predominância de células imaturas provenientes das criptas, resultando em atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas intestinais (SCOTT et al., 2004).

Na diarreia por rotavírus em bezerros, as fezes apresentam coloração amarelo-pálida ou esbranquiçada em razão da alta concentração de leite não digerido. As manifestações clínicas são agudas e o período de incubação é muito curto (12 a 24h). Os animais afetados apresentam-se apenas moderadamente deprimidos, e continuam a mamar (MURPHY et al., 1999). A enfermidade cursa com desidratação e acidose metabólica; a ocorrência de piroxia é variável, mas quando ocorre normalmente é branda e pode ser decorrente de infecção secundária por patógenos oportunistas (SCOTT et al., 2004).

Em neonatos, a taxa de mortalidade em razão da diarreia por BRV pode superar 80%, mas a maioria dos relatos sugere que varia de 5 a 20%, sendo maior em bezerros que receberam volume insuficiente de colostro, que são afetados por outros patógenos, como *E. coli* patogênica ou que estão sob condições de estresse (DHAMA et al., 2009).

1.4 Diagnóstico laboratorial de rotavirose

O diagnóstico de rotavirose pode ser direto, baseado no isolamento e/ou identificação do agente viral ou indireto, baseado na identificação de antígenos virais nas fezes dos animais (PEREIRA et al., 1983; PEREIRA et al., 1985).

O cultivo de rotavírus provenientes de amostras fecais em sistemas celulares de linhagem contínua é difícil. Para a identificação direta ou indireta do vírus a partir de amostras de fezes, as técnicas utilizadas são microscopia eletrônica, reação de imunofluorescência, reação de imunoperoxidase, ensaio imunoenzimático (EIE), eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), reação em cadeia da polimerase

(PCR) e PCR em tempo real [RT-PCR] (GOUVEA et al., 1990; CHAUHAN; SINGH, 1992; GOUVEA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994a; GOUVEA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994b; CHAUHAN; SINGH, 1999; STEELE; GEYER; GERDES, 2004). O EIE é o mais empregado em razão de sua alta sensibilidade, praticidade e possibilidade de análise simultânea de grande número de amostras (DHAMA et al., 2009). Já a PAGE permite a determinação do eletroferótipo por meio da avaliação de um padrão de migração característico do RNA, sendo muito empregada em estudos epidemiológicos da infecção por rotavírus, uma vez que permite diferenciar os rotavírus dos Grupos A, B e C (HERRING et al., 1982; MURPHY et al., 1999).

A avaliação da resposta sérica ao BRV pode ser realizada por meio de ensaios de soroneutralização, ensaio imunoenzimático, imunoensaio bloqueador de epítopo, radioimunoensaio e coloração imunocitoquímica (ACRES; BABIUK, 1978; JEREZ et al., 1987; SAIF; ROSEN; PARWANI, 1994).

1.5 Imunidade passiva e proteção contra a infecção por rotavírus

A placenta de vacas possui cinco camadas que separam os suprimentos sanguíneos materno e fetal, evitando, dessa forma, a transferência de imunoglobulinas para o feto no decorrer da gestação. Em razão disso, os bezerros nascem agamaglobulinêmicos, dependendo assim, da absorção de imunoglobulinas do colostro nas primeiras 24 horas de vida para a proteção contra doenças (FAGLIARI et al., 1986; GODDEN, 2008).

Sabe-se que o volume e a qualidade do colostro produzido por vacas é amplamente variável, em especial em vacas de primeira cria (RADOSTITS et al., 2007). Segundo Rocha et al. (2012), os teores de proteína total e de globulinas foram maiores em bezerros filhos de vacas pluríparas, quando comparados aos filhos de vacas primíparas, em vacas da raça Canchim.

Especificamente com relação à infecção por rotavírus, a principal abordagem empregada para conferir imunidade aos bezerros consiste na vacinação de vacas prenhes no período final da gestação, visando aumentar o título de anticorpos colostrais específicos anti-BRV, bem como prolongar o tempo de secreção desses anticorpos no colostro, melhorando assim a imunidade lactogênica e a transferência de imunidade passiva (FERNANDEZ et al., 1996; MURPHY et al., 1999).

Embora a maioria das vacas seja soropositiva para o BRV em razão de exposição natural, em vacas não vacinadas os teores de anticorpos no leite declinam até títulos não-protetores poucos dias após o parto. A imunização de vacas prenhes com vacinas contra rotavírus aumenta de maneira efetiva os teores de imunoglobulinas específicas, as quais são transportadas seletivamente para o colostro no período periparto (FERNANDEZ et al., 1996; FERNANDEZ et al., 1998). É importante ressaltar que, os teores de imunoglobulinas colostrais são menores em novilhas de primeiro parto (ROCHA, 2010), o que contribui para as maiores taxas de morbidade e mortalidade de seus bezerros (RADOSTITS et al., 2007).

Não obstante, a proteção contra a infecção e diarreia causadas pelo BRV em bezerros durante o período de amamentação também tem sido relacionada a teores altos de anticorpos neutralizantes na luz intestinal, em especial o isótipo IgG1 adquirido passivamente (FERNANDEZ et al., 1998), e o isótipo IgA secretado localmente (McNEILLY et al., 2007). Segundo Besser et al. (1988), a ingestão de um grande volume de colostro incrementa a transferência de anticorpos do soro sanguíneo para a luz intestinal, favorecendo assim o estabelecimento de imunidade mucosa local.

A resposta imune da mucosa atua como a primeira linha de defesa contra muitos patógenos, tendo um papel essencial em determinar o resultado da infecção. Em ruminantes, vários métodos têm sido empregados para a avaliação da resposta humoral da mucosa *in vivo*, incluindo a quantificação de anticorpos antígeno-específicos no conteúdo do intestino delgado e nas fezes (GERDTS et al., 2001; HAN et al., 2006).

Ainda que, segundo alguns autores, não ofereça proteção efetiva contra a diarreia por rotavírus em bezerros, o nível de imunidade passiva sistêmica e local conferida aos bezerros pela ingestão do colostro, de alguma forma, determina o risco e a gravidade da infecção por BRV (PARREÑO et al., 2004; VAN METRE, TENNANT; WHITLOCK, 2008).

O papel da imunidade tipo-específica *versus* a imunidade cruzada na proteção contra a infecção por rotavírus ainda não está claro. Vários relatos sugerem que a proteção contra rotavírus é, principalmente, sorotipo-específica (ALKAN et al., 2010). Uma vez que no campo há vários sorotipos de BRV, a inclusão às vacinas do

sorotipo predominante em determinada região é importante para conferir imunidade passiva adequada aos bezerros, já que a incompatibilidade entre os antígenos vacinais e os vírus existentes à campo é uma das principais causas de falha vacinal (KIM et al., 2002; ALKAN et al., 2010).

Após a infecção natural por BRV, os bezerros ficam imunes à doença. Acredita-se que isso decorra da imunidade mucosa ativa fornecida pela IgG1 e por mecanismos mediados por células. Episódios repetidos de reinfecção sem a manifestação de sinais clínicos ocorrem ao longo da vida dos animais, mantendo a imunidade do rebanho e o vírus na população e no ambiente (SCOTT et al., 2004).

O desenvolvimento da resposta imune ativa pode ocorrer a partir da quarta semana de vida em bezerros que receberam colostro - sendo mais precoce em animais com falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) - e continua a se desenvolver até a puberdade. A interferência da imunidade materna sobre o desenvolvimento da imunidade ativa já foi discutida por outros autores, e influencia a resposta dos bezerros ao contato com agentes infecciosos e à vacinação (BARRINGTON; PARISH, 2001; CHASE; HURLEY; REBER, 2008; THIRY, 2012). Uma vez que a maior parte das imunoglobulinas adquiridas passivamente tem meia-vida de 16 a 28 dias, com frequência, os títulos dessas imunoglobulinas decaem a níveis não protetores para infecções de campo, embora impeçam a resposta dos bezerros à vacinação (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

1.6 Exames laboratoriais em animais jovens

O conhecimento das alterações que ocorrem no perfil bioquímico sérico de animais jovens é importante para a interpretação correta dos resultados em situações de morbidade, sendo uma ferramenta diagnóstica valiosa na avaliação de vários sistemas orgânicos (RUSSEL; ROUSSEL, 2007).

A desidratação rápida que acompanha a enterite aguda em neonatos ocasiona hemoconcentração e, por consequência, choque hipovolêmico. Já a hipercalemia resulta do aumento da transferência de potássio para o fluido extravascular e da redução da sua excreção renal. Hipoglicemia marcante pode também ser verificada ocasionalmente antes da morte em bezerros com infecções entéricas agudas, como resultado da redução da gliconeogênese e do aumento da

glicólise anaeróbia decorrente do choque hipovolêmico (KANEKO, HARVEY; BRUSS, 2008).

A determinação do proteinograma é importante para identificação e quantificação de diferentes frações proteicas, inclusive imunoglobulinas e proteínas de fase aguda (PFAs), tanto no soro sanguíneo quanto na secreção láctea. A avaliação das PFAs é um método de triagem promissor de animais que apresentam doença clínica ou subclínica e, dentre as diferentes técnicas empregadas para a sua realização, a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) apresenta como vantagem a possibilidade de identificação e quantificação de um maior número de proteínas específicas (COLE; ROUSSEL; WHITNEY, 1997; FAGLIARI et al., 2006).

1.7 Hipótese e Justificativa

Apesar de vários pesquisadores relatarem aumento nos títulos de anticorpos específicos anti-rotavírus no colostro e no leite após a vacinação de vacas prenhes com vacinas inativadas e com adjuvantes (SNODGRASS; FAHEY; WELLS, 1980; SAIF et al., 1983; SAIF; SMITH, 1985; SILVA, 2004) e proteção passiva de bezerros contra diarreia após desafio com BRV (SAIF; SMITH, 1985; ROUSIC et al., 2000), outros estudos não verificaram proteção (SNODGRASS; FAHEY; WELLS, 1980; MYERS; SNODGRASS, 1982; SILVA, 2004) indicando que, em trabalhos a campo, a eficácia da vacina contra BRV é variável.

As vacinas comerciais contra rotavírus presentes atualmente no mercado nacional, que, de maneira geral, são importadas dos Estados Unidos ou da Argentina, contêm os genótipos G6P[1] e G10P[11], embora Parwani et al. (1993) já relatasse que a estirpe predominante a campo nos Estados Unidos era G6P[5], enquanto que Badaracco et al. (2012), na Argentina, relataram que os genótipos encontrados em rebanhos leiteiros foram G10P[11], G6P[11] e G6P[5].

Levantamentos epidemiológicos recentes mostram que as estirpes que circulam nas diferentes regiões do Brasil também não coincidem com aquelas presentes nas vacinas comerciais. Segundo Alfieri et al. (2004), as estirpes mais prevalentes em um levantamento que incluiu os Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná foram G6P[5] e G10P[11]. Barreiros et al. (2004), relataram

que as cepas circulantes em rebanhos vacinados foram G6P[11], G6P[5] e G8P[11], enquanto em rebanhos não vacinados, foram G6P[1] e G8P[1]. Buzinaro et al. (2009) verificaram a presença dos genótipos G6P[11] e G6P[5] no Estado de São Paulo, enquanto Silva et al. (2012) relataram que as combinações binárias mais comuns encontradas foram G6P[5] nos Estados de Goiás e Mato Grosso do Sul, e G6P[11] nos Estados de São Paulo e Minas Gerais.

Uma vez que o papel da imunidade cruzada para rotavírus ainda não foi esclarecido, mas que, no entanto, pesquisadores já relataram a ausência de proteção cruzada entre as estirpes G6P[5] e G6P[1], (PARWANI et al., 1993), a presença de cepas encontradas a campo diversas daquelas presentes na vacina pode determinar um maior risco de falha vacinal (ALKAN et al., 2010).

Diante do exposto, é fundamental avaliar a eficácia das vacinas disponíveis no mercado nacional contra diarreia neonatal na prevenção da infecção e manifestação clínica de diarreia em bezerros frente ao desafio natural por BRV, bem como a transferência de imunidade passiva de vacas primíparas e pluríparas aos seus bezerros. Além disso, a literatura nacional também é escassa quanto à avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos, inclusive proteínas de fase aguda (PFAs), de bezerros com diarreia causada por rotavírus.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a transferência de imunidade passiva de vacas da raça Holandesa primíparas e pluríparas, imunizadas e não imunizadas com vacina comercial inativada contra rotavírus, para suas respectivas crias e determinar parâmetros hematológicos, bioquímicos e teores de imunoglobulinas anti-BRV em bezerros que manifestaram ou não diarreia no decorrer do primeiro mês de vida.

2.2 Objetivos Específicos:

2.2.1 Experimento 1:

O experimento 1 teve como objetivos:

- Determinar a resposta vacinal e a cinética de anticorpos anti-BRV no soro sanguíneo das vacas primíparas e pluríparas ao final da gestação.

- Avaliar a transferência de imunoglobulinas anti-BRV para as secreções lácteas das vacas e a cinética dessas imunoglobulinas nos dois primeiros dias de lactação.

- Investigar a influência do final da gestação sobre o proteinograma do soro sanguíneo das vacas, em especial a resposta das proteínas de fase aguda.

2.2.2 Experimento 2:

O experimento 2 teve como objetivos:

- Avaliar a transferência passiva de imunoglobulinas anti-BRV de vacas primíparas e pluríparas para o soro sanguíneo das suas respectivas crias e a cinética dessas imunoglobulinas nos primeiros 30 dias de vida dos bezerros.

- Determinar o leucograma, o perfil bioquímico sérico e o proteinograma dos bezerros, do nascimento aos 30 dias de idade.

- Verificar a presença, a excreção e o genótipo de rotavírus nas fezes dos bezerros.

2.2.3 Experimento 3:

O experimento 3 teve como objetivos:

- Avaliar o leucograma, parâmetros bioquímicos e concentrações de imunoglobulinas específicas anti-BRV em bezerros que manifestaram ou não diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, positivos ou negativos para rotavírus.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV)/Unesp/Câmpus de Jaboticabal, em 20 de julho de 2010 (protocolo nº 015110/10).

3.1 Rebanhos

Foram avaliados animais provenientes de um rebanho comercial que praticava regularmente vacinação contra diarreia neonatal bovina, criado no município de Descalvado-SP e de um rebanho criado no município de São Carlos-SP, no qual não era prática regular a vacinação contra diarreia neonatal bovina.

O rebanho de animais imunizados (Descalvado - SP), contava com 3.130 vacas da raça Holandesa, sendo 1.400 em lactação, com produção média de 32 litros de leite/vaca/dia, 170 bezerras com 1 a 80 dias de idade, 450 bezerras com idade entre 80 dias e 9 meses, 780 novilhas com 10 a 30 meses de idade e 330 vacas prenhes.

O rebanho de animais não imunizados (São Carlos - SP) era composto de 367 animais, dos quais, 100 eram vacas em lactação, que produziam, em média, 20 litros de leite/vaca/dia, 35 bezerras com 1 a 80 dias de idade, 98 novilhas com 10 a 30 meses de idade e 134 vacas prenhes.

3.2 Animais

Foram coletadas amostras de sangue de 93 vacas da raça Holandesa do rebanho vacinado e 62 vacas do rebanho não vacinado, dos quais foram selecionados 48 animais que atenderam aos seguintes critérios: fêmeas gestantes acompanhadas desde os 60 dias pré-parto, que levaram a gestação a termo, não manifestavam clinicamente indícios de nenhuma enfermidade por ocasião do parto e produziram volume de colostro suficiente para alimentar a respectiva cria no dia do parto.

As vacas de ambas as propriedades foram alocadas em dois grupos experimentais, com 24 animais cada, sendo 12 novilhas em regime de semi-

confinamento e 12 vacas pluríparas (Quadro 2) mantidas em regime de estabulação livre (*free-stall*). A alimentação das fêmeas seguiu as orientações do *National Research Council Comitee on Animal Nutrition – Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (NRC - 2001).

Quadro 2. Distribuição das vacas pluríparas das propriedades de animais vacinados e não vacinados, de acordo com o número de gestações.

Gestações	Rebanhos	
	Vacinado	Não vacinado
2 a 4	8	8
5	2	3
6	1	1
7	1	-

Na propriedade de Descalvado, as novilhas e vacas pluríparas foram imunizadas de acordo com o seguinte esquema:

- 1) Vacina comercial com adjuvante e contendo as cepas G6P[1] e G10P[11] de rotavírus inativado, coronavírus morto, colibacterina de *Escherichia coli* K99 e toxóide de *Clostridium perfringens* tipo C, de acordo com as recomendações do fabricante – administração, em vacas e novilhas prenhes, de duas doses por via intramuscular, com intervalo de, aproximadamente, 3 semanas entre elas, sendo a segunda dose administrada entre 3 e 6 semanas antes do parto.
- 2) Aos 60 e 30 dias pré-parto (APÊNDICE A): vacina comercial contendo suspensão de *Salmonella* Dublin, *Pasteurella multocida* e *Salmonella* Typhimurium em soro fisiológico fenicado a 0,5% inativadas pela adição de formalina a 40%;
- 3) Vacina comercial contendo uma preparação liofilizada de amostras vivas quimicamente alteradas dos vírus da IBR e PI3 associado com uma amostra viva modificada de BRSV, um diluente composto de uma combinação inativada de amostras citopáticas e não citopáticas do vírus da BVD e culturas inativadas dos cinco sorotipos de *Leptospira*.

Já na propriedade de São Carlos, apenas a vacina polivalente contra rotavírus, coronavírus, colibacilose e clostridiose não era administrada rotineiramente nos animais.

Em ambas as propriedades, os bezerros, filhos dessas fêmeas, foram examinados e mantidos em abrigos individuais até o desmame. No dia do nascimento, os bezerros receberam colostro da própria mãe em mamadeira, à vontade em um volume mínimo de 4 litros por animal e, no segundo dia de vida, os bezerros receberam 4,0 L de colostro da segunda ordenha da própria mãe, fracionados em duas refeições, pela manhã e à tarde.

Desde o nascimento até trinta dias de idade, os bezerros foram inspecionados diariamente e, aqueles que manifestavam indícios de anormalidade clínica foram separados dos demais e submetidos ao exame físico (DIRKSEN; GRUNDER; STÖBER, 1993) e aos procedimentos terapêuticos, cirúrgicos ou preventivos adequados. Os dados relativos a cada animal foram anotados em fichas individuais.

3.3 Grupos experimentais

3.3.1 Experimento 1:

As vacas da raça Holandesa foram alocadas em dois grupos e quatro subgrupos experimentais:

- **Grupo V1:** 24 vacas que receberam vacina comercial inativada contra BRV.
 - *Subgrupo V1n:* 12 vacas em primeira gestação vacinadas.
 - *Subgrupo V1v:* 12 vacas em segunda ou mais gestações vacinadas.
- **Grupo V2:** 24 vacas não vacinadas contra BRV.
 - *Subgrupo V2n:* 12 vacas em primeira gestação não vacinadas.
 - *Subgrupo V2v:* 12 vacas em segunda ou mais gestações não vacinadas.

3.3.2 Experimento 2:

Os 48 bezerros também foram alocados em dois grupos e quatro subgrupos experimentais:

- **Grupo B1:** 24 bezerros de vacas que receberam vacina comercial inativada contra BRV.
 - *Subgrupo B1n:* 12 bezerros de vacas em primeira gestação vacinadas.

- *Subgrupo B1v*: 12 bezerros de vacas em segunda ou mais gestações vacinadas.

▪ **Grupo B2**: 24 bezerros de vacas não vacinadas contra BRV.

- *Subgrupo B2n*: 12 bezerros de vacas em primeira gestação não vacinadas.

- *Subgrupo B2v*: 12 bezerros de vacas em segunda ou mais gestações não vacinadas.

3.3.3 Experimento 3:

Vinte e quatro bezerros pertencentes aos grupos experimentais B1 e B2 (Experimento 2) foram realocados em três grupos, de acordo com a ocorrência de diarreia:

- **Grupo A**: 8 bezerros que não manifestaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida.
- **Grupo B**: 8 bezerros que manifestaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes.
- **Grupo C**: 8 bezerros que manifestaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, e foram positivos para a detecção de rotavírus nas fezes.

Quadro 3. Número de animais realocados nos grupos A, B e C no Experimento 3, de acordo com os subgrupos de origem no Experimento 2.

Origem		Destino		
Grupo	Subgrupo	Grupo A	Grupo B	Grupo C
B1	Grupo B1n	2	1	1
	Grupo B1v	3	4	4
B2	Grupo B2n	1	1	1
	Grupo B2v	2	2	2
Total		8	8	8

3.4 Coleta e preparação das amostras

3.4.1 Amostras obtidas das vacas

As amostras de sangue para separação do soro sanguíneo das vacas foram coletadas em três ocasiões: imediatamente antes da vacinação de 60 dias pré-parto,

aos 30 dias pré-parto e no dia do parto. Essas amostras foram obtidas por punção jugular ou da veia mamária, após assepsia local com álcool iodado, utilizando-se sistema de coleta a vácuo, em frascos de 10 mL sem anticoagulante. Foram centrifugadas a 1.000 x g durante 10 minutos, obtendo-se alíquotas de 1,5 mL de soro que foram identificadas e armazenadas em microtubos, em temperatura de 20°C negativos, até o momento das análises.

Após o parto e no segundo dia de lactação, foram realizadas coletas de colostro por meio de ordenha manual de um volume aproximado de 12,5 mL de secreções lácteas de cada quarto mamário, formando assim um *pool* de 50 mL, logo após assepsia local com solução clorada, uma vez ao dia. As secreções lácteas das vacas eram acondicionadas em tubos tipo Falcon de 50 mL e armazenadas sob refrigeração até o momento do processamento.

Para obtenção do soro lácteo foi realizado o procedimento recomendado por Sant'ana e Birgel (2003) - uma solução de renina¹ foi adicionada em quantidade correspondente a 5% do volume de colostro e, em seguida, as amostras permaneceram em banho-maria a 37°C durante 20 minutos, até a formação e retração do coágulo. Posteriormente, foram centrifugadas a 4.200 x g durante 20 minutos, em centrífuga refrigerada a 15°C. Após a centrifugação foram aspiradas alíquotas de 1,5 mL do soro lácteo que foram congeladas a -20°C, até o momento das análises.

3.4.2 Amostras obtidas dos bezerros

Amostras de sangue dos bezerros para a realização do leucograma e para a separação de soro sanguíneo foram coletadas em sete momentos: antes da ingestão de colostro e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento. Nos animais que apresentaram episódios de diarreia, as coletas de sangue foram realizadas a intervalos de 24 horas, por até dois dias após a cessação da diarreia. As amostras de sangue foram obtidas por venopunção jugular, após assepsia local com álcool iodado, utilizando-se sistema de coleta a vácuo, sendo 5 mL em frascos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para a realização do leucograma e 10 mL em frascos sem anticoagulante, para as análises bioquímicas do soro sanguíneo. As

¹ Coelho Estrella®, Chr. Hansen Brasil Ind. e Com. LTDA, Valinhos, São Paulo, Brasil.

amostras de sangue sem anticoagulante foram processadas para obtenção do soro sanguíneo, como descrito no item 3.4.1.

As amostras de fezes dos bezerros foram obtidas diretamente da ampola retal, nos mesmos momentos especificados para as coletas de sangue, sendo classificadas, em escores, de acordo com sua consistência, presença de muco e estrias de sangue, ou seja: escore 0 (fezes firmes/mecônio), escore 1 (fezes pastosas), escore 2 (fezes semilíquidas) e escore 3 (fezes líquidas) (FERNANDEZ et al., 1998). As fezes foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração em caixa isotérmica até a chegada ao laboratório, sendo posteriormente armazenadas a -20°C até o momento das análises.

3.5 Análises laboratoriais

O perfil bioquímico das amostras de sangue e leite e o leucograma foram realizados no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/Unesp/Câmpus de Jaboticabal.

Os testes imunoenzimáticos indiretos (EIE indireto) para detecção de IgG (h+l) específica anti-BRV no soro sanguíneo e no soro colostrado foram realizados no Laboratório de Imunologia e Virologia do Departamento de Patologia Animal da FCAV/Unesp/Câmpus de Jaboticabal.

A eletroforese em gel de poliacrilamida para análise da presença e caracterização eletroforética do rotavírus nas fezes dos bezerros foi realizada no Laboratório de Rotavirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV/Unesp/Câmpus de Jaboticabal.

A reação em cadeia da polimerase e a genotipagem das amostras de fezes positivas para rotavírus foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e de Sorologia (LABMAS), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da FMVZ/USP, São Paulo.

3.5.1 Parâmetros bioquímicos do soro sanguíneo e da secreção láctea

Nas amostras de soro sanguíneo das vacas foram determinados os teores de proteína total (método do biureto) e de albumina (método do verde de bromocresol)

e nas amostras de soro sanguíneo dos bezerros foram determinadas as atividades da enzima gamaglutamiltransferase (método de Szasz modificado), bem como os teores de proteína total, albumina, cloretos (método do tiocianato mercúrio), ureia (método enzimático UV) e creatinina (método picrato alcalino - Jaffé) utilizando-se conjuntos de reagentes comerciais². As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro semiautomático³, com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste. Também, foram determinados os teores séricos de cálcio ionizado, sódio e potássio dos bezerros, pelo método do íon seletivo, empregando-se analisador de íons⁴. Os teores de globulinas séricas de vacas e bezerros foram calculados por meio da diferença aritmética entre as concentrações de proteína total e albumina.

Nas amostras de soro lácteo, foram realizadas as análises da atividade da enzima gamaglutamiltransferase e do teor de proteína total empregando-se os mesmos testes e métodos mencionados anteriormente.

Sempre que necessário, foram realizadas diluições das amostras de soro sanguíneo e do soro lácteo em água destilada para as leituras no espectrofotômetro, de acordo com o esquema mostrado no Quadro 4 (ROCHA, 2010).

Quadro 4. Diluições realizadas nas amostras de soro sanguíneo e de soro lácteo para leitura em espectrofotômetro.

Amostra	Dias após o parto/nascimento	Parâmetro avaliado	Diluição
Soro sanguíneo (bezerros)	1	Gamaglutamiltransferase	1:20
	2 e 7		1:10
Soro lácteo	0	Gamaglutamiltransferase	1:150
	1		1:50 a 1:100
	0	Proteína Total	1:3

Para o fracionamento das proteínas do soro sanguíneo e do soro lácteo, foi utilizada a técnica de SDS-PAGE de acordo com o proposto por Laemmli (1970). Após o fracionamento, o gel foi corado em solução de azul de coomassie 0,2% e, posteriormente, o excesso de corante foi removido adicionando-se uma solução de ácido acético 0,1% e álcool metílico 0,25%, até que as frações proteicas se

² Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil.

³ Labquest, Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil.

⁴ 9180 Electrolyte Analyser, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany.

apresentassem nítidas. As concentrações das proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado⁵ e como referência foi utilizada uma solução marcadora⁶ com diferentes pesos moleculares, de amplo e estreito espectro, além das proteínas purificadas IgG, transferrina, lactoferrina, α_1 -glicoproteína ácida, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e β -caseína de origem bovina⁶.

3.5.2 Leucograma

De cada amostra de sangue venoso coletada com o anticoagulante EDTA foram realizadas as contagens de leucócitos em aparelho automático⁷. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada a partir da diferenciação de 200 células em esfregaço sanguíneo corado com o corante de Rosenfeld modificado, por meio de microscopia óptica (THRALL, 2007).

3.5.3 Ensaio imunoenzimático indireto (EIE indireto) para a quantificação dos títulos de imunoglobulinas anti-rotavírus

A determinação dos títulos dos isótipos de imunoglobulinas anti-rotavírus, no soro sanguíneo e nas secreções lácteas das vacas e no soro sanguíneo dos bezerros foi realizada por meio da EIE indireto, como preconizado por Fernandez et al. (1996), com algumas modificações, de acordo com as etapas descritas a seguir.

O antígeno viral empregado (estirpe UK (G6P[5]) de rotavírus bovino), gentilmente cedido pelo Laboratório Biogenesis (Argentina), foi concentrado segundo indicações de Killington, Stokes e Hierholzer (1996), com algumas modificações. Todas as etapas do processo de concentração foram realizadas à temperatura de 4°C. Em resumo, para um volume de 250 mL de suspensão viral, foi adicionado polietilenoglicol (PEG) 6.000 a uma concentração final de 8,7% peso/volume (p/v) e cloreto de sódio (NaCl) a uma concentração final de 2,7% p/v, sob agitação magnética lenta e constante. A mistura foi deixada em agitação por 1 hora após a dissolução do PEG e do NaCl, e acondicionada em repouso a 4°C durante 18 horas. Posteriormente, realizou-se centrifugação a 11.739 x g por 30 minutos, sendo o precipitado ressuspenso em 5 mL de tampão PBS (0,01M PO4;

⁵ Shimadzu CS9301, Tóquio, Japão.

⁶ Sigma, St Louis, MO, USA.

⁷ poch-100iV Diff, Sysmex, Roche Diagnóstica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

NaCl 0,14M; pH 7,4). As amostras de antígeno concentrado foram armazenadas em alíquotas a -70°C até o momento da utilização.

Leite em pó desnatado a 10%, desnaturado por fervura, foi utilizado no sistema de bloqueio do EIE indireto para evitar reações inespecíficas (“ruídos”) de acordo com as recomendações de Montassier (1999).

Amostras de soro bovino anti-rotavírus utilizadas como referência positiva e negativa foram obtidas de quatro bezerros pertencentes à propriedade de animais vacinados (Descalvado, SP). O controle negativo foi obtido de um bezerro recém-nascido, antes da ingestão de colostro, enquanto o controle positivo foi oriundo de três bezerros com 140 dias de idade, acometidos anteriormente por rotavirose, que foram imunizados com duas doses da mesma vacina comercial contendo o vírus inativado empregada nas vacas, administradas por via intramuscular (IM), a um intervalo de 4 semanas. Os soros utilizados como referência positiva foram provenientes de um pool de amostras, coletadas aos 15, 30 e 45 dias após a administração da última dose da vacina.

Empregou-se o conjugado imunoenzimático de coelho anti-IgG de cadeias pesada e leve bovina⁸, conjugado à enzima peroxidase.

O substrato utilizado na reação consistiu de uma solução cromógena de 4 mg de ortofenilenodiamina (OPD) diluída em 5,5 mL de água deionizada e acrescida de 20 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%.

As diluições ideais do antígeno viral, amostras de soro sanguíneo e de colostro e dos conjugados imunoenzimáticos foram determinadas por titulações em bloco, por meio da reação de diferentes diluições seriadas por imunorreagente testado, pela técnica do EIE indireto. O antígeno foi testado nas diluições 1:2 a 1:256. Para as amostras de soro dos bezerros e das vacas, partiu-se da diluição 1:12,5 até 1:1.600, enquanto que para as amostras de colostro, partiu-se da diluição 1:1.600 até 1:25.600. Ao final, foram escolhidas as diluições que proporcionaram densidades ópticas (DO's) por volta de 1,2 à 1,5, sem desencadear reações inespecíficas.

As microplacas rígidas de fundo plano, com 96 cavidades⁹ foram sensibilizadas com 50 μL por cavidade do antígeno viral (rotavírus estirpe UK) na

⁸ Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA.

sua diluição ideal (1:32) em tampão carbonato-bicarbonato (TCB, Apêndice B), seguido por incubação por 18 horas a 4°C, em câmara úmida. Após adsorção do antígeno viral e antes da adição de cada imunorreagente, foram realizadas quatro lavagens sucessivas das microplacas com PBS (Apêndice B), contendo 0,05% de tween 20 (PBSt) em lavadora automática¹⁰.

Depois da lavagem das microplacas foram adicionados 100 µL da solução bloqueadora, constituída de leite em pó desnatado a 10% diluído em TCB, desnaturado por fervura e centrifugado a 3.214 x g. As microplacas foram incubadas durante uma hora a 37°C em câmara úmida e, após a incubação, foi realizada lavagem das microplacas como descrito anteriormente. Após a lavagem, foram adicionadas em duplicata 50 µL das diluições únicas e ideais, preparadas em leite em pó desnatado a 10% desnaturado por fervura, acrescido de ovoalbumina a 2,5% e PBSt (tampão diluente), das amostras-teste do soro sanguíneo e colostro e das amostras de referência positiva e negativa. Foi realizada nova incubação de uma hora a 37°C, em câmara úmida, e lavagem das microplacas como descrito anteriormente.

As microplacas receberam na fase subsequente, 50 µL por cavidade da diluição ideal do conjugado imunoenzimático anti-IgG bovina conjugada à peroxidase em tampão diluente. As microplacas foram então incubadas durante duas horas, a 37°C, em câmara úmida, e novamente lavadas como descrito. Para completar a reação, foram adicionadas 50 µL por cavidade de uma solução cromógena contendo dois comprimidos (2 mg/comprimido) de OPD diluídos em 5,5 mL de água deionizada, acrescido de 20 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%. Foi realizada uma nova incubação durante 15 minutos, à temperatura ambiente e sob proteção da iluminação direta.

O bloqueio da atividade enzimática foi realizado com a adição de 50 µL por cavidade de uma solução de ácido clorídrico (HCl) 2M. A leitura das DOs da reação foi realizada em leitor de microplacas¹¹, a um comprimento de onda de 490 nm. A média das DOs, para cada amostra teste, foi transformada em valor A/P (amostra/positivo), calculado por meio da seguinte fórmula:

⁹ Costar 3590, Corning Incorporated, Corning, NY, USA.

¹⁰ Wellwash 4, Labsystems, Uniscience.

¹¹ Bio-Rad iMark microplate reader.

$$A/P = \frac{Z-X}{Y-X}, \text{ na qual:}$$

Z= DO média da amostra teste (soro sanguíneo ou colostro)

X= DO média do controle negativo (soro sanguíneo)

Y= DO média do controle positivo (soro sanguíneo)

Uma vez que as amostras de soro sanguíneo e soro colostrado foram avaliadas em diferentes diluições, foi necessário corrigir essas diferenças, multiplicando-se o valor A/P de cada amostra pelo fator de diluição empregado e, em seguida, dividindo-se esse resultado por 550, para que a maior parte das A/Ps obtidas se mantivessem no intervalo de 0 a 1,5.

3.5.4 Análise da presença de rotavírus nas fezes por meio de eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE)

A detecção de rotavírus nas fezes foi realizada por meio da técnica de PAGE de acordo com as recomendações de Herring et al. (1982), com algumas modificações introduzidas por Pereira et al. (1983).

Suspensões de fezes a 50% foram preparadas em tampão Tris/cálcio (Tris/HCl 0,1M; CaCl₂ 1,5 mM pH 7,3), homogeneizadas por meio de agitações periódicas durante 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 18.000 x g por 30 minutos. Para a extração do RNA viral, adicionou-se 40 µL de lauril sulfato de sódio (SDS) a 10%, 40 µL de acetato de sódio 1M e 400 µL de uma mistura de álcool isoamílico, clorofórmio e fenol a 400 µL de suspensão fecal e, após homogeneização, os tubos foram centrifugados a 10.621 x g por 15 minutos. Obteve-se uma solução trifásica e o sobrenadante foi transferido para tubos tipo eppendorf, aos quais adicionou-se 800 µL de etanol a 70% gelado. Os tubos foram então incubados a -20°C *overnight*. Após a incubação, os tubos foram centrifugados novamente a 10.621 x g por 15 minutos, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 16 µL de dissociador da amostra (3% de SDS, 12,5% de Tris/HCl 0,5M, pH 6,8; 5% de 2-mercaptoetanol; 0,005% de azul de bromofenol; 40% glicerol) ao pellet

formado no fundo do tubo. Os tubos foram então incubados em banho-maria a 56°C por 15 minutos.

A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida 7,5%, utilizando-se solução estoque de acrilamida/bisacrilamida na concentração 30/0,8 para o preparo do gel. O gel de poliacrilamida foi distribuído entre duas placas de vidro com espaçadores de 1,0 mm de espessura. Adicionou-se primeiramente o gel inferior [acrilamida 7,5% - bisacrilamida 0,2%; TEMED (tetrametilenediamina) 0,2%; persulfato de amônio 0,03%]. Após a polimerização o gel superior foi adicionado (acrilamida 3,5% - bis-acrilamida 0,04%, TEMED 0,2%, persulfato de amônio 0,015%), e o pente colocado imediatamente na abertura superior, para a formação das canaletas. Após o posicionamento do gel na cuba de corrida, os reservatórios desta foram preenchidos com tampão de corrida Tris/Glicina (Tris 0,025M, glicina 0,109M - pH 8,3) e posteriormente as amostras com dissociador foram distribuídas nas canaletas. A corrida foi realizada a 20mA por placa, durante 4 horas e 30 minutos.

A coloração com nitrato de prata foi realizada de acordo com as recomendações de Herring et al. (1982), logo após o término da corrida. Ao ser retirado da cuba, o gel foi lavado três vezes com água destilada e fixado durante 30 minutos em solução aquosa de etanol (10%) e ácido acético (1%) sob agitação. A seguir, realizou-se a coloração com solução aquosa de nitrato de prata 0,011M, durante 60 minutos também sob agitação. Após esse período, a solução foi desprezada e lavou-se o gel para a retirada do excesso adicionando a solução reveladora de hidróxido de sódio 0,75M e formaldeído 0,95%, até ser possível visualizar os segmentos do genoma viral. O bloqueio do processo de coloração foi realizado com solução de ácido acético 5% por 15 minutos sob agitação, e o gel conservado em solução de etanol a 10%. As amostras que apresentaram disposição de bandas na migração eletroforética semelhante ao controle positivo (padrão NCDV), foram consideradas positivas, sendo posteriormente submetidas à reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) e genotipagem (Figura 1).

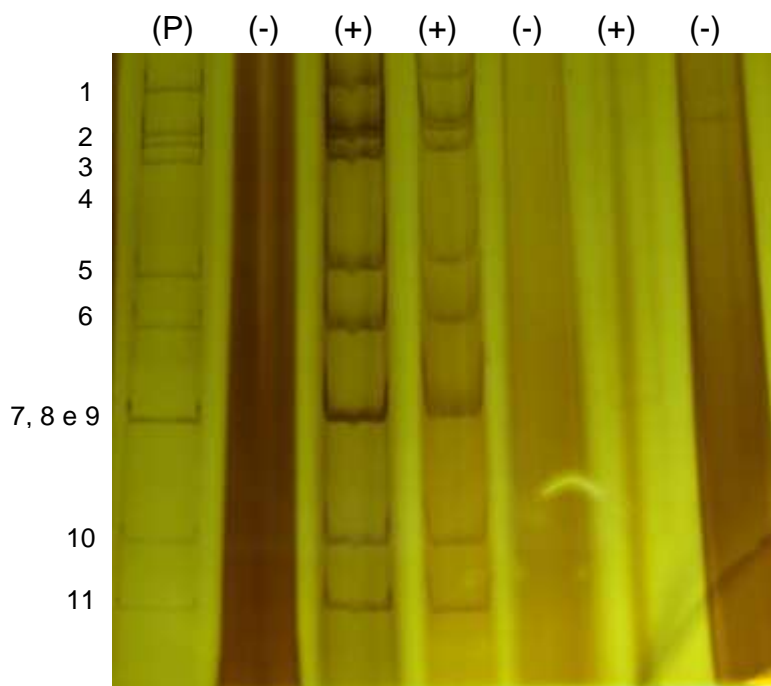


Figura 1. PAGE para detecção do rotavírus nas fezes. Padrão (P), amostras positivas (+), nas quais é possível observar os segmentos de RNA do vírus (identificados de 1 a 11) e amostras negativas (-).

3.5.5 Genotipagem das amostras positivas para rotavírus

A reação em cadeia da polimerase (PCR) precedida de transcrição reversa (RT) do RNA viral foi utilizada para a caracterização dos genótipos G e P de rotavírus bovino, baseando-se na metodologia descrita a seguir. Para a extração RNA, empregou-se o reagente Trizol¹² de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi então ressuspendido em 17 μ L de água previamente tratada com DEPC e mantido a -20°C até o seu processamento nas etapas subsequentes. A partir do RNA extraído, as amostras foram submetidas à reação de transcrição reversa (RT) utilizando-se *primers* randômicos¹³, de acordo com o protocolo descrito a seguir.

Sete microlitros da amostra de RNA extraído foram misturados à solução “RT-mix”, que por sua vez é composta por 4 μ L de *First Strand Buffer*¹⁵, 2 μ L de solução de dNTP a 10 mM, 2 μ L de DTT (100mM), 1 μ L de *Random primers*¹⁴ (50 ng/ μ L), 3 μ L

¹² Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbed, CA, EUA.

¹³ Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbed, CA, EUA. (Cat. n.º. 18067017)

¹⁴ Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbed, CA, EUA. (Cat. n.º. 48190011)

de água e 200 U transcriptase reversa¹⁵ para um volume final de reação de 20 µL; incubando-a a seguir por 37^oC/50 minutos e 70^oC/15 minutos.

Para cada gene VP4 e VP7, foram adotados diferentes pares de *primers* (Quadro 5) e ciclos de tempo/temperatura (Quadro 6). 2,5 µL (para algumas amostras foram utilizados 5,0 µL, caso não tenha havido adequada amplificação do fragmento) de cDNA (oriundo da reação de RT) foram misturados à solução “PCR-mix”, que por sua vez, é composta por 1x PCR Buffer¹⁵, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de *primer* (senso e anti-senso), 1,5 mM de MgCl₂, 0,625 U de *Platinum Taq DNA Polymerase*¹⁵, água q.s.p. 25 µL; e submetidos ao respectivo ciclo de termociclagem.

Quadro 5. Relação dos *primers* e respectivas sequências, fragmentos gerados e referências utilizadas na caracterização dos genes de rotavírus.

Genes	Primers	Sequência	Fragmentos gerados	Referências
VP4	sCon3	TTCGCTCATTATAGACA	873	Desenvolvido USP
	Con2	ATTCGGACCATTATAACC		Gouvea et al. (1994a)
	sCon3	TTCGCTCATTATAGACA	815	Desenvolvido USP
	VP4RV	TAYTGCATYTCYTTCCA		Tonietti et al. (2013)
VP7	sBeg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTC	933	Gouvea et al. (1994b)
	VP7RV	TGCCACCAYTYTTCCA		Tonietti et al. (2013)
	sBeg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTC	1062	Gouvea et al. (1994b)

Quadro 6. Relação das condições de termociclagem utilizadas nas reações de PCR, de acordo com os primers empregados, visando a caracterização G e P de rotavírus.

Primers	Ciclo - tempo - temperatura
Scon3/Con2	94°C - 3 min/40 ciclos de [94°C - 1 min; 42°C - 2 min; 72°C - 1 min]/ 72°C - 10min
VP7RV/VP4RV	94°C - 3 min/40 ciclos de [94°C - 1 min; 50°C - 1,5 min; 72°C - 1 min]/ 72°C - 10min
sBeg9/ End9CRW8	94°C - 3 min/40 ciclos de [94°C - 1 min; 42°C - 2 min; 72°C - 1 min]/ 72°C - 10min

3.6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa AgroEstat 1.0

¹⁵ MMLV reverse transcriptase (Cat. n.º. 28025021) ou SuperScript III Reverse transcriptase (Cat. n.º. 18080093) - Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbed, CA, EUA.

(BARBOSA; MALDONADO JÚNIOR, 2008). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Empregou-se, ainda, o teste de correlação de Pearson para verificar o grau de relação entre algumas variáveis, considerando-se correlação significativa quando $P < 0,05$.

Os dados relativos aos momentos de manifestação de diarreia dos Grupos B e C foram analisados por meio da amplitude *studentizada* de Tukey (*HSD Test*) empregando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS).

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1:

Os resultados obtidos são mostrados nas Tabelas 1 a 14 e nas Figuras 2 a 7.

4.1.1 Avaliação do soro sanguíneo das vacas

4.1.1.1 Proteína total

Constatou-se diferença significativa entre subgrupos com relação ao teor sérico de proteína total (Tabela 1 e Figura 2) aos 30 dias pré-parto, ocasião na qual a maior concentração foi notada no subgrupo V2v e a menor no subgrupo V2n. Independente dos resultados da análise estatística, verificou-se que os teores de proteína total das vacas do grupo V2 foram significativamente maiores que das vacas do grupo V1.

Não foi verificada diferença significativa entre momentos aos 60 e 30 dias pré-parto em nenhum dos grupos, no entanto, no dia do parto (momento 0), os teores encontrados foram significativamente menores que aqueles constatados nas coletas anteriores.

Tabela 1. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **proteína total** (g/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
60	7,73±0,50 ^{Aa}	8,05±0,50 ^{Aa}	8,13±0,50 ^{Aa}	8,36±0,61 ^{Aa}
30	7,79±0,52 ^{Ba}	8,24±0,43 ^{ABa}	7,82±0,53 ^{Ba}	8,53±0,63 ^{Aa}
0	6,34±0,97 ^{Bb}	6,65±0,56 ^{ABb}	6,62±0,73 ^{ABb}	7,15±0,60 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

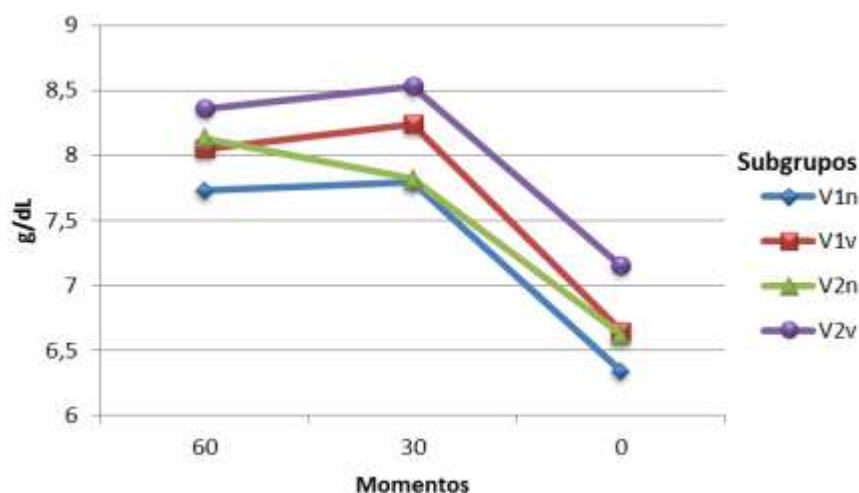


Figura 2. Teor sérico de **proteína total** (g/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

4.1.1.2 Globulinas

Não foi constatada diferença significativa entre grupos quanto ao teor sérico de globulinas (Tabela 2). Entre momentos, verificou-se em ambos os grupos, assim como para o teor de proteína total, diminuição significativa da concentração de globulinas no dia do parto (momento 0), quando comparado aos 60 e 30 dias pré-parto.

Tabela 2. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **globulinas** (g/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
60	5,20±0,47 ^{Aa}	5,54±0,75 ^{Aa}	5,38±0,59 ^{Aa}	5,63±0,73 ^{Aa}
30	5,28±0,50 ^{Aa}	5,86±0,57 ^{Aa}	5,23±0,57 ^{Aa}	5,80±0,57 ^{Aa}
0	3,75±0,96 ^{Ab}	3,93±0,66 ^{Ab}	4,13±0,59 ^{Ab}	4,38±0,50 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.1.1.3 Imunoglobulina A (IgA) pela técnica de SDS-PAGE

Notou-se diferença significativa entre subgrupos quanto ao teor sérico de IgA aos 60 e 30 dias pré-parto, (Tabela 3 e Figura 3). Em ambos os momentos, a

concentração sérica dessa imunoglobulina foi significativamente maior no subgrupo V2v, valor intermediário foi notado no subgrupo V2n e menores teores foram constatados no grupo V1.

Entre momentos, foi verificado menor teor de IgA no dia do parto, quando comparado às demais avaliações, em ambos os grupos.

Tabela 3. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **imunoglobulina A** (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
60	74,0±27,6 ^{Ba}	69,4±16,6 ^{Ba}	85,3±37,4 ^{ABa}	112±39,9 ^{Aa}
30	77,7±37,1 ^{Ba}	75,1±28,9 ^{Ba}	101±32,5 ^{ABa}	112±34,7 ^{Aa}
0	43,0±28,5 ^{Ab}	31,2±13,1 ^{Ab}	56,9±19,1 ^{Ab}	61,7±46,8 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

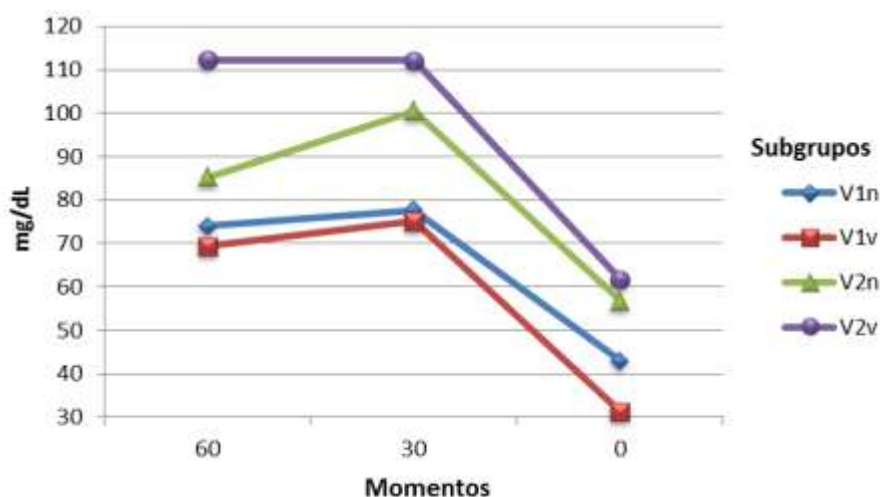


Figura 3. Teor sérico de **imunoglobulina A** (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

4.1.1.4 Ceruloplasmina pela técnica de SDS-PAGE

Constatou-se diferença significativa entre subgrupos quanto ao teor de ceruloplasmina (Tabela 4 e Figura 4). Aos 60 dias pré-parto, a maior concentração sérica foi constatada nas vacas do subgrupo V2n, quando comparadas aos

subgrupos V1n e V2v. No dia do parto, verificou-se maior teor dessa PFA no subgrupo V2n, quando comparado aos subgrupos V1n e V2v; no subgrupo V1n, quando comparado ao subgrupo V1v e no subgrupo V2v, quando comparado ao subgrupo V1v.

À exceção do subgrupo V1v, no qual não houve diferença significativa entre momentos, constatou-se a maior concentração de ceruloplasmina no dia do parto, quando comparado às coletas anteriores (60 e 30 dias pré-parto), no subgrupo V1n e no grupo V2.

Tabela 4. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **ceruloplasmina** (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
60	35,8±12,0 ^{Bb}	36,7±22,1 ^{Ba}	64,4±33,4 ^{Ab}	37,5±10,5 ^{Bb}
30	43,8±11,2 ^{ABb}	33,0±9,79 ^{Ba}	58,2±15,1 ^{Ab}	36,1±13,2 ^{ABb}
0	64,1±26,8 ^{Ba}	38,6±18,3 ^{Ca}	101±26,4 ^{Aa}	68,2±36,9 ^{Ba}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

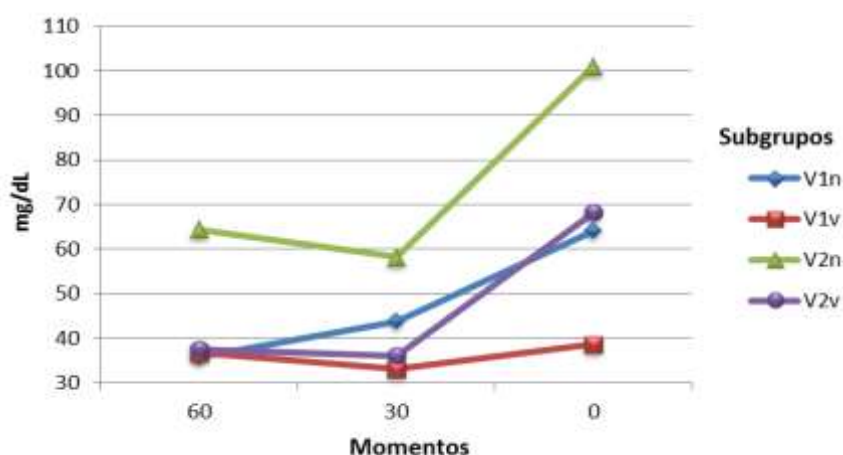


Figura 4. Teor sérico de **ceruloplasmina** (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

4.1.1.5 Transferrina pela técnica de SDS-PAGE

Verificou-se que o teor sérico de transferrina (Tabela 5 e Figura 5) foi significativamente maior no subgrupo V2n, quando comparado ao subgrupo V1n, em todos os momentos avaliados.

Entre momentos, no grupo V2, notou-se diminuição do teor dessa proteína a partir dos 60 dias pré-parto até o momento 0, enquanto nos animais vacinados (grupo V1), verificou-se aumento sutil do teor dessa PFA entre os 60 e 30 dias pré-parto, seguido por diminuição no momento 0.

Tabela 5. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **transferrina** (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
60	265±55,9 ^{Ba}	275±66,7 ^{Bab}	418±83,9 ^{Aa}	360±132 ^{ABa}
30	274±84,1 ^{Ba}	296±64,9 ^{ABa}	392±99,2 ^{Aab}	311±127 ^{ABab}
0	186±65,9 ^{Bb}	212±89,1 ^{Bb}	343±134 ^{Ab}	242±141 ^{ABb}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

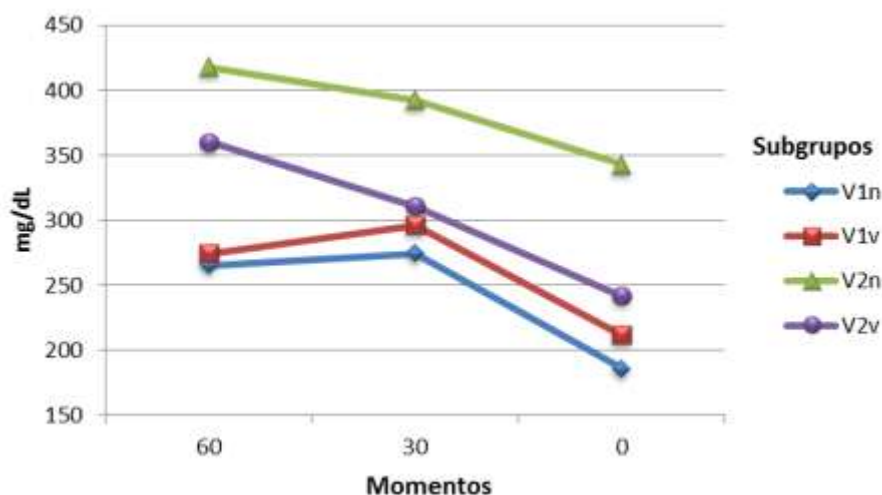


Figura 5. Teor sérico de **transferrina** (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

4.1.1.6 Imunoglobulina G (IgG) pela técnica de SDS-PAGE

Aos 30 dias pré-parto, não foi verificada diferença significativa entre grupos quanto ao teor sérico de IgG (Tabela 6 e Figura 6). No dia do parto, a maior concentração dessa imunoglobulina foi constatada no subgrupo V2v, enquanto o menor teor foi verificado no subgrupo V1v.

Em ambos os grupos, notou-se diminuição do teor dessa fração proteica entre os 60 dias pré-parto e o dia do parto.

Tabela 6. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **imunoglobulina G** (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
60	1.987±232 ^{Ba}	2.142±442 ^{ABa}	2.209±417 ^{ABab}	2.486±429 ^{Aa}
30	2.164±371 ^{Aa}	2.210±394 ^{Aa}	2.320±335 ^{Aa}	2.415±283 ^{Aa}
0	1.529±335 ^{BCb}	1.443±471 ^{Cb}	1.901±438 ^{ABb}	2.020±746 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

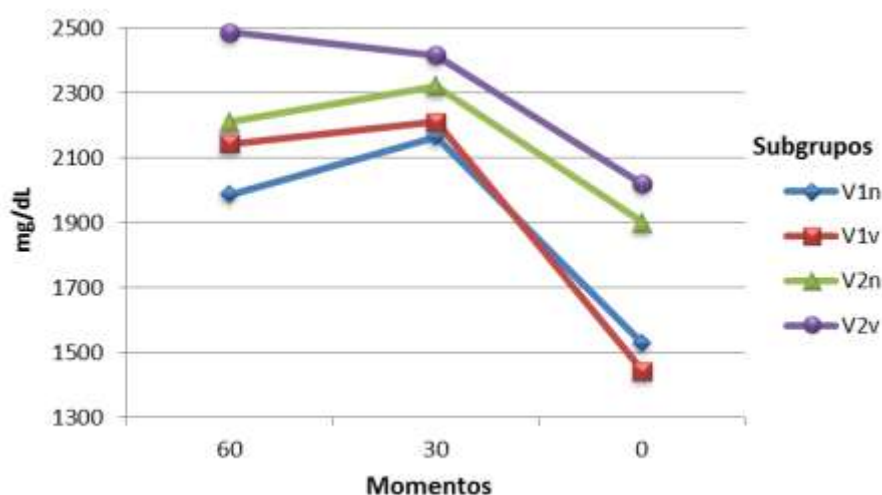


Figura 6. Teor sérico de **imunoglobulina G** (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

4.1.1.7 Haptoglobina pela técnica de SDS-PAGE

Não foi constatada diferença significativa entre grupos quanto ao teor sérico de haptoglobina (Tabela 7) em nenhum dos momentos avaliados.

Entre momentos, notou-se aumento significativo do teor dessa proteína entre os 60 dias pré-parto e o dia do parto apenas no subgrupo V2v, no entanto, nos demais subgrupos, também foi constatado aumento do teor dessa PFA, mesmo que sem diferença estatística, entre 30 dias pré-parto e o dia do parto.

Tabela 7. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **haptoglobina** (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
60	15,7±7,25 ^{Aa}	19,0±9,93 ^{Aa}	22,1±18,9 ^{Aa}	22,2±8,90 ^{Ab}
30	18,6±10,9 ^{Aa}	16,5±3,63 ^{Aa}	23,0±17,0 ^{Aa}	21,0±9,80 ^{Ab}
0	21,9±12,3 ^{Aa}	18,9±4,79 ^{Aa}	29,8±18,2 ^{Aa}	31,1±14,0 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

4.1.1.8 α_1 -glicoproteína ácida pela técnica de SDS-PAGE

O teor sérico de α_1 -glicoproteína ácida (Tabela 8) não diferiu significativamente entre grupos aos 30 dias pré-parto. Nos demais momentos, verificou-se maior concentração dessa PFA no soro sanguíneo das vacas do subgrupo V2v, quando comparado ao subgrupo V1v.

Não foi constatada diferença significativa entre momentos.

Tabela 8. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **α_1 -glicoproteína ácida** (mg/dL) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
60	8,29±5,93 ^{Ba}	6,00±3,29 ^{Ba}	10,3±5,75 ^{ABa}	14,3±7,23 ^{Aa}
30	7,47±4,58 ^{Aa}	7,13±2,87 ^{Aa}	11,5±8,40 ^{Aa}	12,6±3,75 ^{Aa}
0	6,41±2,81 ^{Ba}	6,36±2,68 ^{Ba}	10,5±5,36 ^{ABa}	12,1±6,51 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

4.1.1.9 Avaliação dos títulos de imunoglobulina G total anti-rotavírus pela técnica de EIE indireto

Antes da administração da primeira dose de vacina aos 60 dias pré-parto, verificou-se que as vacas pluríparas de ambos os grupos já apresentavam altos títulos de IgG específica anti-BRV, quando comparadas às vacas primíparas (Tabela 9 e Figura 7). Aos 30 dias pré-parto, notou-se maior título de IgG específica anti-BRV no subgrupo V1v, quando comparado aos subgrupos V1n e V2v, bem como maior título de IgG nas vacas do subgrupo V2v, quando comparadas aos animais do subgrupo V2n. No dia do parto, não foi verificada diferença significativa entre o grupo V1 e o subgrupo V2v, enquanto as vacas do subgrupo V2n apresentaram títulos baixos de IgG anti-rotavírus.

Entre momentos, constatou-se que apenas os animais do grupo V1 apresentaram aumento significativo dos títulos de IgG aos 30 dias pré-parto, enquanto no dia do parto houve diminuição desse parâmetro nas vacas pluríparas de ambos os grupos. Nos animais do subgrupo V2n não foi verificada diferença significativa entre os três momentos avaliados.

Tabela 9. Média e desvio-padrão dos títulos séricos de **imunoglobulina G específica anti-rotavírus** (valor A/P) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
60	0,48±0,39 ^{Cb}	1,23±0,63 ^{Bc}	0,73±0,38 ^{BCa}	1,82±0,46 ^{Aa}
30	1,47±0,37 ^{Ba}	2,25±0,37 ^{Aa}	0,86±0,60 ^{Ca}	1,71±0,49 ^{Bab}
0	1,21±0,56 ^{Aa}	1,69±0,45 ^{Ab}	0,66±0,58 ^{Ba}	1,44±0,57 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

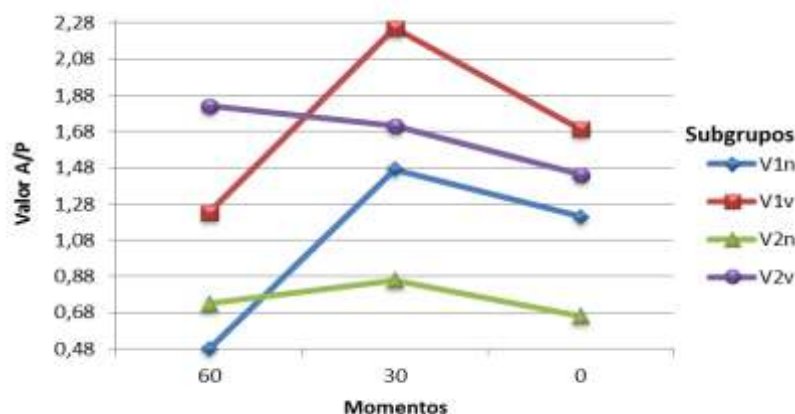


Figura 7. Títulos séricos de **imunoglobulina G específica anti-rotavírus** (valor A/P) de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), antes da vacinação de 60 dias pré-parto, aos 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

4.1.2 Avaliação do soro lácteo

4.1.2.1 Gamaglutamiltransferase

A atividade de gamaglutamiltransferase (GGT) no soro lácteo (Tabela 10) diferiu significativamente entre subgrupos no dia do parto, quando foi maior nas vacas primíparas, quando comparadas às vacas pluríparas, e maior nas vacas vacinadas, quando comparadas às vacas não vacinadas. No momento 1, constatou-se maior atividade nos animais dos subgrupos V1v e V2n, quando comparados ao subgrupo V2v.

Entre momentos, verificou-se que a maior atividade de GGT ocorreu no dia do parto (momento 0), seguida por redução no momento 1 em ambos os grupos.

Tabela 10. Média e desvio-padrão da atividade de **gamaglutamiltransferase** (U/L) no soro lácteo de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v) imediatamente após o parto (0) e com um dia de lactação.

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
0	42.461±15.214 ^{Aa}	29.743±10.891 ^{Ba}	33.853±11.067 ^{Ba}	22.571±6.461 ^{Ca}
1	29.390±12.673 ^{Ab}	23.430±8.905 ^{Aa}	23.684±6.978 ^{Ab}	14.222±7.365 ^{Bb}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.1.2.2 Proteína total

Constatou-se que o teor de proteína total no soro lácteo (Tabela 11) foi maior no subgrupo V1v, quando comparado ao subgrupo V2v, e menor no subgrupo V2n, quando comparado aos subgrupos V1n e V2v no dia do parto. No momento 1, o teor de proteína total foi maior no subgrupo V1v quando comparado aos subgrupos V1n e V2v.

Entre momentos, verificou-se a maior concentração de proteína total no dia do parto (momento 0) em ambos os grupos, seguido por diminuição no momento 1.

Tabela 11. Média e desvio-padrão da concentração de **proteína total** (g/dL) no soro lácteo de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), imediatamente após o parto (0) e com um dia de lactação.

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
0	21,6±4,86 ^{ABa}	24,4±4,57 ^{Aa}	14,3±3,63 ^{Ca}	19,3±5,87 ^{Ba}
1	11,0±7,65 ^{Bb}	18,1±9,09 ^{Ab}	8,42±3,14 ^{Bb}	10,4±6,19 ^{Bb}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

4.1.2.3 Imunoglobulina A (IgA) pela técnica de SDS-PAGE

Verificou-se diferença significativa entre subgrupos quanto ao teor de IgA no soro lácteo no dia do parto (Tabela 12), quando a concentração dessa imunoglobulina foi maior no subgrupo V1v quando comparado aos subgrupos V1n e V2v. Não foi constatada diferença significativa entre os subgrupos do grupo V2.

Entre momentos, à exceção do subgrupo V2n, a média do teor de IgA foi maior no dia do parto, quando comparada ao momento 1.

Tabela 12. Média e desvio-padrão da concentração de **imunoglobulina A** (mg/dL) no soro lácteo de vacas da raça Holandesa vacinadas (Grupo V1) e não vacinadas (Grupo V2) contra BRV, primíparas (Subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (Subgrupos V1v e V2v), imediatamente após o parto (0) e com um dia de lactação.

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
0	455±151 ^{Ba}	647±244 ^{Aa}	323±80,2 ^{Ba}	447±211 ^{Ba}
1	259±183 ^{Ab}	406±188 ^{Ab}	229±104 ^{Aa}	274±173 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

4.1.2.4 Imunoglobulina G (IgG) pela técnica de SDS-PAGE

Notou-se diferença significativa entre subgrupos quanto ao teor de IgG no soro lácteo em ambos os momentos avaliados (Tabela 13). No dia do parto (momento 0), a concentração dessa imunoglobulina foi maior no subgrupo V1v, quando comparado ao subgrupo V2v e maior no subgrupo V1n, quando comparado ao subgrupo V2n. Já no momento 1, o maior teor foi constatado também no subgrupo V1v, sem diferença significativa entre os demais subgrupos.

Em ambos os grupos foi constatada diminuição significativa da concentração de IgG entre o dia do parto e o momento 1.

Tabela 13. Média e desvio-padrão da concentração de **imunoglobulina G** (mg/dL) no soro lácteo de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), imediatamente após o parto (0) e com um dia de lactação.

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
0	14.375±2.803 ^{ABa}	17.709±4.027 ^{Aa}	9.539±2.233 ^{Ca}	11.612±3.992 ^{BCa}
1	7.501±6.053 ^{Bb}	12.261±6.532 ^{Ab}	5.621±2.262 ^{Bb}	7.068±4.912 ^{Bb}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

4.1.2.5 Avaliação dos títulos de imunoglobulina G total anti-rotavírus pela técnica de EIE indireto

Constatou-se diferença significativa entre subgrupos nos dois momentos avaliados: no dia do parto (momento 0), o título de IgG específica anti-rotavírus foi maior no subgrupo V1v quando comparado ao subgrupo V2v, maior no subgrupo V1n quando comparado ao subgrupo V2n, e maior no subgrupo V2v quando comparado ao subgrupo V2n (Tabela 14). No momento 1, verificou-se que, em ambos os grupos, as vacas pluríparas apresentaram maior título de IgG específica anti-BRV quando comparadas às vacas primíparas. As vacas dos subgrupos V1n e V1v apresentaram títulos de IgG anti-rotavírus significativamente maiores que as vacas dos subgrupos V2n e V2v, respectivamente.

Apenas o subgrupo V1v não apresentou diferença significativa entre momentos, enquanto nos demais subgrupos, verificou-se diminuição significativa dos títulos de IgG anti-BRV no momento 1, quando comparado ao momento 0.

Tabela 14. Média e desvio-padrão dos **títulos de imunoglobulina G** anti-rotavírus (valor A/P) no soro lácteo de vacas da raça Holandesa vacinadas (grupo V1) e não vacinadas (grupo V2) contra BRV, primíparas (subgrupos V1n e V2n) e pluríparas (subgrupos V1v e V2v), imediatamente após o parto (0) e com um dia de lactação.

Momentos (dias)	Grupo V1		Grupo V2	
	V1n	V1v	V2n	V2v
0	2,61±0,73 ^{ABa}	3,20±0,60 ^{Aa}	1,03±0,83 ^{Ca}	2,02±0,94 ^{Ba}
1	1,75±1,24 ^{Bb}	3,08±0,70 ^{Aa}	0,59±0,48 ^{Cb}	1,44±1,04 ^{Bb}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os títulos de IgG anti-BRV no soro colostrado (momento 0) dos animais correlacionaram-se de forma positiva e significativa com os títulos de IgG verificados no soro sanguíneo das vacas aos 30 dias pré-parto ($r = 0,77$; $P < 0,0001$) e com os teores de IgG total verificados por meio da técnica de SDS-PAGE no soro lácteo das vacas no dia do parto ($r = 0,57$; $P < 0,0001$).

4.2 Experimento 2:

Embora para alguns dos parâmetros analisados as diferenças verificadas entre os grupos não possam ser atribuídas ao tratamento (realização ou não de imunização contra BRV), considerou-se interessante manter as comparações entre os grupos para que, ao analisar os momentos de manifestação de diarreia, fosse possível diferenciar alterações decorrentes da enfermidade daquelas alterações fisiológicas inerentes ao momento da coleta (influenciadas pela idade dos animais).

Os resultados obtidos são mostrados nas Tabelas 15 a 30 e nas Figuras 8 a 21.

4.2.1 Idade de manifestação de diarreia

Verificou-se que a média de idade de início da manifestação de diarreia foi maior no grupo B1 (10,3 dias e 11 dias nos subgrupos B1n e B1v, respectivamente), quando comparado ao grupo B2 (9,7 dias no subgrupo B2n e 8,6 dias no subgrupo B2v).

4.2.2 Leucograma

4.2.2.1 Contagem de leucócitos

A média da contagem de leucócitos (Tabela 15 e Figura 8) diferiu significativamente entre grupos apenas no momento 1, quando as maiores médias foram notadas no subgrupo B2v, com valores menores no subgrupo B2n.

Entre momentos, em todos os subgrupos, exceto no B1n – no qual o aumento da contagem de leucócitos foi verificado no momento 2 - notou-se aumento da contagem de leucócitos no momento 1, quando comparado ao dia do nascimento. Embora não tenha sido verificada diferença significativa, notou-se diminuição na contagem de leucócitos em ambos os grupos, do nascimento aos 21 dias de vida. Foi interessante notar que, aos 30 dias de idade, verificou-se aumento da contagem dessas células, mais expressivo nos subgrupos B1v e B2v e comparável aos valores constatados com 1 dia de idade. As menores contagens de leucócitos foram verificadas aos 15 e 21 dias nos subgrupos B1v e B2v, e aos 2, 15 e 21 dias de idade no subgrupo B2n.

Tabela 15. Média e desvio-padrão da contagem de **leucócitos** (μL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	9.042±2.370 ^{Aa}	9.875±3.146 ^{Aab}	9.292±2.959 ^{Aab}	10.058±2.388 ^{Aab}
1	8.683±2.256 ^{Ba}	11.208±3.440 ^{ABa}	11.058±4.461 ^{ABa}	12.300±3.037 ^{Aa}
2	10.267±5.272 ^{ABa}	8.467±3.015 ^{ABab}	7.575±2.999 ^{Bb}	11.250±4.236 ^{Aab}
7	8.783±4.287 ^{Aa}	8.767±3.384 ^{Aab}	8.052±2.116 ^{Aab}	9.708±2.186 ^{Aab}
15	8.450±2.828 ^{Aa}	7.483±3.210 ^{Ab}	7.750±3.049 ^{Ab}	8.358±3.690 ^{Ab}
21	7.658±2.314 ^{Aa}	7.967±2.360 ^{Ab}	7.308±2.475 ^{Ab}	8.142±2.904 ^{Ab}
30	8.608±2.743 ^{Aa}	11.308±4.342 ^{Aa}	8.958±2.570 ^{Aab}	11.592±4.455 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

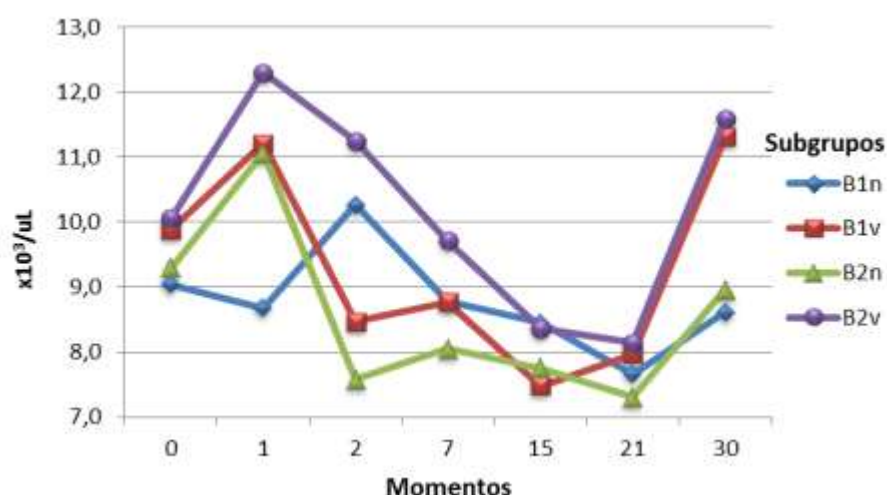


Figura 8. Contagem de **leucócitos** ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerras da raça Holandesa, filhas de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.2.2 Neutrófilos bastonetes

A contagem de neutrófilos bastonetes avaliada no período compreendido entre antes da ingestão de colostro (momento 0) e com 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento, variou de 10 a 181 células/ μL no subgrupo B1n, de 0 a 186 células/ μL no subgrupo B1v, de 0 a 140 células/ μL no subgrupo B2n e de 0 a 170 células/ μL no subgrupo B2v.

4.2.2.3 Neutrófilos segmentados

A média da contagem de neutrófilos segmentados (Tabela 16 e Figura 9) diferiu significativamente entre grupos apenas com 1 e 2 dias de idade. Com 1 dia de vida, as menores médias foram constatadas no subgrupo B1n, quando comparado aos subgrupos B1v e B2n, enquanto aos 2 dias de idade, as menores médias foram notadas nos subgrupos B2n, quando comparado aos subgrupos B1n e B2v.

Entre momentos, verificou-se maior contagem desse tipo celular com 2 dias de idade no subgrupo B1n e com 1 dia de vida nos demais subgrupos. Seguiu-se diminuição gradativa da contagem de neutrófilos segmentados chegando às menores contagens aos 15 e 21 dias em todos os subgrupos. Nos subgrupos B1v e

B2v, notou-se um novo aumento da contagem de neutrófilos segmentados aos 30 dias de vida.

Tabela 16. Média e desvio-padrão da contagem de **neutrófilos segmentados** (μL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	5.601 \pm 1.730 ^{Aab}	5.787 \pm 2.391 ^{Aab}	5.093 \pm 2.299 ^{Aab}	4.959 \pm 1.840 ^{Abc}
1	5.047 \pm 1.874 ^{Babc}	7.636 \pm 3.303 ^{Aa}	7.329 \pm 3.574 ^{Aa}	7.769 \pm 2.737 ^{Aa}
2	7.079 \pm 5.047 ^{Aa}	5.634 \pm 2.661 ^{ABab}	4.070 \pm 2.463 ^{Bbc}	6.898 \pm 3.466 ^{Aab}
7	4.055 \pm 3.242 ^{Abc}	3.652 \pm 1.697 ^{Abc}	3.074 \pm 1.317 ^{Abc}	3.940 \pm 1.802 ^{Acde}
15	2.819 \pm 1.585 ^{Ac}	2.268 \pm 2.290 ^{Ac}	2.410 \pm 1.440 ^{Ac}	1.960 \pm 863 ^{Ade}
21	2.645 \pm 1.325 ^{Ac}	2.186 \pm 1.667 ^{Ac}	2.298 \pm 1.548 ^{Ac}	1.582 \pm 743 ^{Ae}
30	2.994 \pm 1.734 ^{Ac}	4.393 \pm 2.699 ^{Abc}	2.686 \pm 1.584 ^{Abc}	4.266 \pm 3.252 ^{Ac}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

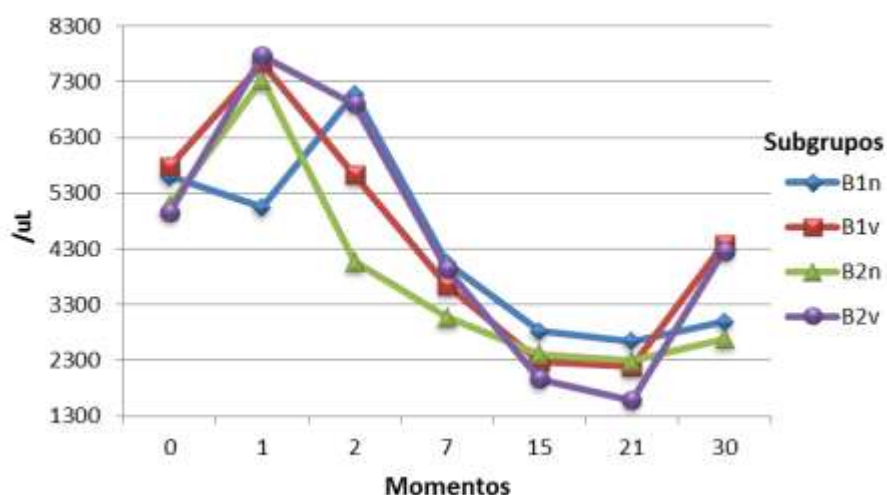


Figura 9. Contagem de **neutrófilos segmentados** (μL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.2.4 Linfócitos

A contagem de linfócitos (Tabela 17 e Figura 10) não diferiu significativamente entre subgrupos em nenhum dos momentos avaliados.

Entre momentos, verificou-se menor contagem aos 2 dias de vida em ambos os grupos, e maior contagem aos 30 dias de idade, também em ambos os grupos.

Tabela 17. Média e desvio-padrão da contagem de **linfócitos** (μL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	3.375 \pm 1.203 ^{Abc}	3.993 \pm 1.191 ^{AcD}	4.002 \pm 1.170 ^{Abc}	4.799 \pm 1.210 ^{AcD}
1	3.469 \pm 842 ^{Abc}	3.345 \pm 865 ^{Ade}	3.405 \pm 1.182 ^{Ac}	4.046 \pm 1.089 ^{Ad}
2	2.954 \pm 1.024 ^{Ac}	2.509 \pm 726 ^{Ae}	3.291 \pm 707 ^{Ac}	3.977 \pm 1.174 ^{Ad}
7	4.434 \pm 1.087 ^{Aab}	5.027 \pm 2.058 ^{Abc}	4.834 \pm 1.111 ^{Aab}	5.549 \pm 1.607 ^{Abc}
15	5.563 \pm 1.566 ^{Aa}	5.055 \pm 1.814 ^{Abc}	5.240 \pm 1.856 ^{Aab}	6.204 \pm 2.894 ^{Aab}
21	4.955 \pm 1.113 ^{Aa}	5.686 \pm 1.679 ^{Aab}	4.902 \pm 1.767 ^{Aab}	6.326 \pm 2.384 ^{Aab}
30	5.500 \pm 1.561 ^{Aa}	6.813 \pm 2.863 ^{Aa}	6.143 \pm 1.306 ^{Aa}	7.078 \pm 2.015 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

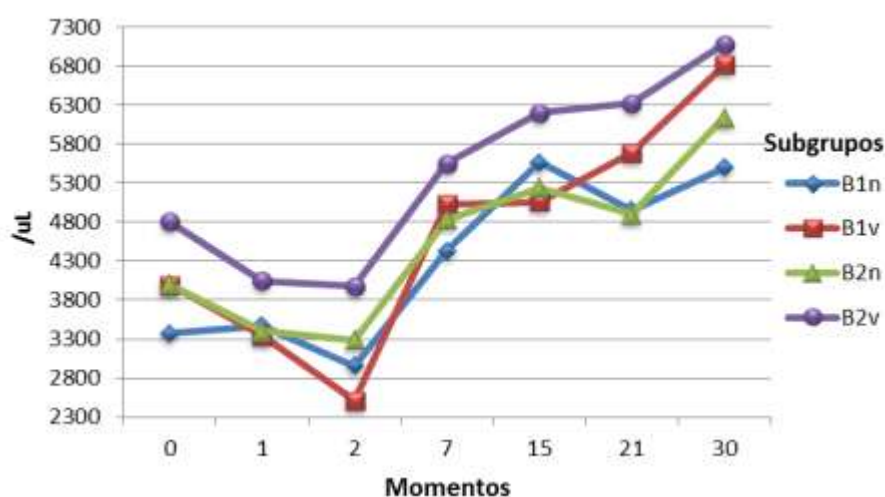


Figura 10. Contagem de **linfócitos** (μL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.2.5 Monócitos

Verificou-se que a contagem de monócitos no período entre antes da ingestão de colostro (momento 0) e com 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento, variou

de 5 a 59 células/ μL no subgrupo B1n, de 23 a 69 células/ μL no subgrupo B1v, de 55 a 124 células/ μL no subgrupo B2n e de 100 a 177 células/ μL no subgrupo B2v.

4.2.2.6 Eosinófilos

A contagem de eosinófilos no período entre antes da ingestão de colostro (momento 0) e com 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento, variou de 18 a 103 células/ μL no subgrupo B1n, de 4 a 89 células/ μL no subgrupo B1v, de 22 a 70 células/ μL no subgrupo B2n e de 63 a 214 células/ μL no subgrupo B2v, antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.2.7 Basófilos

A contagem de basófilos no período entre antes da ingestão de colostro (momento 0) e com 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento, variou de 0 a 8 células/ μL no subgrupo B1n, de 0 a 16 células/ μL no subgrupo B1v e de 0 a 19 células/ μL no subgrupo B2v, antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento. No subgrupo B2n, não foi verificada a presença desse tipo celular em nenhum dos esfregaços sanguíneos avaliados.

4.2.3 Análises Bioquímicas

4.2.3.1 Gamaglutamiltransferase

A média da atividade sérica de gamaglutamiltransferase (GGT) (Tabela 18 e Figura 11) diferiu entre grupos com 1 e 2 dias de idade, quando foi maior nas vacas primíparas (subgrupos B1n e B2n), quando comparadas às vacas pluríparas (subgrupos B1v e B2v).

Entre momentos, verificou-se que os maiores valores médios em ambos os grupos ocorreram após a ingestão do colostro, com 1 dia de idade. O aumento verificado na atividade dessa enzima após a ingestão do colostro, ao compará-la com a atividade verificada antes da ingestão, foi de 130 vezes, 116 vezes e 94 vezes nos subgrupos B1n, B1v e no grupo 2, respectivamente. Após esse aumento, a atividade de GGT sérica diminuiu gradativamente até os 30 dias de idade.

Constatou-se correlação positiva e significativa entre a atividade de GGT no soro sanguíneo dos bezerros às 24 horas de vida e a atividade dessa enzima no soro colostrado das vacas ($r = 0,30$; $p < 0,03$).

Tabela 18. Média e desvio-padrão da atividade sérica de **gamaglutamiltransferase** (U/L) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	21,1±4,77 ^{Ac}	17,2±4,78 ^{Ac}	31,3±21,5 ^{Ad}	21,1±9,86 ^{Ac}
1	2.751±1.019 ^{Aa}	1.997±1.049 ^{Ba}	2.933±1.647 ^{Aa}	1.989±1.280 ^{Ba}
2	1.511±608 ^{Ab}	856±451 ^{Bb}	1.691±940 ^{Ab}	986±759 ^{Bb}
7	538±227 ^{Ac}	293±190 ^{Abc}	649±325 ^{Ac}	437±362 ^{Abc}
15	179±74,5 ^{Ac}	110 ±94,0 ^{Ac}	175±48,9 ^{Ac}	140±88,9 ^{Ac}
21	114±46,1 ^{Ac}	72,1±59,8 ^{Ac}	129±66,2 ^{Ac}	87,0±50,0 ^{Ac}
30	64,4±22,2 ^{Ac}	54,8±46,1 ^{Ac}	67,6±24,9 ^{Ac}	41,7±16,4 ^{Ac}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

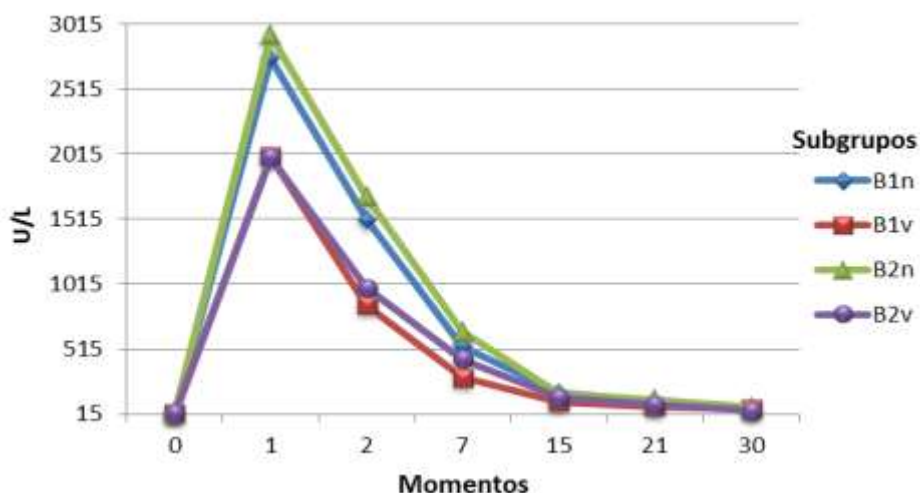


Figura 11. Atividade sérica de **gamaglutamiltransferase** (U/L) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.3.2 Proteína total

A média do teor de proteína total (Tabela 19 e Figura 12) não diferiu entre subgrupos apenas ao nascimento, antes da ingestão do colostro. Constatou-se que o teor de proteína total foi sempre maior nos bezerros filhos de vacas pluríparas que nos bezerros filhos de vacas primíparas (exceto aos 21 e 30 dias de idade, quando não foi verificada diferença entre os subgrupos B1n e B1v), e, ao comparar os grupos vacinado (B1) e não vacinado (B2), a concentração sérica de proteína total sempre se mostrou mais elevada nos animais do grupo B1.

Entre momentos, a menor concentração de proteína total foi verificada ao nascimento, enquanto os maiores teores foram notados após a ingestão do colostro, com 1 e 2 dias de idade, em ambos os grupos. Constatou-se então redução gradual da concentração sérica de proteína total até os 30 dias de vida.

Tabela 19. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **proteína total** (g/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	4,37±0,42 ^{Ac}	4,44±0,51 ^{Ad}	4,04±0,16 ^{Ae}	4,41±0,37 ^{Ad}
1	7,84±0,52 ^{Ba}	8,77±1,46 ^{Aa}	6,79±1,04 ^{Cab}	7,73±0,95 ^{Ba}
2	8,14±0,50 ^{ABa}	8,86±1,38 ^{Aa}	7,22±0,95 ^{Ca}	7,76±0,66 ^{BCa}
7	7,59±0,49 ^{ABa}	8,09±1,21 ^{Ab}	7,15±0,90 ^{Ba}	7,53±0,56 ^{ABa}
15	6,78±0,69 ^{ABb}	7,02±0,99 ^{Ac}	6,26±0,64 ^{Bbc}	6,55±0,67 ^{ABb}
21	6,94±0,31 ^{Ab}	6,86±0,76 ^{Ac}	5,97±0,65 ^{Bcd}	6,21±0,55 ^{ABbc}
30	6,62±0,48 ^{Ab}	6,61±0,54 ^{Ac}	5,68±0,48 ^{Bd}	5,74±0,59 ^{Bc}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

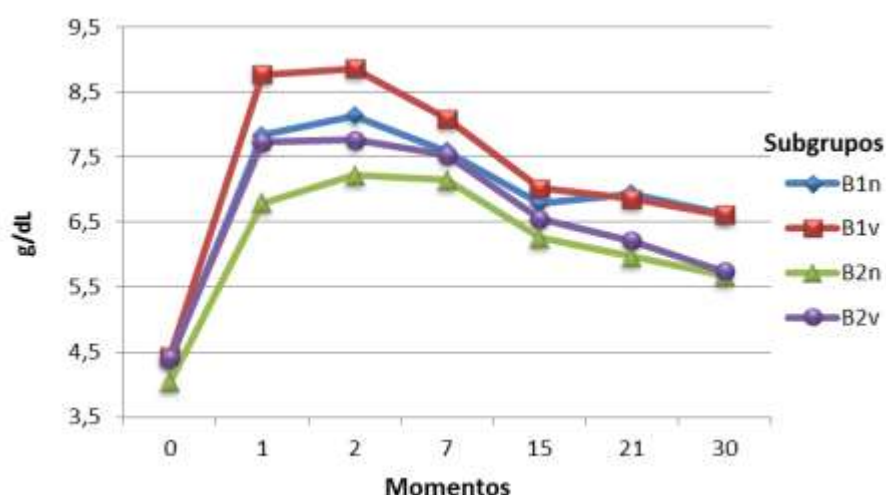


Figura 12. Teor sérico de **proteína total** (g/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.3.3 Globulinas

O teor sérico de globulinas (Tabela 20 e Figura 13) diferiu significativamente entre subgrupos com 1 e 2 dias de idade, sendo sempre maior em bezerros filhos de vacas pluríparas (subgrupos B1v e B2v) que nos filhos de vacas primíparas (subgrupos B1n e B2n), e em bezerros filhos de vacas vacinadas (grupo B1), quando comparados aos filhos de vacas não vacinadas (grupo B2).

Entre momentos, os menores teores de globulinas foram notados ao nascimento em ambos os grupos, enquanto as maiores concentrações séricas foram constatadas com 1 dia de idade nos subgrupos B1v e B2v e aos 2 dias de vida nos subgrupos B1n e B2n. Após esse aumento inicial do teor de globulinas, verificou-se diminuição gradual da concentração dessa fração proteica até os 30 dias de idade, quando foram notados os menores teores.

Constatou-se correlação positiva e significativa entre o teor sérico de proteínas totais e de globulinas nos bezerros ($r = 0,99$; $p < 0,0001$), bem como entre o teor de globulinas do soro sanguíneo dos bezerros às 24 horas de vida e a concentração de proteína total no soro lácteo das vacas no dia do parto (momento 0; $r = 0,62$; $p < 0,0001$).

Tabela 20. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **globulinas** (g/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	2,20±0,24 ^{Ad}	2,30±0,42 ^{Ae}	2,12±0,16 ^{Ad}	2,33±0,35 ^{Ae}
1	5,91±0,59 ^{Ba}	6,92±1,55 ^{Aa}	5,08±1,13 ^{Ca}	5,98±0,93 ^{Ba}
2	6,05±0,55 ^{Ba}	6,89±1,48 ^{Aa}	5,37±1,05 ^{Ba}	5,90±0,71 ^{Bab}
7	5,23±0,50 ^{ABb}	5,86±1,29 ^{Ab}	5,00±0,95 ^{Ba}	5,34±0,57 ^{ABb}
15	4,19±0,65 ^{Ac}	4,60±0,98 ^{Ac}	4,01±0,63 ^{Ab}	4,29±0,53 ^{Ac}
21	4,06±0,35 ^{Ac}	4,24±0,73 ^{AcD}	3,67±0,57 ^{Abc}	3,83±0,40 ^{AcD}
30	3,68±0,41 ^{Ac}	3,92±0,58 ^{Ad}	3,41±0,42 ^{Ac}	3,47±0,37 ^{Ad}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

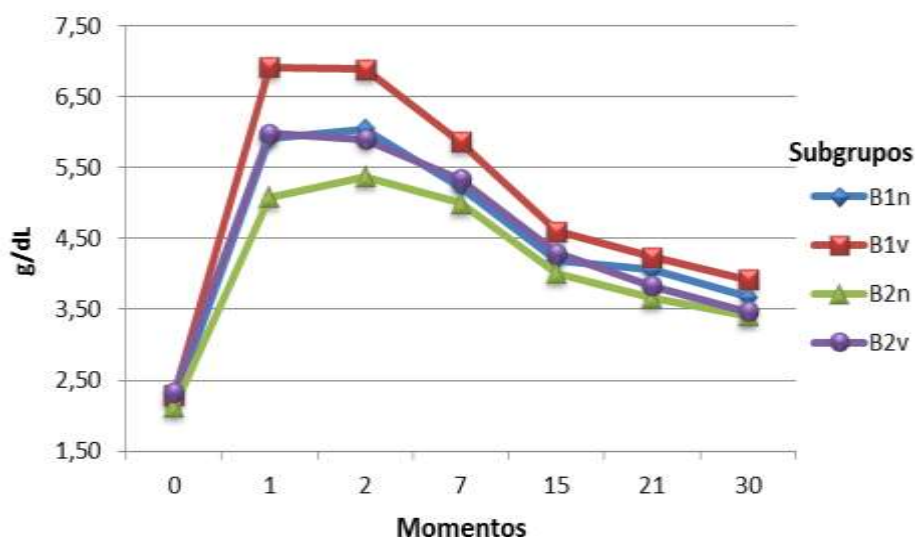


Figura 13. Teor sérico de **globulinas** (g/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.3.4 Cálcio ionizado

O teor sérico de cálcio ionizado (Tabela 21 e Figura 14) deferiu entre subgrupos com 0, 7, 15 e 21 de idade. De maneira geral, os valores constatados foram menores no subgrupo B1n quando comparado ao subgrupo B2n, e, aos 21

dias de vida, foram também menores no subgrupo B1v, quando comparado ao subgrupo B2v.

Não foi verificada diferença significativa entre momentos no subgrupo B2n. Constatou-se maior teor sérico de cálcio ionizado aos 2 dias de idade no grupo B1 e com 1 dia de vida no subgrupo B2v, e menores concentrações dos 7 aos 21 dias de vida nos subgrupos B1n, aos 21 dias de idade no subgrupo B1v e dos 7 aos 30 dias de idade no subgrupo B2v.

Tabela 21. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **cálcio ionizado** (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	0,80±0,11 ^{Bab}	0,84±0,10 ^{ABb}	0,97±0,14 ^{Aa}	0,91±0,15 ^{ABab}
1	0,81±0,11 ^{Bab}	0,87±0,15 ^{ABab}	0,93±0,16 ^{ABa}	0,99±0,14 ^{Aa}
2	0,92±0,10 ^{Aa}	0,96±0,14 ^{Aa}	0,97±0,22 ^{Aa}	0,88±0,20 ^{Aab}
7	0,75±0,09 ^{Bb}	0,84±0,08 ^{ABb}	0,98±0,13 ^{Aa}	0,84±0,13 ^{ABb}
15	0,79±0,11 ^{Bb}	0,77±0,13 ^{Bbc}	0,95±0,12 ^{Aa}	0,86±0,12 ^{ABb}
21	0,73±0,12 ^{Bb}	0,64±0,11 ^{Bd}	0,94±0,14 ^{Aa}	0,88±0,11 ^{Aab}
30	0,79±0,12 ^{ABb}	0,71±0,09 ^{Bcd}	0,92±0,19 ^{Aa}	0,84±0,13 ^{ABb}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

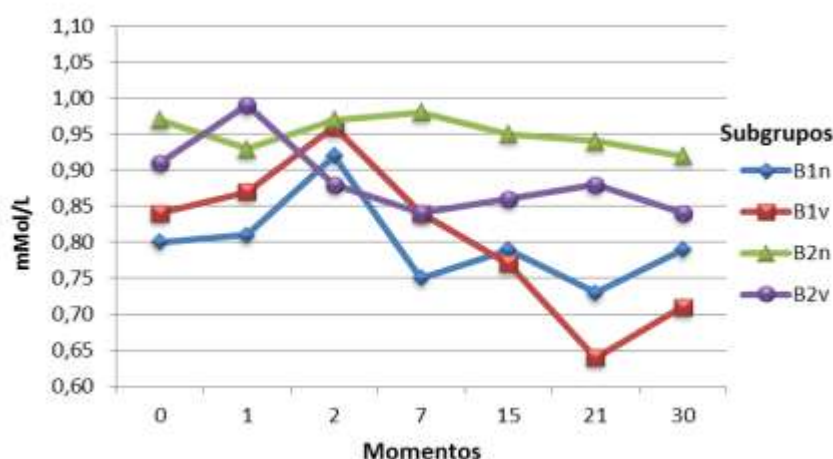


Figura 14. Teor sérico de **cálcio ionizado** (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.3.5 Cloretos

O teor sérico de cloretos variou de $94,7 \pm 8,49$ mMol/L a $109 \pm 5,50$ mMol/L nos quatro subgrupos.

4.2.3.6 Sódio

O teor sérico de sódio variou de $130 \pm 7,96$ mMol/L a $145 \pm 4,89$ mMol/L em ambos os grupos.

4.2.3.7 Potássio

O teor sérico de potássio variou de $4,88 \pm 0,63$ mMol/L a $5,67 \pm 0,37$ mMol/L nos quatro subgrupos.

4.2.3.8 Concentrações séricas de ureia e creatinina

Os teores séricos de ureia variaram de $17,4 \pm 5,58$ mg/dL a $40,2 \pm 12,8$ mg/dL em ambos os grupos.

Os teores séricos de creatinina variaram de $2,64 \pm 0,67$ mg/dL a $3,28 \pm 1,49$ mg/dL ao nascimento, a $0,84 \pm 0,24$ mg/dL a $0,92 \pm 0,22$ mg/dL aos 30 dias de idade, nos quatro subgrupos.

4.2.3.9 Imunoglobulina A (IgA) pela técnica de SDS-PAGE

Quanto ao teor sérico de IgA, exceto pelo dia do nascimento, constatou-se diferença significativa entre subgrupos em todos os momentos avaliados (Tabela 22 e Figura 15). Com 1 e 2 dias de vida, as concentrações séricas de IgA foram maiores no subgrupo B1v, quando comparado ao subgrupo B2v; enquanto que dos 7 aos 30 dias de idade, os teores de IgA foram sempre maiores no grupo B1 que no grupo B2. Aos 15 dias de vida, verificou-se também que o teor de IgA do subgrupo B1v foi significativamente maior que aquele do subgrupo B1n.

Entre momentos, constatou-se que o teor dessa imunoglobulina foi menor ao nascimento e aumentou gradativamente, a partir da ingestão do colostro, até os 30 dias de vida.

Tabela 22. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **imunoglobulina A** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	88,8±12,4 ^{Ad}	91,9±27,8 ^{Ad}	78,1±25,8 ^{Ad}	86,1±26,0 ^{Ad}
1	200±29,1 ^{ABc}	248±64,4 ^{Ac}	141±45,6 ^{Bc}	170±39,4 ^{Bc}
2	215±48,6 ^{ABc}	272±80,7 ^{Ac}	175±74,3 ^{Bbc}	196±43,8 ^{Bbc}
7	298±48,6 ^{ABb}	336±74,9 ^{Ab}	194±53,0 ^{Cab}	251±72,9 ^{BCa}
15	317±39,6 ^{Bab}	382±67,4 ^{Aab}	240±66,1 ^{Ca}	274±81,9 ^{BCa}
21	349±40,5 ^{Aa}	379±59,8 ^{Aab}	232±57,2 ^{Ba}	274±81,5 ^{Ba}
30	363±45,4 ^{Aa}	392±53,5 ^{Aa}	234±82,1 ^{Ba}	233±46,4 ^{Bb}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

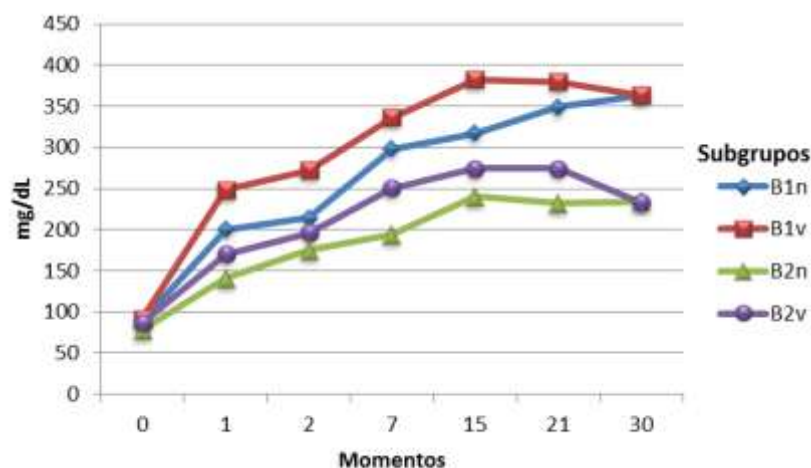


Figura 15. Teor sérico de **imunoglobulina A** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.3.10 Ceruloplasmina pela técnica de SDS-PAGE

Constatou-se diferença significativa quanto aos teores séricos de ceruloplasmina entre subgrupos apenas aos 21 e 30 dias de vida (Tabela 23 e Figura 16), quando os animais do grupo B2 apresentaram maiores concentrações dessa proteína, quando comparados aos bezerros do grupo B1.

Entre momentos, verificou-se a menor concentração de ceruloplasmina nos dois primeiros dias de vida em ambos os grupos, e as maiores aos 15 dias de idade no grupo B1 e aos 30 dias no grupo B2.

Tabela 23. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **ceruloplasmina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	30,6±4,43 ^{Ac}	32,7±6,61 ^{Abcd}	29,1±4,73 ^{Ad}	37,8±11,5 ^{Abc}
1	30,0±7,32 ^{Ac}	26,8±7,86 ^{Ad}	24,8±5,85 ^{Ad}	28,0±9,81 ^{Ac}
2	32,9±8,52 ^{Abc}	32,0±12,5 ^{Acnd}	32,0±7,15 ^{Ad}	37,0±11,9 ^{Abc}
7	39,5±13,7 ^{Aabc}	34,0±14,3 ^{Abcd}	36,1±8,52 ^{Acnd}	37,0±14,3 ^{Abc}
15	44,6±14,1 ^{Aa}	46,4±16,0 ^{Aa}	47,1±8,14 ^{Abc}	45,0±16,3 ^{Ab}
21	36,7±8,43 ^{Cabc}	39,3±12,9 ^{BCabc}	51,1±11,6 ^{ABab}	57,0±21,8 ^{Aa}
30	42,6±15,2 ^{Bab}	44,2±16,2 ^{Bab}	59,0±10,76 ^{Aa}	57,0±13,3 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

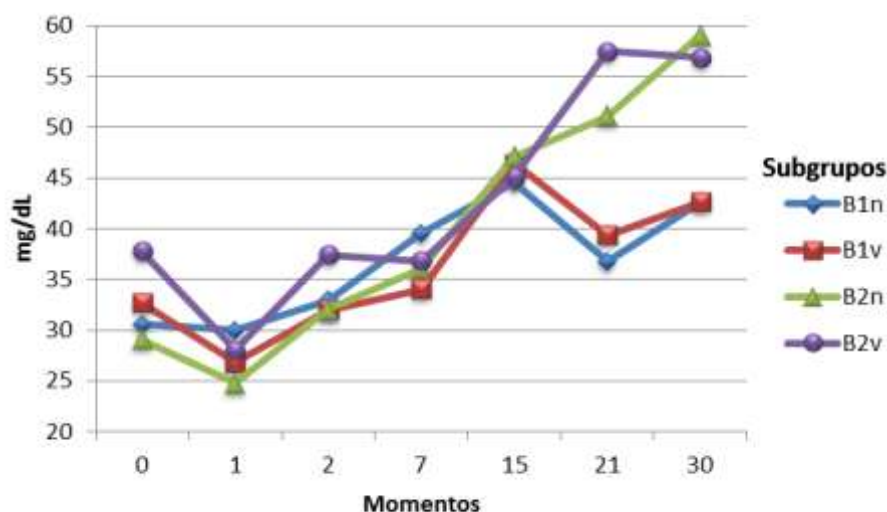


Figura 16. Teor sérico de **ceruloplasmina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.3.11 Transferrina pela técnica de SDS-PAGE

O teor sérico de transferrina (Tabela 24 e Figura 17) diferiu significativamente entre subgrupos apenas aos 2 e 7 dias de idade, quando a maior concentração dessa PFA foi constatada no subgrupo B2v, quando comparado ao subgrupo B1v.

Entre momentos, notou-se o maior teor sérico de transferrina aos 7 dias de idade e o menor ao nascimento, em ambos os grupos.

Tabela 24. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **transferrina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	295±73,0 ^{Ad}	268±56,6 ^{Ac}	268±64,8 ^{Ac}	344±108 ^{Ac}
1	353±135 ^{Abcd}	376±81,2 ^{Aab}	381±120 ^{Aab}	436±85,1 ^{Ab}
2	437±109 ^{ABab}	348±101 ^{Babc}	445±110 ^{ABa}	458±72,6 ^{Aab}
7	462±98,9 ^{ABa}	413±127 ^{Ba}	447±151 ^{ABa}	539±63,5 ^{Aa}
15	410±67,9 ^{Aab}	338±101 ^{Aabc}	346±103 ^{Abc}	395±75,5 ^{Abc}
21	397±65,0 ^{Aabc}	360±51,5 ^{Aab}	306±73,9 ^{Abc}	339±55,3 ^{Ac}
30	308±98,6 ^{Ac}	316±86,8 ^{Abc}	283±88,6 ^{Ac}	328±58,7 ^{Ac}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

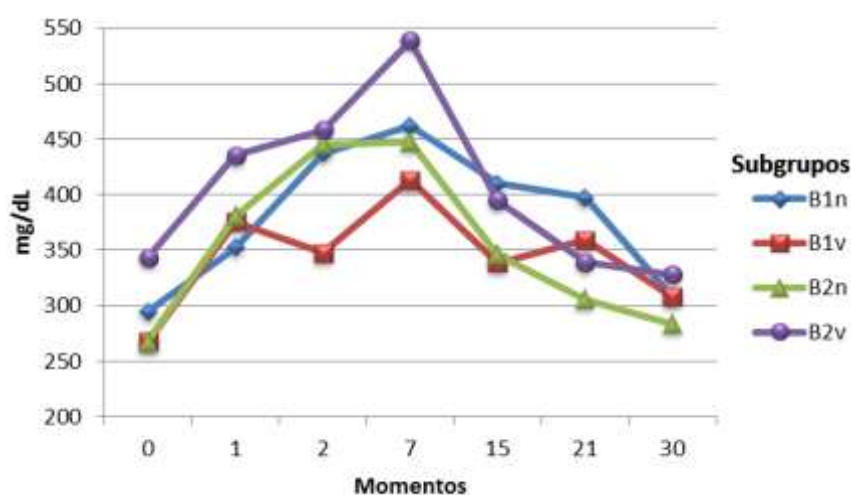


Figura 17. Teor sérico de **transferrina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.3.12 Imunoglobulina G (IgG) pela técnica de SDS-PAGE

Ao nascimento e a partir dos 7 dias de vida, não foi constatada diferença significativa quanto ao teor de IgG entre subgrupos (Tabela 25 e Figura 18). No entanto, após a ingestão do colostro, o teor dessa imunoglobulina permaneceu maior nos bezerros do subgrupo B1v, quando comparado aos subgrupos B1n e B2v.

Entre momentos, notou-se menor concentração de IgG ao nascimento, aumento significativo dos seus teores após a ingestão do colostro, seguido por diminuição gradativa das suas concentrações até os 30 dias de vida em ambos os grupos.

Verificou-se correlação significativa entre os títulos de IgG específica anti-BRV no soro colostrado das vacas e o teor de IgG aferido pela técnica de SDS-PAGE no soro sanguíneo dos bezerros após a ingestão do colostro (momento 1) ($r = 0,44$; $P < 0,0019$).

Tabela 25. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **imunoglobulina G** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	506±177 ^{Ae}	555±189 ^{Ae}	582±97,0 ^{Ae}	610±94,0 ^{Ae}
1	3.207±484 ^{Ba}	4.023±945 ^{Aa}	2.748±679 ^{Ba}	3.197±643 ^{Ba}
2	3.254±444 ^{Ba}	3.876±894 ^{Aa}	2.920±561 ^{Ba}	3.158±551 ^{Ba}
7	2.541±451 ^{ABb}	3.022±832 ^{Ab}	2.204±546 ^{Bb}	2.541±415 ^{ABb}
15	1.736±349 ^{Ac}	2.057±560 ^{Ac}	1.617±289 ^{Ac}	1.745±344 ^{Ac}
21	1.510±297 ^{Acd}	1.709±422 ^{Acd}	1.403±262 ^{Acd}	1.421±258 ^{Acd}
30	1.277±240 ^{Ad}	1.489±296 ^{Ad}	1.237±195 ^{Ad}	1.188±196 ^{Ad}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

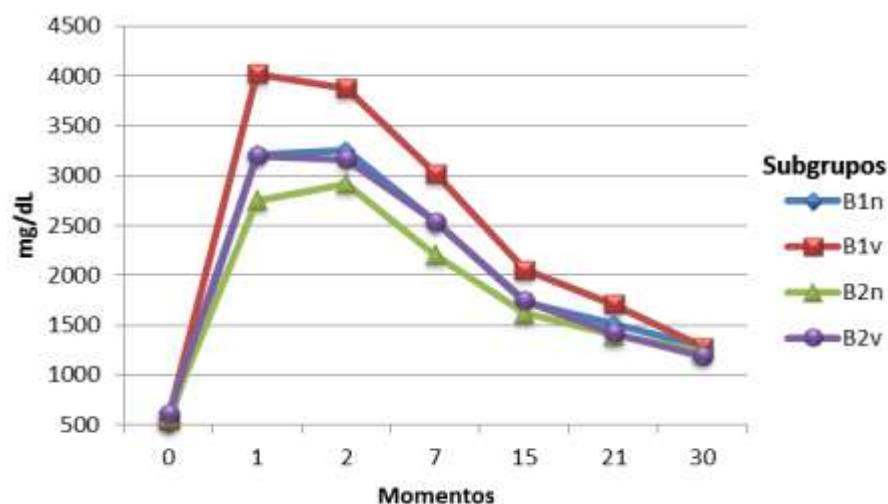


Figura 18. Teor sérico de **imunoglobulina G** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.3.13 Haptoglobina pela técnica de SDS-PAGE

Ao nascimento, não foi verificada diferença significativa entre grupos quanto ao teor sérico de haptoglobina (Tabela 26 e Figura 19). Constatou-se diferença significativa entre subgrupos a partir de 1 dia de vida, momento no qual foram verificadas menores concentrações no subgrupo B1v, quando comparado ao subgrupo B2v. Nos demais momentos, notou-se diferença significativa entre bezerros de vacas primíparas e pluríparas do grupo B1, sendo o teor de haptoglobina do subgrupo B1v significativamente maior que o subgrupo B1n.

Entre momentos, verificou-se que a menor concentração dessa PFA ocorreu ao nascimento, com aumento gradativo até os 15 dias de vida em ambos os grupos. Os maiores teores de haptoglobina foram constatados aos 15 dias de idade no grupo B1 e no subgrupo B2v e aos 7 dias de vida no subgrupo B2n.

Tabela 26. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **haptoglobina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	5,71±2,60 ^{Ab}	7,41±2,24 ^{Ad}	8,05±1,99 ^{Ad}	9,42±3,07 ^{Ab}
1	9,85±4,99 ^{Ba}	11,3±4,95 ^{Bcd}	13,8±3,82 ^{ABc}	16,8±4,08 ^{Aa}
2	10,8±6,54 ^{Ba}	15,8±6,00 ^{Aab}	14,8±2,24 ^{ABbc}	17,6±4,74 ^{Aa}
7	12,3±4,84 ^{Ba}	17,1±5,91 ^{Aab}	19,3±2,83 ^{Aa}	19,1±3,98 ^{Aa}
15	13,5±5,05 ^{Ba}	19,6±5,50 ^{Aa}	17,9±5,49 ^{ABabc}	20,5±3,98 ^{Aa}
21	11,2±3,07 ^{Ba}	14,2±3,37 ^{ABbc}	15,7±3,87 ^{ABabc}	18,5±2,33 ^{Aa}
30	9,60±4,43 ^{Bab}	15,3±4,89 ^{Abc}	18,7±5,01 ^{Aab}	17,7±4,12 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

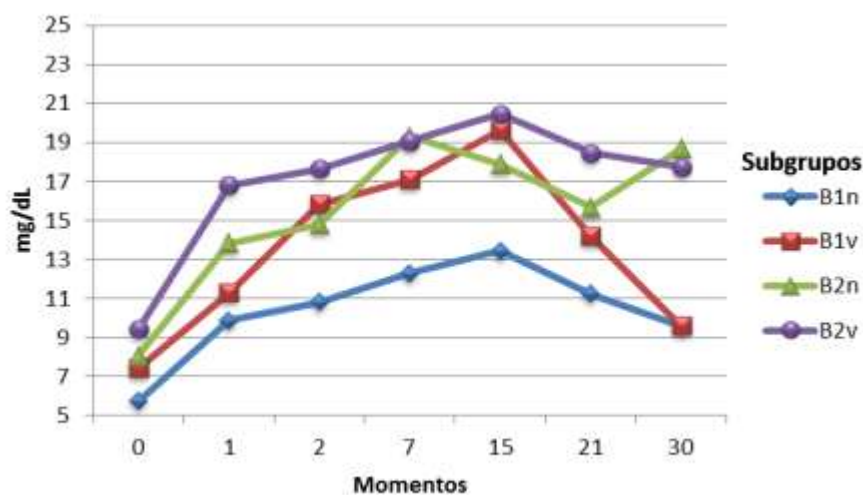


Figura 19. Teor sérico de **haptoglobina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.3.14 α_1 -glicoproteína ácida pela técnica de SDS-PAGE

Não foi notada diferença significativa entre subgrupos quanto ao teor de α_1 -glicoproteína ácida apenas ao nascimento (Tabela 27 e Figura 20). De maneira geral, verificou-se que o teor dessa PFA foi maior nos bezerros do grupo B2, quando comparados aos animais do grupo B1. Com 2 e 21 dias de vida, constatou-se que o

teor de α_1 -glicoproteína ácida foi significativamente maior no subgrupo B1n, quando comparado ao subgrupo B1v.

À exceção do subgrupo B1v, no qual não foi verificada diferença significativa entre momentos, notou-se menor teor de α_1 -glicoproteína ácida ao nascimento, sendo que no grupo B2 não houve diferença significativa entre os momentos a partir do momento 1, e no subgrupo B1n, o maior teor dessa PFA foi notado aos 2 dias de idade.

Tabela 27. Média e desvio-padrão da concentração sérica de α_1 -glicoproteína ácida (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	3,90±1,67 ^{Ad}	3,41±1,68 ^{Aa}	6,45±2,59 ^{Ab}	4,98±1,50 ^{Ab}
1	6,73±2,92 ^{Ccd}	8,83±3,85 ^{BCa}	16,1±4,96 ^{Aa}	13,8±2,91 ^{ABa}
2	17,3±22,0 ^{Aa}	7,99±5,15 ^{Ba}	19,3±4,52 ^{Aa}	14,2±4,07 ^{Aa}
7	9,10±4,58 ^{Bbcd}	8,51±4,09 ^{Ba}	16,0±3,12 ^{Aa}	12,7±3,35 ^{ABa}
15	10,9±3,23 ^{Babc}	8,79±3,76 ^{Ba}	19,0±4,10 ^{Aa}	18,9±4,85 ^{Aa}
21	14,8±4,40 ^{Aab}	8,67±5,18 ^{Ba}	18,4±3,12 ^{Aa}	18,5±3,86 ^{Aa}
30	12,3±3,47 ^{BCabc}	9,79±4,64 ^{Ca}	21,5±4,36 ^{Aa}	15,8±5,03 ^{ABa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

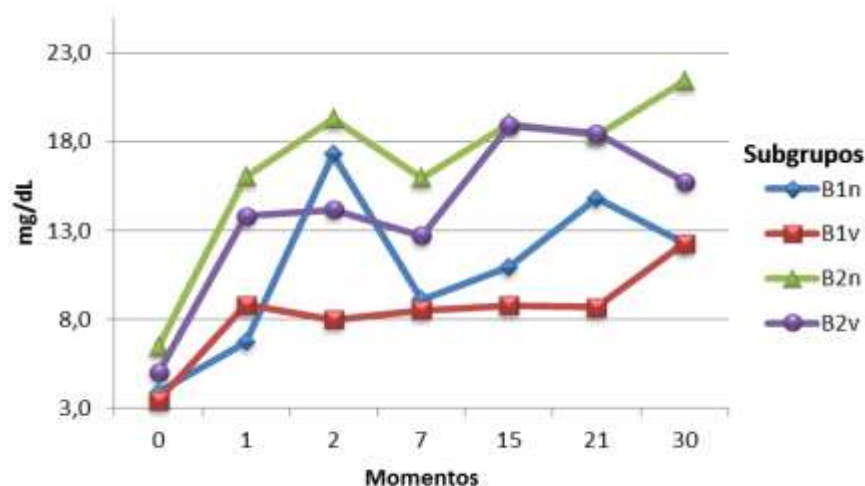


Figura 20. Teor sérico de α_1 -glicoproteína ácida (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.4 Títulos de imunoglobulina G total anti-rotavírus pela técnica de EIE indireto

Verificou-se diferença significativa entre grupos no momento 1, quando os bezerros do grupo B1 apresentaram títulos de IgG específica anti-rotavírus significativamente maiores que os animais do grupo B2; essa tendência se manteve até os 30 dias de vida (Tabela 28 e Figura 21). Verificou-se também que, no decorrer do período experimental, os títulos de IgG anti-BRV foram maiores em bezerros filhos de vacas pluríparas (subgrupos B1v e B2v), quando comparados aos filhos de vacas primíparas (subgrupos B1n e B2n). Aos dois e a partir dos quinze dias de idade, não foi constatada influência do número de partos da vaca sobre esse parâmetro em nenhum dos subgrupos estudados.

Entre momentos, notou-se aumento significativo dos títulos séricos de IgG após a ingestão do colostro, seguido por diminuição gradativa desse parâmetro até os 30 dias de vida, em ambos os grupos.

Os títulos de IgG sérico nos bezerros após a ingestão do colostro correlacionaram-se de forma positiva e significativa com os títulos de IgG sérico das vacas no dia do parto ($r = 0,57$; $P < 0,0001$) e com os títulos de IgG no soro colostrado verificados no dia do parto ($r = 0,76$; $P < 0,0001$).

Tabela 28. Média e desvio-padrão dos títulos séricos de **imunoglobulina G específica anti-rotavírus** (valor A/P) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

Momentos (dias)	Grupo B1		Grupo B2	
	B1n	B1v	B2n	B2v
0	0±0,01 ^{Ad}	0±0,01 ^{Ad}	-0,01±0 ^{Ab}	-0,01±0,01 ^{Ac}
1	1,38±0,50 ^{Ba}	1,74±0,37 ^{Aa}	0,38±0,10 ^{Da}	0,76±0,24 ^{Ca}
2	1,35±0,50 ^{Aa}	1,69±0,32 ^{Aa}	0,41±0,09 ^{Ba}	0,75±0,24 ^{Ba}
7	1,24±0,46 ^{Aab}	1,49±0,55 ^{Aab}	0,29±0,06 ^{Ca}	0,66±0,19 ^{Bab}
15	1,15±0,41 ^{Aabc}	1,49±0,43 ^{Aab}	0,27±0,07 ^{Ba}	0,55±0,23 ^{Bab}
21	1,09±0,41 ^{Abc}	1,30±0,42 ^{Abc}	0,25±0,05 ^{Ba}	0,53±0,22 ^{Bab}
30	0,92±0,43 ^{Ac}	1,16±0,40 ^{Ac}	0,18±0,05 ^{Bab}	0,41±0,20 ^{Bb}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

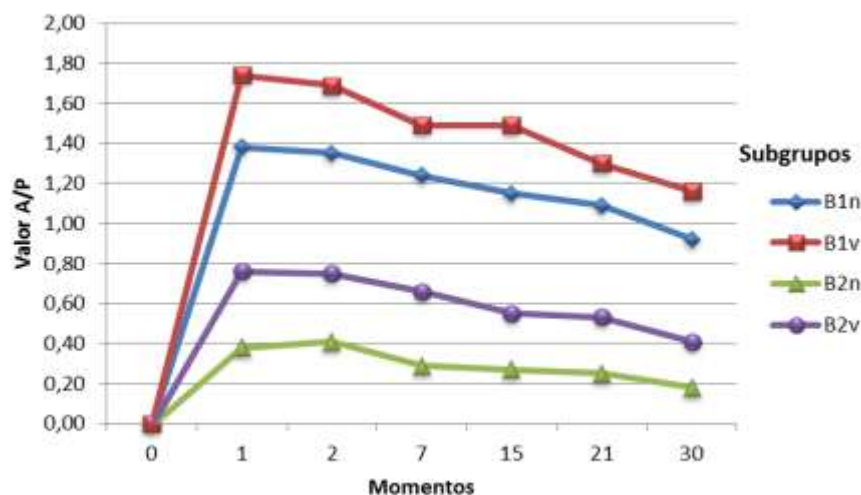


Figura 21. Títulos séricos de **imunoglobulina G específica anti-rotavírus** (valor A/P) de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (grupo B1) e não vacinadas (grupo B2) contra BRV, primíparas (subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (subgrupos B1v e B2v), antes da ingestão de colostro (0) e 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias após o nascimento.

4.2.5 Avaliação das fezes dos bezerros

4.2.5.1 Escore

Constatou-se que, do total de 330 amostras de fezes coletadas entre o nascimento e 30 dias de vida dos bezerros, 307 (93%) apresentavam consistência normal (escores 0 e 1), 16 (4,85%) apresentavam escore 2 (fezes semilíquidas) e 7 (2,12%) apresentavam escore 3 (fezes líquidas) (Tabela 29).

Não foi notada diferença significativa entre grupos quanto ao escore das fezes. O menor escore foi registrado no dia do nascimento (momento 0), sem diferença significativa entre os demais momentos.

Das amostras coletadas entre 0 e 7 dias de vida (n=190), foram contabilizadas como diarreicas apenas amostras coletadas aos 7 dias de idade, uma vez que, com 1 e 2 dias, os quadros diarreicos observados decorreram da ingestão de grandes volumes de colostro. Nesse período, constatou-se que 182 amostras (95,8%) apresentaram escore 1, 4 amostras (2,11%) apresentaram escore 2 e 4 amostras (2,11%) apresentaram escore 3. Dentre as amostras coletadas na segunda semana de vida (n=46), 40 (87%) apresentaram escore 1, 5 (10,9%) apresentaram escore 2 e 1 (2,17%) apresentou escore 3. Das amostras coletadas na terceira

semana de vida (n=47), 43 (91,5%) apresentaram escore 1, 3 (6,38%) apresentaram escore 2 e 1 (2,13%) apresentou escore 3. Já das 47 amostras coletadas na quarta semana de vida, 42 (89,4%) apresentaram escore 1, 4 (8,51%) apresentaram escore 2 e 1 (2,13%) apresentou escore 3.

Tabela 29. Características das **fezes** e percentual de amostras normais e diarreicas coletadas de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (Grupo B1) e não vacinadas (Grupo B2) contra BRV, primíparas (Subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (Subgrupos B1v e B2v), do nascimento aos 30 dias de idade.

Fezes	Grupo B1				Grupo B2				Total de amostras	
	Subgrupo B1n		Subgrupo B1v		Subgrupo B2n		Subgrupo B2v		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%		
Normais	80	95,24	78	92,86	73	90,12	76	93,83	307	93,03
Diarreicas	4	4,76	6	7,14	8	9,88	5	6,17	23	6,97
Total	84	100	84	100	81	100	81	100	330	100

4.2.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de rotavírus nas fezes

Avaliando-se em conjunto os resultados do escore e da detecção de rotavírus nas fezes, verificou-se que nenhuma amostra positiva para esse agente foi encontrada nos animais com até 7 dias de idade. Do total de amostras de fezes coletadas antes da ingestão do colostro e com 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias de vida (n=330), 11 (3,33%) foram positivas para rotavírus, essas amostras foram coletadas de 8 animais diferentes, sendo encontradas amostras positivas em bezerros de todos os subgrupos [B1n (n=1), B1v (n=7), B2n (n=1) e B2v (n=2)]. As amostras positivas para a detecção de rotavírus foram encontradas tanto em fezes de consistência normal (n=3) quanto em fezes de consistência diarreica (n=8).

Com relação à faixa etária, os animais que eliminaram rotavírus nas fezes apresentavam de 10 a 30 dias de idade, sendo 4 bezerros positivos na segunda semana de vida (50%), 3 bezerros na terceira semana de vida (37,5%) e um bezerro na quarta semana de vida (12,5%).

Há de se levar em consideração a diferença marcante na metodologia dos levantamentos de ocorrência da diarreia por rotavírus em propriedades rurais quando comparados ao presente estudo, uma vez que, em geral, o acompanhamento de um mesmo animal não é realizado por um período prolongado,

o que impede também a verificação do número de dias de eliminação do vírus nas fezes dos bezerros acometidos em condições de campo.

4.2.5.3 Reação em cadeia da polimerase precedida de retrotranscrição (RT-PCR) e genotipagem para determinação da estirpe de rotavírus circulante

De onze amostras analisadas por meio da RT-PCR, obteve-se um total de nove amostras positivas tendo como alvo o gene VP4 e sete amostras positivas tendo como alvo o gene VP7. Em uma das amostras analisadas não foi possível obter quaisquer amplificações utilizando os primers descritos no Quadro 5, tendo sido elas todas testadas por duas vezes, em momentos diferentes e partindo-se de novas extrações de RNA, cujos controles positivos e negativos funcionaram de acordo com o esperado.

O genótipo verificado na propriedade que realizava vacinação contra rotavírus foi G6P[11], e na propriedade que não realizava vacinação foi G6P[5] (Tabela 30).

Tabela 30. Resultado da análise da **reação em cadeia da polimerase precedida por retro-transcrição (RT-PCR)** e do **sequenciamento** nas fezes positivas para rotavírus pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), de bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas vacinadas (Grupo B1) e não vacinadas (Grupos B2) contra BRV, primíparas (Subgrupos B1n e B2n) e pluríparas (Subgrupos B1v e B2v).

Subgrupo	Nº de animais positivos	Idade (dias)	Nº de dias* de manifestação de diarreia	Consistência das fezes	RT-PCR		Resultado do sequenciamento
					VP4	VP7	
B1n	1	15	2(5 ^{**})	Normal [§]	+/+	+/+	G6P[11]
	4	10	4(6 ^{**})	Diarreica [‡]	+/+	+/+	G6P[11]
		11	3(6 ^{**})	Diarreica [†]	+/+	+/+	G6P[11]
B1v	15	2(4 ^{**})	Diarreica [‡]	+/+	+/+	G6P[11]	
	18	2(7 ^{**})	Diarreica [‡] / normal [§]	+/+	+/+	G6P[11]	
B2n	1	14	3(6 ^{**})	Diarreica [‡]	+/+	+/+	G6P[5]
B2v	2	11	4(6 ^{**})	Diarreica [‡]	+/-	+/-	-
		30	4(6 ^{**})	Diarreica [‡]	+/+	+/+	G6P[5]

+/+: RT-PCR mostrou bandas positivas fortes, que possibilitaram um bom sequenciamento.

+/-: RT-PCR mostrou bandas positivas fracas, que permites o diagnóstico como positivo, mas não um bom sequenciamento.

*Consecutivos ou não

**Número total de dias de acompanhamento da manifestação de diarreia, incluindo dois dias consecutivos de eliminação de fezes normais ao final do curso da enfermidade.

§ Escore das fezes: 1 (fezes pastosas); ‡ 2 (fezes semilíquidas); † 3 (fezes líquidas)

4.3 Experimento 3:

Realizou-se coleta de sangue e fezes diariamente no decorrer do período de manifestação de diarreia nos bezerros dos grupos B1 e B2. Convencionou-se realizar as coletas por dois dias após o término da manifestação clínica, ou seja, após dois dias consecutivos de fezes com escore normal (0 e 1), a coleta de amostras era interrompida, mas mantinha-se a observação diária quanto à manifestação de alterações clínicas. Os resultados encontrados nesse período são mostrados nas Tabelas 31 a 49 (A e B) e nas Figuras 22 a 26 (A e B).

Após o término da coleta das amostras e o início das análises laboratoriais, optou-se por realocar esses bezerros em grupos de acordo com a ocorrência de diarreia, assim como alocar em grupos distintos animais com fezes positivas e negativas para rotavírus.

As Tabelas foram elaboradas de acordo com as condições de coleta, ou seja, os dados relativos às amostras coletadas em momentos pré-estabelecidos (0, 1, 2, 7, 15, 21 e 30 dias de idade) são mostrados na Tabela *nA*, enquanto os dados relativos às coletas realizadas no decorrer da manifestação de diarreia são mostrados na Tabela *nB*. As Figuras foram submetidas ao mesmo procedimento.

O primeiro dia de manifestação de diarreia, independente da idade do bezerro, foi considerado como momento 1, e assim sucessivamente. O Quadro 7 mostra o número de animais por momento, nos grupos B e C (bezerros que manifestaram diarreia cujas fezes foram negativas e positivas para rotavírus, respectivamente).

Quadro 7. Número de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

Momentos	Grupos	
	B	C
1	(n = 8)	(n = 8)
2	(n = 8)	(n = 8)
3	(n = 8)	(n = 8)
4	(n = 8)	(n = 7)
5	(n = 4)	(n = 6)
6	(n = 3)	(n = 5)
7	(n = 2)	(n = 1)

4.3.1 Idade de manifestação de diarreia

A média ajustada por mínimos quadrados da idade de manifestação de diarreia não diferiu significativamente entre os grupos B e C. Os valores encontrados situaram-se entre 10,4 e 16,4 dias de idade no grupo B e entre 10,3 e 16,3 dias de vida (do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia, respectivamente). É interessante notar que a manifestação de diarreia ocorreu, em média, no período compreendido entre as coletas dos 7 e 15 dias de idade.

4.3.2 Leucograma

4.3.2.1 Contagem de leucócitos

Não foi verificada diferença significativa entre grupos quanto à contagem de leucócitos (Tabela 31A). Constatou-se diferença significativa entre momentos apenas no grupo A, no qual a maior contagem desse tipo celular foi observada aos 2 dias, e a menor aos 15 dias de vida.

Embora sem diferença significativa, verificou-se que a contagem de leucócitos em bezerros do grupo C foi maior aos 7 dias de vida quando comparada aos grupos A e B, enquanto aos 30 dias de vida, a contagem desse tipo celular foi menor no grupo de animais infectados por rotavírus, quando comparado aos demais grupos.

Tabela 31A. Média e desvio-padrão da contagem de **leucócitos** (μL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	9.280±3.860 ^{Aab}	9.260±2.490 ^{Aa}	9.230±2.380 ^{Aa}
1	11.340±3.940 ^{Aa}	11.200±1.760 ^{Aa}	10.410±3.670 ^{Aa}
2	11.150±6.160 ^{Aab}	8.740±2.530 ^{Aa}	8.960±3.790 ^{Aa}
7	7.870±1.660 ^{Aab}	8.840±2.840 ^{Aa}	10.310±3.570 ^{Aa}
15	7.250±2.790 ^{Ab}	7.680±2.490 ^{Aa}	8.830±4.750 ^{Aa}
21	8.060±1.660 ^{Aab}	7.500±1.330 ^{Aa}	8.400±3.750 ^{Aa}
30	11.090±3.440 ^{Aab}	10.790±4.690 ^{Aa}	9.660±3.010 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Constatou-se diferença significativa na contagem de leucócitos apenas no primeiro dia de manifestação de diarreia, quando a contagem verificada no grupo B foi menor que a do grupo C (Tabela 31B).

Tabela 31B. Média ajustada por mínimos quadrados da contagem de **leucócitos** (μL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

Momentos	Grupos	
	B	C
1	8.425 ^B	11.488 ^A
2	7.600 ^A	9.725 ^A
3	7.975 ^A	9.475 ^A
4	7.450 ^A	9.343 ^A
5	7.756 ^A	9.208 ^A
6	8.427 ^A	8.548 ^A
7	7.256 ^A	11.664 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

4.3.2.2 Neutrófilos bastonetes

A contagem de neutrófilos bastonetes dos bezerros da raça Holandesa que não manifestaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A) variou de 0 a 77 células/ μL , dos bezerros que apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) variou de 0 a 254 células/ μL , e dos bezerros que apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C), variou de 0 a 281 células/ μL .

Nos momentos de manifestação de diarreia, a contagem desse tipo celular variou de 0 a 54 células/ μL no grupo B e de 0 a 323 células/ μL no grupo C.

4.3.2.3 Neutrófilos segmentados

A contagem de neutrófilos segmentados não diferiu significativamente entre grupos, do nascimento aos 30 dias de vida (Tabela 32).

Entre momentos, verificou-se que a maior contagem ocorreu no segundo dia de vida no grupo A e no primeiro dia de vida nos grupos B e C, com diminuição

subsequente da contagem desse tipo celular até os 30 dias de vida, com menores contagens aos 15 dias de vida nos grupos A e B e aos 21 dias no grupo C.

Tabela 32. Média e desvio-padrão da contagem de **neutrófilos segmentados** (μL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	4.568±2.315 ^{Aab}	5.382±1.892 ^{Aab}	4.770±2.067 ^{Aabc}
1	7.652±3.845 ^{Aa}	7.319±1.931 ^{Aa}	6.318±2.822 ^{Aa}
2	7.711±5.267 ^{Aa}	5.597±2.540 ^{Aab}	5.418±3.030 ^{Aab}
7	2.941±1.141 ^{Ab}	3.655±1.026 ^{Abc}	4.255±2.037 ^{Aabc}
15	2.037±1.658 ^{Ab}	1.977±963 ^{Ac}	2.372±1.504 ^{Abc}
21	2.157±1.056 ^{Ab}	1.995±513 ^{Ac}	1.984±1.108 ^{Ac}
30	4.120±2.484 ^{Ab}	3.837±1.773 ^{Abc}	2.658±1.817 ^{Abc}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Não foi verificada diferença significativa entre os grupos B e C quanto à contagem de neutrófilos segmentados no período de manifestação de diarreia. Os valores da média ajustada por mínimos quadrados constatados no grupo B variaram de 3.101 células/ μL no primeiro dia de manifestação de diarreia a 1.968 células/ μL no sétimo dia, e de 3.999 células/ μL no primeiro dia de manifestação de diarreia a 2.224 células/ μL no sétimo dia no grupo C.

4.3.2.4 Linfócitos

Não foi constatada diferença significativa entre as médias da contagem de linfócitos entre grupos (Tabela 33A).

Entre momentos, verificou-se aumento gradativo das contagens desse tipo celular, com valores menores observados aos 2 dias de idade, e valores maiores aos 30 dias em todos os grupos.

Tabela 33A. Média e desvio-padrão da contagem de **linfócitos** (μL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	4.564±1.567 ^{Abc}	3.753±1.133 ^{Abc}	4.307±1.216 ^{Abc}
1	3.540±926 ^{Ac}	3.724±672 ^{Abc}	3.778±1.247 ^{Ac}
2	3.251±1.822 ^{Ac}	2.751±523 ^{Ac}	3.292±1.133 ^{Ac}
7	4.828±1.063 ^{Abc}	5.064±2.103 ^{Aab}	5.708±2.088 ^{Aab}
15	5.130±1.250 ^{Aabc}	5.508±1.547 ^{Aab}	6.272±3.551 ^{Aa}
21	5.707±1.329 ^{Aab}	5.401±1.272 ^{Aab}	6.256±2.768 ^{Aa}
30	6.860±1.876 ^{Aa}	6.818±3.076 ^{Aa}	6.896±2.418 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Verificou-se diferença significativa na contagem de linfócitos entre os grupos B e C no primeiro dia de manifestação de diarreia (Tabela 33B), quando a contagem do grupo B foi menor que a do Grupo C. Apesar da ausência de diferença estatística, essa tendência se manteve por todo o período de observação.

Tabela 33B. Média ajustada por mínimos quadrados da contagem de **linfócitos** (μL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

Momentos	Grupos	
	B	C
1	5.155 ^B	7.065 ^A
2	5.424 ^A	6.288 ^A
3	5.650 ^A	5.928 ^A
4	5.053 ^A	5.630 ^A
5	5.862 ^A	5.444 ^A
6	5.582 ^A	6.114 ^A
7	5.246 ^A	6.429 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

4.3.2.5 Monócitos

A contagem de monócitos dos bezerros da raça Holandesa que não manifestaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A) variou de 40 a

113 células/ μL , de bezerros que apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) variou de 30 a 104 células/ μL , e de bezerros que apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C) variou de 43 a 91 células/ μL .

Nos momentos de manifestação de diarreia, a contagem desse tipo celular variou de 0 a 92 células/ μL no grupo B e de 28 a 127 células/ μL no grupo C.

4.3.2.6 Eosinófilos

A contagem de eosinófilos dos bezerros da raça Holandesa que não manifestaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A) variou de 20 a 73 células/ μL , de bezerros que apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) variou de 8 a 64 células/ μL , e de bezerros que apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C) variou de 10 a 132 células/ μL .

Nos momentos de manifestação de diarreia, a contagem de eosinófilos variou de 0 a 77 células/ μL no grupo B e de 0 a 54 células/ μL no grupo C.

4.3.2.7 Basófilos

Não foram encontrados basófilos nos esfregaços sanguíneos dos bezerros que não manifestaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A) em nenhum dos momentos estudados. A contagem de basófilos dos bezerros da raça Holandesa que apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) variou de 0 a 15 células/ μL , de bezerros que apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C) variou de 0 a 9 células/ μL .

Nos momentos de manifestação de diarreia, a contagem desse tipo celular variou de 0 a 17 células/ μL no grupo B; já no grupo C não foram encontrados basófilos nos esfregaços sanguíneos avaliados.

4.3.3 Análises Bioquímicas

4.3.3.1 Gamaglutamiltransferase

Não foi constatada diferença significativa entre grupos quanto à atividade de gamaglutamiltransferase (GGT) ao nascimento, antes da ingestão do colostro. Verificou-se diferença significativa entre grupos apenas com um dia de vida, quando a média da atividade de GGT (Tabela 34A e Figura 22) foi significativamente menor nos bezerros do grupo C, quando comparado aos demais grupos. Nos demais momentos, não foi constatada diferença entre grupos, embora a atividade dessa enzima tenha se mantido menor nos animais do grupo C quando comparado aos demais grupos.

Entre momentos, em todos os grupos a maior atividade dessa enzima foi notada com 1 dia de vida, após a ingestão do colostro, e a atividade sérica de GGT diminuiu gradativamente até os 30 dias de vida.

Tabela 34A. Média e desvio-padrão da atividade sérica de **gamaglutamiltransferase** (U/L) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	23,9±10,4 ^{Ac}	15,3±4,10 ^{Ac}	18,2±5,72 ^{Ac}
1	2.555±1.388 ^{Aa}	2.311±913 ^{Aa}	1.721±547 ^{Ba}
2	1.226±903 ^{Ab}	1.272±394 ^{Ab}	769±307 ^{Ab}
7	372±206 ^{Ac}	532±336 ^{Ac}	305±154 ^{Abc}
15	127±68,0 ^{Ac}	189±91,0 ^{Ac}	98,0±47,0 ^{Ac}
21	106±88,0 ^{Ac}	119±60,0 ^{Ac}	70,2±30,4 ^{Ac}
30	46,9±18,0 ^{Ac}	66±28,4 ^{Ac}	62,1±49,4 ^{Ac}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

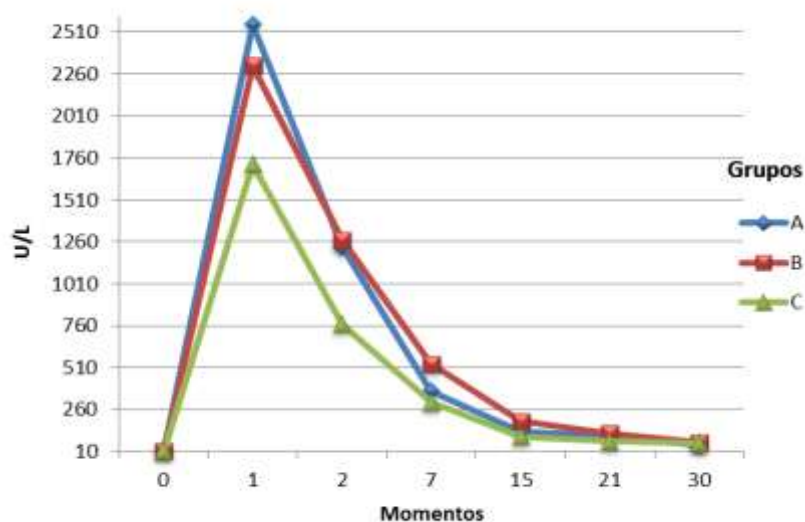


Figura 22. Atividade sérica de **gamaglutamiltransferase** (U/L) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Constatou-se diferença significativa entre os grupos B e C no primeiro dia de manifestação de diarreia, quando a atividade de GGT verificada no grupo B foi significativamente maior que nos animais do grupo C (Tabela 34B). Não foi verificada diferença entre grupos nos demais momentos.

Tabela 34B. Média ajustada por mínimos quadrados da atividade de **gamaglutamiltransferase** (U/L) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

Momentos	Grupos	
	B	C
1	417 ^A	218 ^B
2	259 ^A	164 ^A
3	235 ^A	141 ^A
4	216 ^A	129 ^A
5	153 ^A	129 ^A
6	186 ^A	123 ^A
7	130 ^A	124 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.3.3.2 Proteína total

Não foi notada diferença significativa entre grupos quanto ao teor sérico de proteína total no período avaliado (Tabela 35A), embora os teores verificados no grupo C sejam menores que os dos demais grupos em todos os momentos.

Entre momentos, verificou-se menor concentração de proteína total antes da ingestão do colostro (momento 0), seguida por aumento significativo com 1 e 2 dias de vida, e então, diminuição gradual até os 30 dias de idade nos grupos A, B e C.

Tabela 35A. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **proteína total** (g/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	4,26±0,32 ^{Ac}	4,29±0,64 ^{Ae}	4,34±0,21 ^{Ac}
1	8,20±1,31 ^{Aa}	8,52±1,55 ^{Aab}	7,66±0,83 ^{Aa}
2	8,25±1,25 ^{Aa}	8,82±1,29 ^{Aa}	7,73±0,80 ^{Aa}
7	7,79±1,24 ^{Aa}	7,98±1,07 ^{Ab}	7,31±0,75 ^{Aa}
15	6,91±0,92 ^{Ab}	7,20±0,95 ^{Ac}	6,41±0,52 ^{Ab}
21	6,67±0,91 ^{Ab}	6,75±0,90 ^{AcD}	6,31±0,52 ^{Ab}
30	6,20±0,83 ^{Ab}	6,42±0,84 ^{Ad}	6,12±0,36 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Embora apenas no segundo dia de manifestação de diarreia o teor de proteína total (Tabela 35B) verificado tenha sido significativamente maior no grupo B quando comparado ao grupo C, é interessante notar que essa tendência se manteve em todos os momentos avaliados.

Tabela 35B. Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de **proteína total** (g/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

Momentos	Grupos	
	B	C
1	7,67 ^A	7,29 ^A
2	7,63 ^A	7,01 ^B
3	7,25 ^A	6,86 ^A
4	7,18 ^A	6,53 ^A
5	6,97 ^A	6,55 ^A
6	7,08 ^A	6,45 ^A
7	6,77 ^A	6,26 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.3.3.3 Globulinas

Notou-se diferença entre grupos quanto aos teores séricos de globulinas aos 2 dias de idade (Tabela 36A), quando o valor verificado no grupo C foi significativamente menor que aquele apresentado pelos grupos A e B. Esse fato também foi verificado no momento 1, embora sem diferença significativa entre grupos.

Entre momentos, constatou-se que o teor sérico de globulinas aumentou significativamente após a ingestão do colostro, sendo verificadas maiores concentrações com 1 e 2 dias de vida nos grupos A e B e com 1 dia de vida no grupo C. O teor dessa fração proteica diminuiu gradativamente até os 30 dias de vida nos três grupos.

Tabela 36A. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **globulinas** (g/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	2,22±0,29 ^{Ae}	2,19±0,57 ^{Ae}	2,32±0,22 ^{Ad}
1	6,50±1,33 ^{Aa}	6,74±1,60 ^{Aa}	5,77±0,82 ^{Aa}
2	6,40±1,28 ^{ABa}	6,98±1,31 ^{Aa}	5,68±0,76 ^{Bab}
7	5,64±1,27 ^{Ab}	5,78±1,11 ^{Ab}	5,03±0,70 ^{Ab}
15	4,57±0,85 ^{Ac}	4,76±0,86 ^{Ac}	4,03±0,53 ^{Ac}
21	4,16±0,70 ^{Ac^d}	4,26±0,72 ^{Ac^d}	3,72±0,37 ^{Ac}
30	3,74±0,55 ^{Ad}	3,87±0,64 ^{Ad}	3,45±0,38 ^{Ac}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Constatou-se diferença significativa entre os teores de globulinas dos bezerros dos grupos B e C (Tabela 36B e Figura 23), do primeiro ao quinto dias de manifestação de diarreia, sendo os valores verificados no grupo B significativamente maiores que aqueles apresentados pelos bezerros do grupo C.

Tabela 36B. Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de **globulinas** (g/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

Momentos	Grupos	
	B	C
1	5,31 ^A	4,83 ^B
2	5,24 ^A	4,55 ^B
3	4,91 ^A	4,48 ^B
4	4,83 ^A	4,19 ^B
5	4,62 ^A	4,03 ^B
6	4,68 ^A	4,07 ^A
7	4,41 ^A	4,02 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

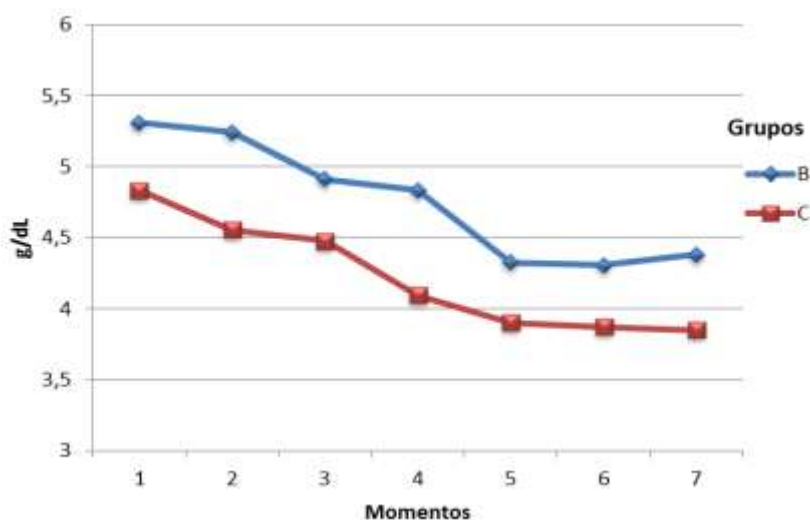


Figura 23. Teor sérico de **globulinas** (g/dL) de bezerras da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

4.3.3.4 Cálcio ionizado

Não foi notada diferença significativa quanto às médias do teor sérico de cálcio ionizado entre grupos, e os valores verificados variaram de $0,74 \pm 0,10$ mMol/L a $0,96 \pm 0,13$ mMol/L.

No período de manifestação de diarreia, os valores de cálcio ionizado constatados variaram de 0,81 a 0,92 mMol/L no grupo B e de 0,72 a 0,99 mMol/L no grupo C. Verificou-se diferença significativa entre esses grupos apenas no primeiro dia de manifestação de diarreia, quando o valor apresentado pelo grupo B (0,91 mMol/L) foi significativamente maior que o constatado no grupo C (0,72 mMol/L).

4.3.3.5 Cloretos

Constatou-se diferença significativa entre grupos quanto às médias do teor sérico de cloretos (Tabela 37A) ao nascimento, quando o valor apresentado pelo grupo A foi maior que aquele notado no grupo C. Nos demais momentos, não foi verificada diferença entre grupos.

Apenas no grupo C foi notada diferença significativa entre momentos, sendo a maior concentração sérica de cloretos verificada aos 21 e 30 dias e a menor aos 7 dias de vida.

Tabela 37A. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **cloretos** (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	108±8,10 ^{Aa}	104±10,28 ^{ABa}	92,8±8,16 ^{Bab}
1	106±9,99 ^{Aa}	99,1±11,3 ^{Aa}	95,4±8,47 ^{Aab}
2	102±8,87 ^{Aa}	99,2±9,40 ^{Aa}	93,9±10,2 ^{Aab}
7	101±9,26 ^{Aa}	100±10,1 ^{Aa}	90,6±7,11 ^{Ab}
15	107±9,23 ^{Aa}	102±10,3 ^{Aa}	99,3±5,85 ^{Aab}
21	105±10,7 ^{Aa}	99,0±7,85 ^{Aa}	100±9,91 ^{Aa}
30	102±16,3 ^{Aa}	96,6±8,40 ^{Aa}	101±8,04 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Apesar de apenas no segundo dia de manifestação de diarreia ter sido notada diferença significativa entre os grupos B e C quanto à concentração sérica de cloretos (Tabela 37B), essa tendência se manteve desde o primeiro até o quarto dias de manifestação de diarreia, quando o teor apresentado pelos bezerros do grupo B foi significativamente maior que aquele constatado nos animais do grupo C.

Tabela 37B. Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de **cloretos** (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

Momentos	Grupos	
	B	C
1	99,7 ^A	94,9 ^A
2	101 ^A	93,7 ^B
3	102 ^A	95,9 ^A
4	102 ^A	96,2 ^A
5	97,2 ^A	99,2 ^A
6	102 ^A	98,9 ^A
7	93,5 ^A	112 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

4.3.3.6 Sódio

Ao nascimento, notou-se menor teor sérico de sódio no grupo C, quando comparado aos demais grupos; já aos 7 dias de idade a maior concentração de sódio foi constatada no grupo B a menor no grupo C (Tabela 38).

Apenas no grupo C foi verificada diferença significativa entre momentos, com menor teor sérico de sódio ao nascimento e maior com um dia de vida.

Tabela 38. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **sódio** (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	140±5,38 ^{Aa}	139±4,93 ^{Aa}	132±11,2 ^{Bb}
1	141±2,82 ^{Aa}	141±6,83 ^{Aa}	141±5,06 ^{Aa}
2	142±6,81 ^{Aa}	140±5,36 ^{Aa}	139±4,53 ^{Aab}
7	137±3,20 ^{ABa}	142±7,21 ^{Aa}	135±4,96 ^{Bab}
15	136±2,60 ^{Aa}	136±6,16 ^{Aa}	136±4,37 ^{Aab}
21	142±13,5 ^{Aa}	136±3,23 ^{Aa}	138±2,82 ^{Aab}
30	135±5,37 ^{Aa}	136±4,61 ^{Aa}	137±2,92 ^{Aab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Não foi verificada diferença significativa quanto à concentração sérica de sódio entre os grupos B e C em nenhum dos momentos avaliados. As médias ajustadas por mínimos quadrados constatadas variaram de 131 a 137 mMol/L no Grupo B e de 132 a 137 mMol/L no Grupo C.

4.3.3.7 Potássio

Verificou-se diferença significativa entre grupos quanto ao teor sérico de potássio apenas ao nascimento (Tabela 39A), quando as médias dos grupos B e C foram significativamente menores que aquela do grupo A.

Não foi notada diferença significativa entre momentos no grupo A. Já nos grupos B e C, o maior teor sérico de potássio foi constatado aos 7 dias de idade e o menor ao nascimento (momento 0).

Tabela 39A. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **potássio** (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	5,51±0,74 ^{Aa}	4,96±0,36 ^{Bb}	4,64±0,49 ^{Bb}
1	4,98±0,29 ^{Aa}	5,33±0,82 ^{Aab}	5,19±0,64 ^{Aab}
2	5,10±0,60 ^{Aa}	5,15±0,38 ^{Aab}	5,16±0,32 ^{Aab}
7	5,55±0,33 ^{Aa}	5,81±0,39 ^{Aa}	5,43±0,40 ^{Aa}
15	5,33±0,56 ^{Aa}	5,45±0,36 ^{Aab}	5,23±0,38 ^{Aab}
21	5,31±0,33 ^{Aa}	5,09±0,32 ^{Ab}	5,00±0,25 ^{Aab}
30	5,16±0,45 ^{Aa}	5,06±0,25 ^{Ab}	5,25±0,30 ^{Aab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Apenas no quarto dia de manifestação de diarreia foi notada diferença significativa entre os teores médios de potássio ajustados por mínimos quadrados dos grupos B e C (Tabela 39B), quando o valor verificado no grupo B foi maior que aquele constatado no grupo C.

Tabela 39B. Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de **potássio** (mMol/L) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

Momentos	Grupos	
	B	C
1	5,58 ^A	5,58 ^A
2	5,23 ^A	5,53 ^A
3	5,28 ^A	5,08 ^A
4	5,48 ^A	4,85 ^B
5	5,26 ^A	5,38 ^A
6	5,49 ^A	5,06 ^A
7	5,17 ^A	4,84 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

4.3.3.8 Concentração sérica de ureia e creatinina

As médias do teor sérico de ureia foram significativamente menores nos bezerros do grupo C aos 2 e 7 dias de vida, quando comparados ao grupo B (Tabela 40).

Entre momentos, notou-se maior concentração desse metabólito aos 2 dias de idade e menor ao nascimento nos grupos A e B; não foi verificada diferença significativa entre momentos no grupo C.

Tabela 40. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **ureia** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	20,8±9,93 ^{Ab}	25,4±8,02 ^{Ab}	23,1±7,35 ^{Aa}
1	27,9±8,10 ^{Aab}	29,1±12,2 ^{Ab}	24,9±7,02 ^{Aa}
2	38,3±9,49 ^{ABa}	43,2±16,3 ^{Aa}	30,6±9,94 ^{Ba}
7	25,0±3,44 ^{ABab}	32,6±10,0 ^{Aab}	22,0±8,40 ^{Ba}
15	30,3±11,5 ^{Aab}	31,2±11,5 ^{Aab}	28,6±4,79 ^{Aa}
21	30,5±4,38 ^{Aab}	32,4±7,27 ^{Aab}	31,0±6,26 ^{Aa}
30	23,4±3,00 ^{Ab}	29,0±5,28 ^{Ab}	25,6±9,89 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A concentração sérica de ureia verificada no decorrer do período de manifestação de diarreia não diferiu significativamente entre os grupos B e C, sendo que os valores da média ajustada por mínimos quadrados constatados variaram de 26,6 a 34,9 mg/dL no grupo B e de 25,2 a 34,1 mg/dL no grupo C.

Não foi constatada diferença significativa entre grupos quanto às médias do teor sérico de creatinina (Tabela 41). Já entre momentos, a maior concentração foi verificada ao nascimento, com diminuição gradativa até valores menores aos 30 dias de idade.

Tabela 41. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **creatinina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	3,02±0,78 ^{Aa}	3,48±1,74 ^{Aa}	3,51±1,61 ^{Aa}
1	1,82±0,31 ^{Ab}	1,98±0,58 ^{Ab}	1,67±0,28 ^{Ab}
2	1,38±0,23 ^{Ab}	1,48±0,26 ^{Ab}	1,27±0,19 ^{Ab}
7	1,28±0,14 ^{Ab}	1,38±0,24 ^{Ab}	1,30±0,19 ^{Ab}
15	1,30±0,12 ^{Ab}	1,35±0,28 ^{Ab}	1,23±0,20 ^{Ab}
21	1,16±0,14 ^{Ab}	1,24±0,25 ^{Ab}	1,19±0,14 ^{Ab}
30	1,12±0,18 ^{Ab}	1,22±0,23 ^{Ab}	1,16±0,18 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A concentração sérica de creatinina não diferiu significativamente entre grupos no decorrer dos momentos de manifestação de diarreia, e os valores das médias ajustadas por mínimos quadrados notados variaram de 1,26 a 1,47 mg/dL no grupo B e de 1,21 a 1,41 no grupo C.

4.3.3.9 Imunoglobulina A (IgA) pela técnica de SDS-PAGE

As médias do teor sérico de IgA (Tabela 42 e Figura 24) não diferiram significativamente entre grupos.

Entre momentos, constatou-se a menor concentração dessa imunoglobulina ao nascimento, seguida por aumento gradual até os 30 dias de vida, quando foram constatados os maiores teores nos três grupos avaliados.

Tabela 42. Média e desvio-padrão da concentração sérica de **imunoglobulina A** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	87,1±17,8 ^{Ae}	80,2±40,7 ^{Ac}	103±17,4 ^{Ac}
1	194±46,1 ^{Ad}	208±56,8 ^{Ab}	205±28,8 ^{Ab}
2	236±99,5 ^{Accd}	224±63,3 ^{Ab}	226±30,1 ^{Ac}
7	269±61,5 ^{Abc}	299±72,3 ^{Aa}	310±44,7 ^{Aa}
15	333±86,2 ^{Aab}	327±67,5 ^{Aa}	313±53,7 ^{Aa}
21	332±68,8 ^{Aab}	312±79,4 ^{Aa}	305±58,6 ^{Aa}
30	338±88,5 ^{Aa}	353±91,9 ^{Aa}	293±83,7 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

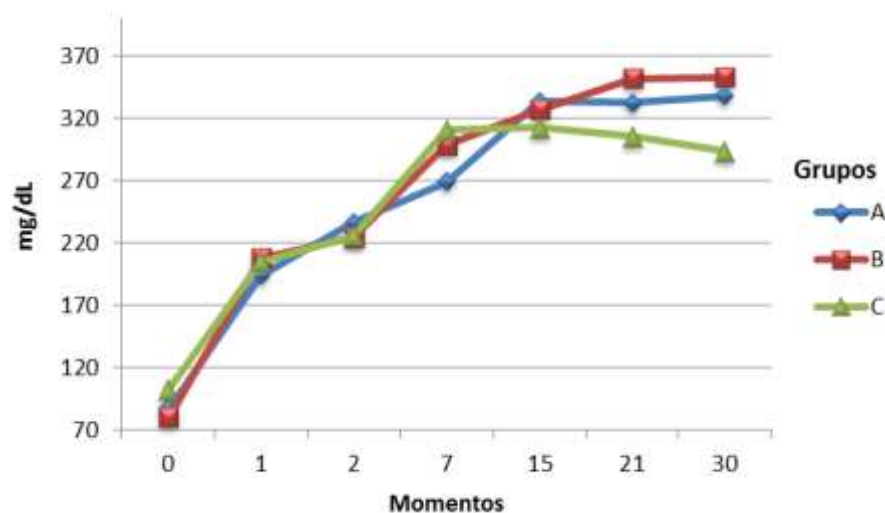


Figura 24. Teor sérico de **imunoglobulina A** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Não foi constatada diferença significativa entre os grupos B e C quanto ao teor sérico de imunoglobulina A no decorrer dos episódios de manifestação de diarreia. As médias ajustadas por mínimos quadrados da concentração sérica dessa imunoglobulina variaram de 304 a 352 no grupo B e de 305 a 323 no grupo C.

4.3.3.10 Ceruloplasmina pela técnica de SDS-PAGE

Constatou-se diferença significativa entre grupos quanto ao teor sérico de ceruloplasmina aos 7 e 15 dias de idade, quando a maior concentração dessa PFA foi notada no grupo C e a menor nos grupos A e B, e aos 30 de vida, quando o maior teor de ceruloplasmina foi verificado no grupo A e o menor no grupo B (Tabela 43A e Figura 25A).

Entre momentos, as menores concentrações de ceruloplasmina foram notadas nos primeiros dias de vida, e as maiores aos 30 dias em todos os grupos estudados.

Tabela 43A. Média da concentração sérica de **ceruloplasmina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	31,5±8,22 ^{Ad}	32,6±7,78 ^{Aab}	32,6±5,59 ^{Ab}
1	24,8±10,8 ^{Ad}	24,9±5,85 ^{Ab}	30,6±6,18 ^{Ab}
2	35,7±13,9 ^{Abcd}	30,3±13,3 ^{Aab}	31,4±7,00 ^{Ab}
7	34,2±11,3 ^{Bcd}	26,7±9,38 ^{Bab}	49,8±13,2 ^{Aa}
15	48,6±17,2 ^{ABab}	37,9±14,8 ^{Bab}	52,9±13,5 ^{Aa}
21	46,9±18,1 ^{Aabc}	37,9±8,63 ^{Aab}	43,7±14,4 ^{Aab}
30	57,5±16,5 ^{Aa}	40,9±18,5 ^{Ba}	48,6±13,9 ^{ABa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

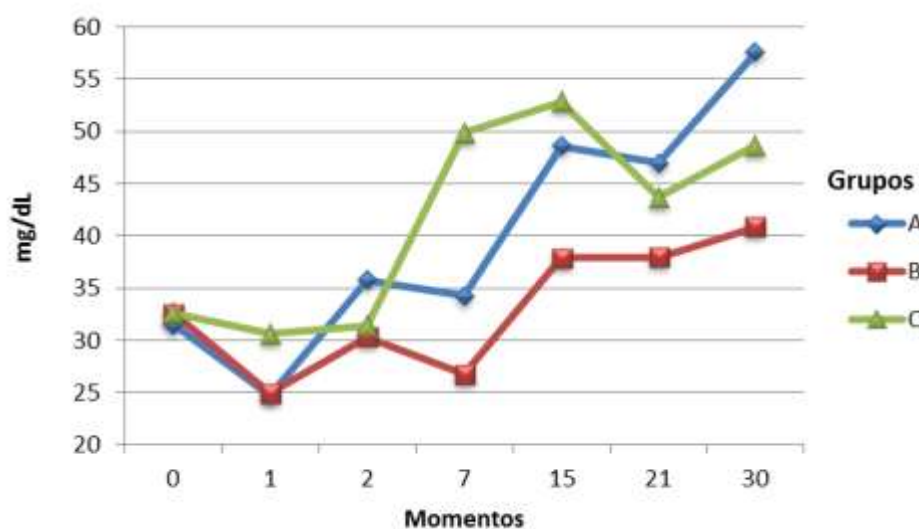


Figura 25A. Teor sérico de **ceruloplasmina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Constatou-se diferença significativa entre as médias ajustadas por mínimos quadrados quanto aos teores séricos de ceruloplasmina entre os grupos B e C, do segundo ao quarto dias de manifestação de diarreia, quando os teores verificados no grupo B foram menores que os do grupo C (Tabela 43B e Figura 25B).

Tabela 43B. Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de **ceruloplasmina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

Momentos	Grupos	
	B	C
1	48,4 ^A	55,2 ^A
2	43,8 ^B	59,6 ^A
3	39,0 ^B	56,3 ^A
4	36,2 ^B	53,1 ^A
5	41,9 ^A	57,7 ^A
6	44,7 ^A	57,7 ^A
7	50,5 ^A	38,4 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

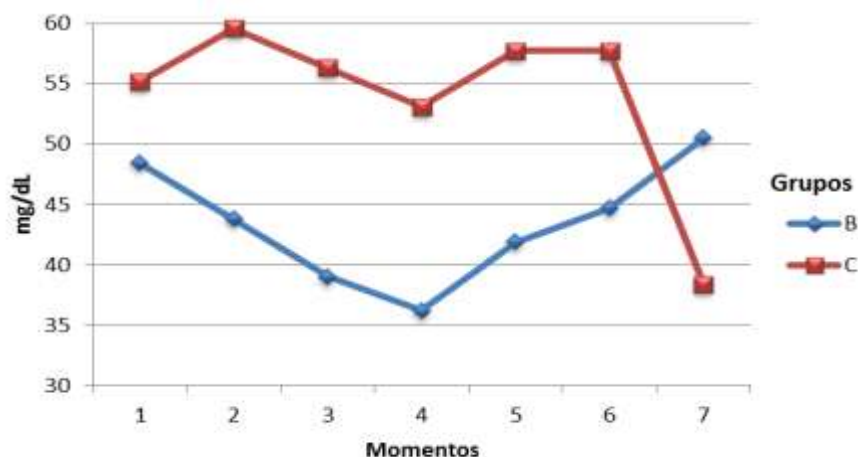


Figura 25B. Teor sérico de **ceruloplasmina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

4.3.3.11 Transferrina pela técnica de SDS-PAGE

As médias do teor sérico de transferrina diferiram significativamente entre grupos apenas aos 30 dias de idade, quando foram maiores no grupo C e menores no grupo B (Tabela 44A).

Entre momentos, notou-se maior teor dessa proteína aos 7 dias de idade em todos os grupos e menor ao nascimento nos grupos A e C, e ao nascimento e aos 30 dias de vida no grupo B.

Tabela 44A. Média da concentração sérica de **transferrina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	265±53,0 ^{Ab}	276±53,8 ^{Ab}	280±72,7 ^{Ab}
1	379±80,8 ^{Aab}	340±91,8 ^{Aab}	382±91,7 ^{Aab}
2	376±60,6 ^{Aab}	350±130 ^{Aab}	412±98,0 ^{Aa}
7	423±74,5 ^{Aa}	408±93,7 ^{Aa}	447±145 ^{Aa}
15	329±99,3 ^{Aab}	328±106 ^{Aab}	426±98,3 ^{Aa}
21	348±60,0 ^{Aab}	306±75,5 ^{Aab}	393±65,5 ^{Aab}
30	309±80,0 ^{ABab}	237±99,3 ^{Bb}	369±56,8 ^{Aab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Verificou-se diferença significativa entre os grupos B e C quanto ao teor de transferrina no quinto dia de manifestação de diarreia, quando o teor dessa PFA foi significativamente menor no grupo B, quando comparado ao grupo C (Tabela 44B).

Tabela 44B. Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de **transferrina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

Momentos	Grupos	
	B	C
1	424 ^A	454 ^A
2	387 ^A	468 ^A
3	365 ^A	441 ^A
4	347 ^A	423 ^A
5	251 ^B	407 ^A
6	336 ^A	418 ^A
7	270 ^A	387 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

4.3.3.12 Imunoglobulina G (IgG) pela técnica de SDS-PAGE

Não foi verificada diferença significativa entre grupos quanto aos teores séricos de imunoglobulina G antes da ingestão de colostro. Nos momentos 1 e 2, foram constatadas diferenças significativas entre os teores de IgG apresentados pelos grupos (Tabela 45A e Figura 26A), quando concentrações maiores foram verificadas nos grupos A e B, e menores teores foram notados no grupo C.

Entre momentos, verificou-se menor teor de IgG ao nascimento e maior com 1 e 2 dias de vida, após a ingestão do colostro. Os teores dessa imunoglobulina diminuíram então gradativamente até os 30 dias de idade.

Tabela 45A. Média da concentração sérica de **imunoglobulina G** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	529±203 ^{Ae}	611±112 ^{Ae}	563±224 ^{Ad}
1	3.792±844 ^{Aa}	3.829±1.001 ^{Aa}	3.105±434 ^{Ba}
2	3.554±707 ^{ABa}	3.952±817 ^{Aa}	2.962±415 ^{Ba}
7	2.952±878 ^{Ab}	2.961±611 ^{Ab}	2.338±399 ^{Ab}
15	2.069±525 ^{Ac}	2.135±435 ^{Ac}	1.586±206 ^{Ac}
21	1.700±382 ^{AcD}	1.766±349 ^{AcD}	1.321±182 ^{Ac}
30	1.395±317 ^{Ad}	1.477±307 ^{Ad}	1.230±172 ^{Ad}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

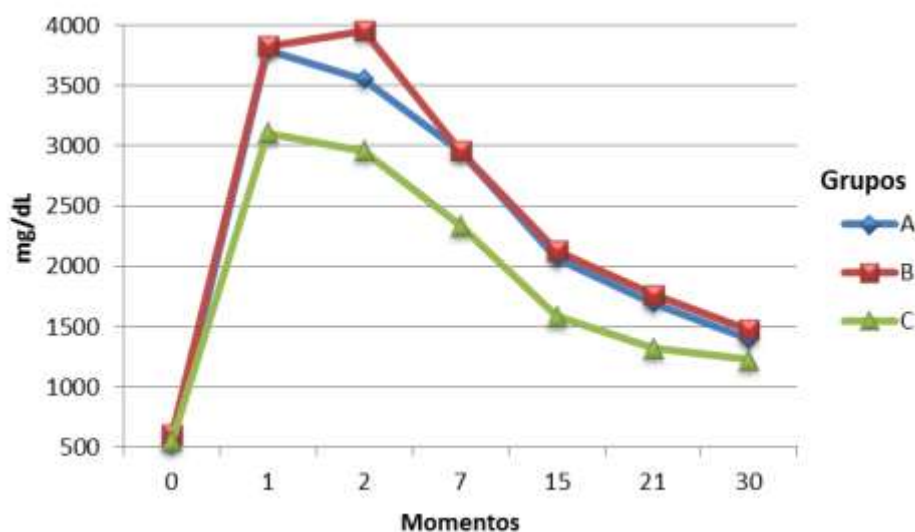


Figura 26A. Teor sérico de **imunoglobulina G** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Foi constatada diferença significativa entre os grupos B e C quanto ao teor de IgG do primeiro ao quarto dias de manifestação de diarreia, quando os valores verificados no grupo B foram significativamente maiores que os do grupo C (Tabela

45B e Figura 26B). Apesar de sem diferença significativa, essa tendência se manteve por todo o período de observação.

Tabela 45B. Média ajustada por mínimos quadrados da concentração de **imunoglobulina G** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

Momentos	Grupos	
	B	C
1	2.474 ^A	2.127 ^B
2	2.479 ^A	1.908 ^B
3	2.208 ^A	1.846 ^B
4	2.139 ^A	1.750 ^B
5	2.036 ^A	1.751 ^A
6	2.032 ^A	1.672 ^A
7	1.784 ^A	1.594 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

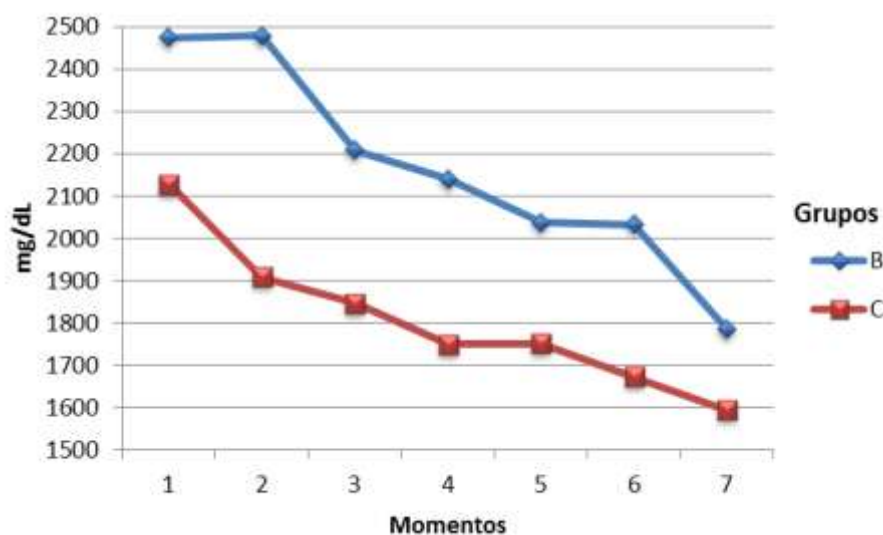


Figura 26B. Teor sérico de **imunoglobulina G** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa cujas fezes foram negativas (grupo B) ou positivas (grupo C) para rotavírus, do primeiro ao sétimo dias de manifestação de diarreia.

4.3.3.13 Haptoglobina pela técnica de SDS-PAGE

As médias do teor sérico de haptoglobina (Tabela 46) não diferiram significativamente entre grupos no decorrer do período experimental. Entre

momentos, constatou-se a menor concentração dessa PFA ao nascimento a maior aos 15 dias de vida, e em todos os grupos.

Tabela 46. Média da concentração sérica de **haptoglobina** (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	6,63±1,91 ^{Ac}	8,34±1,98 ^{Ac}	7,51±2,46 ^{Ac}
1	13,4±5,91 ^{Ab}	12,2±4,34 ^{Abc}	12,3±6,15 ^{Abc}
2	16,0±7,11 ^{Aab}	14,6±5,93 ^{Aab}	15,9±5,50 ^{Aab}
7	18,1±6,45 ^{Aab}	16,4±6,06 ^{Aab}	18,0±3,90 ^{Aa}
15	20,4±5,41 ^{Aa}	17,8±5,22 ^{Aa}	19,4±5,57 ^{Aa}
21	16,3±4,20 ^{Aab}	14,1±2,84 ^{Aab}	15,4±2,70 ^{Aab}
30	16,8±6,87 ^{Aab}	15,0±4,34 ^{Aab}	16,7±5,34 ^{Aab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Não foi verificada diferença significativa nos teores de haptoglobina entre os grupos B e C no decorrer do período de manifestação de diarreia. As médias ajustadas por mínimos quadrados variaram de 13,1 a 20,2 mg/dL no grupo B e de 15,2 a 19,2 mg/dL no grupo C.

4.3.3.14 α_1 -glicoproteína ácida pela técnica de SDS-PAGE

Não foi notada diferença significativa entre as médias do teor sérico de α_1 -glicoproteína ácida entre grupos ou entre momentos nos grupos B e C (Tabela 47). No grupo A, a menor concentração sérica dessa PFA foi constatada ao nascimento e a maior aos 2 dias de vida.

Tabela 47. Média da concentração sérica de α_1 -glicoproteína ácida (mg/dL) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	4,50±2,10 ^{Ab}	3,75±1,80 ^{Aa}	3,05±0,81 ^{Aa}
1	9,52±5,72 ^{Aab}	8,61±4,66 ^{Aa}	11,3±2,17 ^{Aa}
2	18,8±27,2 ^{Aa}	10,7±6,43 ^{Aa}	12,8±5,42 ^{Aa}
7	9,37±4,95 ^{Aab}	11,3±3,58 ^{Aa}	9,94±3,98 ^{Aa}
15	13,0±4,97 ^{Aab}	12,7±8,04 ^{Aa}	12,3±5,35 ^{Aa}
21	12,7±7,07 ^{Aab}	13,1±5,81 ^{Aa}	12,1±7,32 ^{Aa}
30	13,5±7,41 ^{Aab}	13,2±5,25 ^{Aa}	13,0±5,44 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Não foi constatada diferença significativa nos teores de α_1 -glicoproteína ácida entre grupos B e C no decorrer do período de manifestação de diarreia. As médias ajustadas pelos mínimos quadrados variaram de 11,3 a 13,4 mg/dL no grupo B e de 10,4 a 13,7 mg/dL no grupo C.

4.3.4 Títulos de imunoglobulina G total anti-rotavírus pela técnica de EIE indireto

Não foi constatada diferença significativa entre grupos em nenhum dos momentos estudados (Tabela 48).

Entre momentos, verificou-se aumento significativo dos títulos de IgG anti-BRV em todos os grupos após a ingestão do colostro, seguido por diminuição gradativa da concentração dessa imunoglobulina até os 30 dias de vida.

Tabela 48. Média e desvio-padrão dos títulos séricos de **imunoglobulina G específica anti-rotavírus** (valor A/P) de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Momentos (dias)	Grupos		
	A	B	C
0	-0,01±0,01 ^{Ac}	-0,01±0,02 ^{Ac}	0±0,01 ^{Ad}
1	1,40±0,49 ^{Aa}	1,10±0,62 ^{Aab}	1,36±0,56 ^{Aa}
2	1,29±0,49 ^{Aab}	1,32±0,73 ^{Aa}	1,20±0,43 ^{Aab}
7	1,05±0,59 ^{Aab}	1,27±0,76 ^{Aa}	0,97±0,41 ^{Aabc}
15	1,10±0,65 ^{Aab}	1,06±0,65 ^{Aab}	1,03±0,50 ^{Aabc}
21	1,07±0,47 ^{Aab}	0,95±0,68 ^{Aab}	0,86±0,37 ^{Abc}
30	0,93±0,55 ^{Ab}	0,84±0,48 ^{Ab}	0,68±0,46 ^{Ac}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Não foi constatada diferença significativa quanto aos títulos de IgG anti-BRV entre os grupos B e C, nos momentos de manifestação de diarreia. Os valores encontrados variaram de 1,030 a 1,170 no grupo B e de 0,80 a 1,130 no grupo C.

4.3.5 Avaliação das fezes dos bezerros

4.3.5.1 Escore das fezes

Não foi notada diferença significativa entre grupos quanto ao escore das fezes do nascimento aos 30 dias de vida. Entre momentos, notou-se que o menor valor foi verificado ao nascimento, enquanto os demais momentos não apresentaram diferença entre si.

Não foi notada diferença significativa entre os grupos B e C, quanto ao escore das fezes, no período de manifestação de diarreia. Os valores verificados variaram de 2,13 a 0,78 no Grupo B e de 2,75 a 0,94 no Grupo C, do primeiro ao sétimo dia de manifestação de diarreia, respectivamente.

Constatou-se que, do total de 168 amostras de fezes coletadas dos bezerros dos Grupos A, B e C no decorrer do período experimental, 155 (92,3%) apresentavam consistência normal, enquanto 13 amostras (7,74%) apresentavam características diarreicas, com consistência semilíquida a líquida (Tabela 49A).

Do total de 96 amostras de fezes coletadas de bezerros no decorrer da primeira semana de vida, 92 apresentavam-se normais (95,8%) e 4 (4,17%) apresentavam características diarreicas. Do total de 24 amostras coletadas de animais na segunda semana de vida, 19 amostras (79,2%) apresentavam-se normais, 4 amostras (16,7%) apresentavam escore 2 e 1 amostra (4,17%) apresentava escore 3. Já nos animais na terceira semana de vida, todas as 24 amostras coletadas apresentavam características normais. Nos animais com 4 semanas de vida, do total de 24 amostras coletadas, 21 apresentavam escore 1 (87,5%), 2 amostras (8,33%) apresentavam escore 2 e uma amostra (4,17%) apresentava escore 3.

Tabela 49A. Características das **fezes** e percentual de amostras diarreicas e normais coletadas de bezerros da raça Holandesa que não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (grupo A), que apresentaram diarreia nesse período, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia nesse período, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Fezes	Grupos						Total de amostras	
	Grupo A		Grupo B		Grupo C		n	%
	n	%	n	%	n	%		
Normais	54	96,43	52	92,86	49	87,5	155	92,26
Diarreicas	2	3,57	4	7,14	7	12,5	13	7,74
Total	56	100	56	100	56	100	168	100

Das 84 amostras de fezes coletadas no decorrer do período de manifestação de diarreia, 41 (48,8%) apresentavam escore 1, 28 (33,3%) apresentavam escore 2 e 15 (17,9%) apresentavam escore 3.

Entre grupos, verificou-se que das 41 amostras coletadas dos bezerros do grupo B, 21 (51,2%) amostras apresentavam escore 0 ou 1 (consistência normal), 12 amostras (29,3%) foram classificadas como escore 2 e 8 amostras (19,5%) como escore 3. No grupo C, das 43 amostras coletadas, 20 (46,5%) apresentavam consistência normal, 16 (37,2%) foram classificadas como escore 2 e 7 amostras (16,3%) foram classificadas como escore 3 (Tabela 49B).

Tabela 49B. Características das **fezes** e percentual de amostras normais e diarreicas coletadas dos bezerros da raça Holandesa que apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo B) e que apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, sendo positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (grupo C).

Fezes	Grupos				Total de amostras	
	Grupo B		Grupo C		n	%
	n	%	n	%		
Normais	21	51,3	20	46,5	41	48,8
Diarreicas	20	48,8	23	53,5	43	51,2
Total	41	100	43	100	84	100

4.3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de rotavírus nas fezes

Idem item 4.2.5.2.

4.3.5.3 Reação em cadeia da polimerase precedida de retro-transcrição (RT-PCR) e genotipagem para determinação da estirpe de rotavírus circulante

Idem ao item 4.2.5.3.

5 DISCUSSÃO

Diante dos resultados variáveis verificados na literatura nacional e internacional quanto à eficácia das vacinas comerciais na proteção conferida aos bezerros contra a diarreia neonatal por rotavírus, realizou-se o presente experimento com o intuito de avaliar se as vacinas mais recentes disponíveis no mercado, nas quais estão presentes as estirpes G6P[1] e G10P[11] de BRV, conferem proteção efetiva aos bezerros quanto à infecção e manifestação clínica da diarreia por rotavírus em condições de campo. Visou-se também averiguar a influência do fornecimento de colostro de vacas primíparas ou pluríparas aos seus respectivos bezerros, uma vez que a resposta das vacas à vacinação, bem como a qualidade do colostro produzido podem ser influenciados por esse fator.

Experimento 1

Com o intuito de avaliar a resposta imune humoral de vacas primíparas e pluríparas à imunização pré-parto com vacina comercial inativada contra rotavírus, bem como a transferência de proteínas séricas para o colostro, foram avaliados os teores séricos e colostrais de proteína total, imunoglobulinas A (IgA) e G (IgG), os títulos de imunoglobulina G específica anti-BRV, bem como os teores séricos de globulinas no soro sanguíneo de vacas aos 60 e 30 dias pré-parto e no dia do parto, e no colostro coletado nos dias 0 e 1 após o parto.

Embora sem diferença significativa, verificou-se que vacas pluríparas apresentaram maiores teores séricos de **proteína total** e **globulinas**, quando comparadas às vacas primíparas em todos os momentos avaliados. Esse achado já foi descrito anteriormente por Cozzi et al. (2011) que, avaliando valores de referência de parâmetros sanguíneos de vacas da raça Holandesa, relataram que o número de parições influenciou os marcadores de metabolismo proteico, com tendência a maiores teores de proteína total e globulinas em vacas mais velhas. Esse achado pode ser explicado pelo fato de que a exposição contínua dos animais, no decorrer da vida, a antígenos presentes no ambiente ocasiona aumento da produção de

anticorpos, cuja variedade e concentração se elevam em função da idade (LARSON; TOUCHBERRY, 1959).

Entre momentos, foi interessante notar que a vacinação pré-parto não influenciou os teores séricos de proteína total e globulinas, uma vez que não foi constatada diferença significativa nesses parâmetros entre os 60 e 30 dias pré-parto. Verificou-se, entretanto, diminuição dos teores séricos de proteína total e globulinas no dia do parto quando comparado aos 60 e 30 dias pré-parto, o que foi relatado anteriormente por outros autores (BIRGEL JUNIOR et al., 2003; SILVA, 2009; PICCIONE et al., 2012). Essa dinâmica de proteínas séricas no periparto já era esperada, e decorre da transferência de imunoglobulinas para as secreções lácteas que ocorre durante a colostrogênese, evento que tem início algumas semanas antes do parto e cujo pico ocorre dias antes do parto (LARSON, 1958; BARRINGTON; PARISH, 2001).

A influência do número de parições sobre os teores séricos de proteína total em vacas primíparas e pluríparas também foi verificada na avaliação do colostro – constatou-se maior concentração de proteína total nas secreções lácteas de vacas pluríparas, quando comparadas às vacas primíparas, nos momentos 0 e 1. Rocha et al. (2012) também verificaram maior teor de proteína total no soro colostrado de vacas pluríparas, quando comparadas às vacas primíparas, em animais da raça Canchim. É interessante notar que o teor de proteína total no soro colostrado, em especial do dia do parto, foi significativamente maior nas vacas, tanto primíparas quanto pluríparas, do grupo vacinado – esse achado pode decorrer de diferenças genéticas entre os rebanhos, bem como de diferenças no grau de desafio ambiental ao qual os animais foram submetidos.

Na comparação entre rebanhos vacinado (grupo V1) e não vacinado (grupo V2), verificou-se que não houve relação direta entre a tendência verificada no soro sanguíneo das vacas e aquela constatada no colostro das mesmas. Notou-se que vacas primíparas e pluríparas do grupo V1 apresentaram, em geral, menores teores séricos de proteína total e globulinas, quando comparadas aos animais do grupo V2, mas que, no entanto, os teores de proteína total do soro colostrado foram maiores em vacas do rebanho vacinado que naquelas do rebanho não vacinado. Esse achado, assim como relatado para os teores de proteína no soro lácteo, pode decorrer tanto

de fatores relacionados à variabilidade genética entre os rebanhos estudados, quanto do desafio natural ao qual os animais foram submetidos.

Com relação aos teores séricos de imunoglobulinas, determinados pela técnica de SDS-PAGE, constatou-se aumento não significativo do teor de **IgA** após a vacinação dos animais do Grupo V1, embora a diferença mais marcante verificada no presente estudo tenha sido entre o teor de IgA no grupo V2 e concentração sérica dessa imunoglobulina no grupo V1 em todos os momentos estudados. Supõe-se que esse resultado seja atribuível às diferenças de manejo entre as propriedades estudadas, ocasionadas, provavelmente, pela maior exposição dos animais do grupo V2 a desafios ambientais, em especial aqueles que determinam um maior estímulo à síntese de IgA, uma vez que, em ambas as propriedades, as vacas foram realocadas aos 60 dias pré-parto dos piquetes de origem para piquetes de parição.

Entre momentos, a diminuição do teor sérico de IgA em ambos os grupos por ocasião do parto, quando comparado às demais coletas, também foi relatada por Silva (2009), e pode ser atribuído tanto à diminuição da capacidade dos animais em responderem à estímulos imunogênicos no período de transição, quanto ao transporte de parte dessa IgA para as secreções mamárias, embora a presença de IgA no colostro decorra, principalmente, da síntese desse isótipo de imunoglobulina por plasmócitos locais (SNOECK; PETERS; COX, 2006).

No soro colostrado, os teores de IgA foram significativamente maiores no subgrupo V1v quando comparado aos demais subgrupos. Rocha (2010), diferentemente do verificado entre os subgrupos V1n e V1v, não constatou diferença significativa ao comparar o teor de IgA no soro colostrado de vacas primíparas e pluríparas da raça Canchim, no entanto, a concentração de IgA relatada por esse autor, exceto pelo Subgrupo V2n, assemelha-se à verificada no presente estudo. Já Gomes et al. (2011) relataram maior teor de IgA no soro colostrado de vacas da raça Holandesa com quatro a seis partições, quando comparadas às vacas primíparas. Uma vez que nas propriedades leiteiras estudadas a diferenciação de manejo é feita considerando apenas animais de primeira cria à parte do restante do rebanho, ou seja, a partir da segunda gestação, as vacas já são manejadas da mesma forma que as demais categorias de vacas pluríparas, no presente estudo não foi avaliada a influência do número de partições das vacas dentro dos subgrupos V1v e V2v, no

entanto, a distribuição dos animais nesses subgrupos foi uniforme, como mostrado no Quadro 2.

Os maiores teores séricos de **IgG** nos animais do grupo V2 quando comparados às vacas do grupo V1 no dia do parto, podem ser atribuídos à uma maior exposição natural a antígenos presentes no ambiente, o que denotaria uma maior pressão de infecção em decorrência de características do manejo da propriedade, embora os animais do grupo V1 tenham origem em um rebanho maior no qual, em tese, a possibilidade de contato com agentes patogênicos seria potencializada.

Constatou-se também que a vacinação pré-parto não influenciou significativamente os teores séricos de IgG nos animais do grupo V1, no entanto, houve diminuição significativa dos teores dessa classe de imunoglobulina por ocasião do parto quando comparado às coletas anteriores (60 e 30 dias pré-parto) em ambos os grupos. Silva (2009) também constatou diminuição dos teores séricos de IgG em vacas da raça Holandesa por ocasião do parto quando comparado aos 60 e 30 dias pré-parto, como resultado da transferência dessa classe de imunoglobulinas para a glândula mamária em decorrência da colostrogênese, como já citado anteriormente para os teores de proteína total e globulinas.

Com relação ao teor de IgG no soro colostrado, notou-se que, ao comparar os grupos V1 e V2, as vacas do subgrupo V1v apresentaram concentrações significativamente maiores que as vacas do subgrupo V2v, o mesmo ocorrendo com as vacas primíparas. Não foi verificada diferença significativa, no entanto, entre os teores de IgG colostrados de vacas primíparas e pluríparas dentro dos grupos experimentais (V1 e V2). Esses achados estão de acordo com o relatado por Rocha (2010), que também não notou diferença quanto aos teores de IgG no soro colostrado entre vacas primíparas e pluríparas da raça Canchim, mas são contrários ao relatado por Kehoe et al. (2011), que verificaram maior teor de IgG em vacas entrando na terceira ou quarta lactações que naquelas entrando na primeira ou segunda lactações. Entre momentos foi verificada diferença significativa entre as coletas do dia do parto e do primeiro dia pós-parto em ambos os grupos, quando o teor de IgG colostrado das vacas do subgrupo V1v foi significativamente maior que dos demais subgrupos.

Quanto às concentrações de IgA e IgG, assim como verificado para os teores séricos de proteína total e globulinas, as diferenças entre subgrupos verificadas no soro sanguíneo das vacas não mantiveram o mesmo padrão no colostro, uma vez que as vacas do grupo V1 apresentaram maiores teores colostrais dessas imunoglobulinas que as vacas do grupo V2, contrariamente ao que foi notado no soro sanguíneo. Gomes et al. (2011) verificaram maior teor de IgA e IgG em vacas de quatro ou mais parições, quando comparadas às vacas de primeira, segunda e terceira lactações, o mesmo sendo notado para os teores de IgA entre primíparas e pluríparas do grupo V1, mas não no grupo V2 (IgA); no primeiro dia de lactação, também entre os subgrupos V1n e V1v, mas não no grupo V2.

Aos 60 dias pré-parto, os **títulos séricos de IgG específica anti-BRV** das vacas foram significativamente maiores no subgrupo V2v, quando comparado aos subgrupos V1v e V2n, e foram maiores também no subgrupo V1v, quando comparado ao subgrupo V1n. Esse resultado permite afirmar que as vacas pluríparas, seja por exposição natural ao rotavírus, seja por vacinações anteriores contra esse patógeno, apresentaram exposição prévia ao agente estudado, no entanto, não é possível diferenciar anticorpos formados após exposição natural daqueles gerados após o estímulo vacinal.

Também foi constatado aumento significativo dos títulos de IgG específica anti-BRV apenas nas vacas do grupo V1 aos 30 dias pré-parto, ao seja, após a administração da primeira dose da vacina. Entre os subgrupos V1n e V1v, notou-se que, embora os títulos totais tenham sido significativamente maiores nas vacas pluríparas, quando comparadas às vacas primíparas, a resposta vacinal dos animais do subgrupo V1n consistiu em um aumento de 3 vezes do título de IgG, enquanto nas vacas do subgrupo V1v, esse aumento foi de 1,8 vezes, o que denota que, apesar de títulos totais menores, a resposta vacinal das vacas primíparas foi mais acentuada que a resposta vacinal das vacas pluríparas. Concordando com os achados do presente estudo, Crouch, Oliver e Francis (2001) relataram aumento significativo dos títulos de anticorpos séricos contra BRV em vacas vacinadas, quando comparadas às vacas não vacinadas, embora esses autores não tenham avaliado a influência do número de parições sobre esse parâmetro.

Segundo Parreño et al. (2004), concentrações séricas baixas de anticorpos anti-BRV retardam o desenvolvimento de resposta imune ativa nos bezerros, mas também não são suficientes para proteger os bezerros contra a infecção e doença, fatos esses que, associados à alta taxa de incidência de infecção por BRV em bovinos, indica claramente que bezerros nascidos de vacas não vacinadas são altamente susceptíveis à diarreia por esse agente. Esses autores não investigaram diferenças entre vacas primíparas e pluríparas, no entanto, com base nos resultados do presente estudo, é possível afirmar que bezerros filhos de vacas primíparas não vacinadas estão sob risco ainda maior de desenvolvimento de infecção por BRV, quando comparados aos filhos de vacas pluríparas. Obviamente, fatores relacionados ao manejo dos animais, como a pressão de infecção e o desafio também são determinantes na incidência de rotavirose nos rebanhos bovinos.

Da mesma maneira que para os teores de proteína total, globulinas, IgA e IgG determinadas pela técnica de SDS-PAGE, verificou-se diminuição dos títulos séricos de IgG anti-BRV por ocasião do parto quando comparado às coletas anteriores – embora estatisticamente essa redução só tenha sido significativa nas vacas pluríparas de ambos os grupos - o que decorre da transferência de imunoglobulinas do soro sanguíneo para o soro lácteo em razão da colostrogênese (BARRINGTON; PARISH, 2001).

Com relação aos títulos colostrais de IgG anti-BRV, verificou-se que as vacas do grupo V1 apresentaram valores significativamente maiores que as vacas do grupo V2 no dia do parto, e que a diminuição constatada no título dessa classe de imunoglobulina foi muito sutil no subgrupo V1v, quando comparado aos demais subgrupos, ao avaliar os momentos 0 e 1 de coleta de amostras de colostro. A implicação prática desse achado é que, uma vez que o fornecimento contínuo de colostro aos bezerros no decorrer da primeira semana de vida, seria uma das principais estratégias empregadas para a proteção efetiva contra diarreia, tanto por rotavírus quanto por outros enteropatógenos - já que garante uma maior concentração de imunoglobulinas na superfície da mucosa intestinal (SALMON, 1999) - o colostro de vacas pluríparas vacinadas mostrou-se mais adequado à tal prática, uma vez que manteve, em média, concentrações altas de IgG, mesmo no primeiro dia após o parto.

Segundo Fernandez et al. (1996) e Crouch, Oliver e Francis (2001), a concentração média de anticorpos neutralizantes no colostro e leite de vacas vacinadas foi significativamente maior do que o de vacas não vacinadas, o que está de acordo com os achados do presente estudo.

A correlação positiva e significativa entre os títulos de IgG verificados no soro sanguíneo das vacas aos 30 dias pré-parto e os títulos colostrais no momento 0 também foram relatados por Crouch, Oliver e Francis (2001), que afirmaram que vacas que apresentaram maior teor de anticorpos anti-BRV no soro sanguíneo, tenderam a apresentar maior concentração dessas imunoglobulinas no colostro e leite.

A análise das amostras de colostro mostrou-se muito mais adequada à avaliação da transferência de imunidade passiva que a avaliação de parâmetros séricos das vacas, uma vez que, na comparação entre subgrupos, nem sempre há uma relação direta entre os achados séricos e colostrais dos animais, embora essas análises tenham sido importantes para caracterizar a resposta vacinal das vacas frente à imunização ativa.

Dentre as **proteínas de fase aguda** avaliadas por meio da técnica de SDS-PAGE, os teores da ceruloplasmina foram os mais afetados pela parição, como pôde ser constatado pelo aumento significativo na sua concentração no momento 0, quando comparado aos 60 e 30 dias pré-parto em todos os subgrupos, exceto o V1v. As alterações mais marcantes foram verificadas nas vacas primíparas do grupo não vacinado. Silva (2009) e Bossaert et al. (2012) relataram aumento do teor de ceruloplasmina por ocasião do parto, quando comparado às coletas pré-parto, o que está de acordo com os resultados do presente estudo.

Sabe-se que o período de transição é uma fase na qual há aumento da susceptibilidade das vacas a enfermidades em decorrência da imunossupressão, com redução marcante da capacidade de resposta frente aos desafios infecciosos (MALLARD et al., 1998), o que aumenta a incidência de mastite, metrite, bem como de outras enfermidades. A ceruloplasmina é uma proteína de fase aguda moderada em bovinos e, dessa forma, o aumento da sua concentração já é esperado em decorrência da intensidade dos eventos fisiológicos e/ou patológicos que antecedem e acompanham o parto (ECKERSALL, 2008).

Outro fato importante a considerar é a constatação de que as vacas do subgrupo V2n apresentaram, desde o início das coletas, maiores teores séricos de ceruloplasmina, quando comparadas aos demais subgrupos. Esse fato pode ser atribuído à influência de diferenças ambientais e de manejo entre os rebanhos estudados, que poderia ocasionar um maior grau de exposição dessas vacas primíparas a processos inflamatórios no período periparto.

Verificou-se diminuição dos teores séricos de transferrina em ambos os grupos estudados por ocasião do parto, quando comparado às coletas de 60 e 30 dias pré-parto, o que também foi verificado por Silva (2009) e Saut et al. (2009). A diminuição dos teores de transferrina reduz a disponibilidade de ferro para a multiplicação de bactérias, o que é um efeito benéfico para o organismo do hospedeiro, diante da instalação de potenciais processos inflamatórios no período periparto (BOSSAERT et al., 2012).

Com relação à haptoglobina, Bossaert et al. (2012) também constataram aumento da concentração dessa PFA por ocasião do parto, que depois retornou aos teores basais normais. Esses mesmos autores, no entanto, destacaram que, embora a associação entre o aumento no teor dessa PFA e eventos de natureza inflamatória exista, esse composto está sujeito a flutuações consideráveis entre animais e entre diferentes momentos no mesmo animal. Schneider, Corrêa e Butler (2013) verificaram maiores teores séricos de haptoglobina em vacas primíparas que em vacas pluríparas no período pós-parto, evento que associaram a uma resposta mais acentuada ao estresse inflamatório associado ao parto em animais de primeira cria.

Os teores de α_1 -glicoproteína ácida não variaram de maneira significativa no período avaliado. Uma vez que, na maioria das espécies, a α_1 -glicoproteína ácida é uma PFA moderada, sua concentração aumenta de maneira mais lenta, mas também permanece elevada por mais tempo que as PFAs principais. Essa característica pode representar uma vantagem para o diagnóstico, uma vez que sua inclusão no perfil de PFAs pode fornecer informações a respeito das condições de saúde do animal, na medida em que elas evoluem de agudas a crônicas (ECKERSALL, 2008). A avaliação dos teores de α_1 -glicoproteína ácida, provavelmente, revelaria mais informações se realizada por um período mais

prolongado após o parto, como marcador da ocorrência de doenças relacionadas ao puerpério, como mastite, retenção de placenta e metrite.

A atividade de gamaglutamiltransferase (GGT) no soro lácteo das vacas foi maior no colostro das vacas primíparas, quando comparado às vacas pluríparas, em ambos os grupos, concordando com o descrito por Rocha (2010) em vacas da raça Canchim. Como esperado, a atividade de GGT não foi influenciada pelo tratamento (vacinação). Zanker, Hammon e Blum (2001) verificaram atividade de GGT semelhante aos resultados do presente estudo.

Experimento 2

Com relação à **idade de manifestação de diarreia**, embora sem diferença significativa, verificou-se que os bezerros do grupo B1 apresentaram diarreia com idade um pouco mais avançada que os bezerros do grupo B2. Esse achado já foi relatado anteriormente por Silva (2004), que, ao comparar bezerros que receberam colostro de vacas imunizadas ou não contra rotavírus bovino, verificou que os animais do rebanho vacinado manifestaram diarreia por rotavírus aos 14 dias de vida, enquanto os do rebanho não vacinado manifestaram diarreia aos 7 dias de vida. Esse autor, no entanto, não verificou diferença significativa entre os grupos vacinado e não vacinado quanto aos títulos de IgG específica anti-BRV. No presente estudo, a diferença significativa entre esses grupos quanto aos títulos de IgG específica anti-BRV poderia explicar a diferença na idade de manifestação de diarreia entre bezerros filhos de vacas vacinadas e não vacinadas.

O **leucograma** de bezerros ao nascimento, como relatado por Cole, Roussel e Whitney (1997), encontra-se sob influência do eixo pituitária-córtex da adrenal, que dá início ao parto e resulta em concentração elevada de cortisol plasmático, observada em neonatos. Dessa maneira, constatou-se que, assim como relatado por Knowles et al. (2000) e Benesi et al. (2012), a variação verificada na contagem de leucócitos nas primeiras semanas de vida dos bezerros refletiu a dinâmica dos neutrófilos segmentados que, por sua vez, foi influenciada pelos altos teores de cortisol plasmático liberados ao nascimento e pela adaptação à vida extrauterina, apresentando aumento no primeiro dia de vida, seguido por diminuição gradativa até

os 7 dias de idade, enquanto a contagem de linfócitos, influenciada pelos mesmos fatores, seguiu tendência inversa.

O aumento na contagem de leucócitos verificado aos 30 dias de vida, que foi acompanhado também pelo aumento nas contagens de neutrófilos segmentados e linfócitos, decorre da dinâmica característica da contagem de leucócitos em bezerros jovens, que, conforme observado em outros estudos (BRUN-HANSEN; KAMPEN; LUND, 2006; MOHRI; SHARIFI; EIDI, 2007; BENESI et al., 2012) aumenta no primeiro dia após o nascimento, diminui gradativamente e, por volta dos 30 dias de vida, volta a aumentar.

As contagens de neutrófilos bastonetes, eosinófilos e basófilos foram esporádicas nos esfregaços sanguíneos de bezerros de ambos os grupos, em especial nos primeiros dias de vida, provavelmente em decorrência do leucograma de estresse, característico do período neonatal, como descrito anteriormente (COLE; ROUSSEL; WHITNEY, 1997) não sendo constatada influência do tratamento sobre esses parâmetros. Mohri, Sharifi e Eidi (2007) não verificaram influência da idade sobre a contagem de neutrófilos bastonetes, mas sim sobre a contagem de eosinófilos, que foi significativamente menor aos 14 e 28 dias de idade, quando comparados às primeiras 48 horas de vida. A ausência de basófilos nos esfregaços sanguíneos de bezerros sadios é comum, e já foi relatada por Cole, Roussel e Whitney (1997).

A contagem de monócitos verificada no presente estudo foi significativamente menor que a relatada por Benesi et al. (2012) em bezerros da raça Holandesa na mesma faixa etária. Já Mohri, Sharifi e Eidi (2007) não verificaram influência da idade sobre as contagens de monócitos. A maior contagem de monócitos nos bezerros do grupo B2, quando comparado ao grupo B1, provavelmente decorre de diferenças quanto ao manejo e o desafio aos quais esses animais foram submetidos, por se tratarem de bezerros oriundos de propriedades diferentes.

Exceto pela contagem de monócitos, não foi constatada influência do tratamento sobre os parâmetros analisados.

A avaliação da eficácia da **transferência de imunidade passiva** colostrar pode ser verificada por meio de uma série de parâmetros séricos, como a atividade

de gamaglutamiltransferase, o teor de proteína total, o teor de globulinas, ou a concentração de IgG às 24 ou 48 horas de vida (ROCHA et al., 2012).

Constatou-se aumento significativo da **atividade de GGT** após a ingestão do colostro em ambos os grupos, seguido por diminuição gradativa até os 30 dias de vida. A atividade de GGT no colostro bovino é alta, e essa enzima é absorvida pelo bezerro nas primeiras horas de vida. A constatação de que a atividade sérica de GGT foi maior em bezerros filhos de vacas primíparas, quando comparados a filhos de vacas pluríparas, o que já foi relatado por Rocha et al. (2012) em bezerros mestiços Canchim-Nelore, reflete os resultados encontrados na avaliação da atividade de GGT no soro colostrado das vacas. Como esperado, a vacinação não influenciou a atividade de GGT nos grupos.

Segundo Perino, Sutherland e Woollen (1993), atividade de GGT sérica inferior à 200 U/L em bezerros poderia ser empregada como indicador de falha na transferência de imunidade passiva (FTIP). Os valores observados nos quatro subgrupos a partir do momento 1 mostram que, de acordo com o relatado pelos autores supracitados, todos os bezerros do presente estudo ingeriram volume de colostro suficiente para transferência de imunidade passiva adequada, independente do grupo.

Os teores séricos de **proteína total, globulinas e de IgA e IgG determinadas por SDS-PAGE** nos bezerros aumentaram significativamente após a ingestão do colostro, e seguiram tendências semelhantes na avaliação entre grupos e subgrupos, sendo maiores em bezerros filhos de vacas pluríparas que em filhos de vacas primíparas, e maiores em filhos de vacas vacinadas quando comparados a filhos de vacas não vacinadas. Entre momentos, constatou-se tendência semelhante quanto aos teores séricos de proteína total, globulinas e IgG, que aumentaram significativamente após a ingestão do colostro, decrescendo gradativamente até os 30 dias de vida.

Rocha et al. (2010) verificaram diferença entre os teores de globulinas de filhos de vacas primíparas e pluríparas da raça Canchim com um dia de vida, mas não em animais da raça Holandesa, o que difere dos achados do presente estudo.

Segundo a compilação de dados apresentada por Feitosa et al. (2010), concentrações séricas de IgG maiores que 1.600 mg/dL são consideradas

adequadas à TIP, dessa forma, em média, os bezerros de todos os subgrupos do presente experimento encontravam-se protegidos por imunoglobulinas de origem colostrar às 24 horas de vida. Esses mesmos autores constataram que bezerros da raça Holandesa, filhos de vacas primíparas, apresentavam teores séricos de IgG e proteína total menores que os bezerros filhos de vacas pluríparas às 24 horas de vida, o que está de acordo com os achados desse estudo, embora no grupo B2 não tenha sido verificada diferença significativa entre subgrupos.

Teixeira et al. (2012), avaliando a TIP em bezerros das raças Holandesa preto e branco, constatou que o pico de concentração de IgG ocorreu às 24-36 horas de idade, seguido por diminuição gradual e contínua dos teores dessa imunoglobulina até os 30 dias de vida, quando foi constatada sua menor concentração, o que está de acordo com os resultados do presente estudo. Essa dinâmica dos teores de IgG de origem colostrar já é bem estabelecida, e decorre do catabolismo das imunoglobulinas de origem colostrar no decorrer do primeiro mês de vida dos bezerros.

Entre momentos, constatou-se que as concentrações séricas de IgA aumentaram gradativamente no decorrer do período experimental. A forma secretória dessa imunoglobulina representa a primeira linha de defesa das mucosas e atua limitando a invasão de patógenos, enquanto a **IgA sérica** atua como uma segunda linha de defesa, eliminando patógenos que conseguiram romper a barreira da superfície mucosa (SNOECK; PETERS; COX, 2006). Dessa maneira, o aumento gradual dos teores séricos de IgA reflete a reação do organismo dos bezerros à colonização das mucosas por microrganismos aos quais os animais são expostos após o nascimento. Ainda, os maiores teores de IgA nos animais do grupo vacinado (B1) podem indicar o maior desafio natural ao qual esses bezerros, provavelmente, foram submetidos, uma vez que têm origem em rebanho muito maior.

Com relação aos **títulos séricos de imunoglobulina G específica anti-rotavírus**, ao nascimento e antes da ingestão do colostro, os bezerros não apresentavam títulos séricos de IgG anti-BRV, o que era esperado em decorrência da ausência de transferência de imunoglobulinas através da barreira placentária em bovinos (BARRINGTON; PARISH, 2001). No momento 1, após a ingestão do colostro, notou-se aumento significativo dos títulos dessa classe de imunoglobulina

em decorrência da transferência de imunidade passiva colostrar, e os títulos séricos verificados nos bezerros filhos de vacas pluríparas vacinadas foram maiores que os títulos verificados em filhos de vacas primíparas vacinadas, bem como também foram maiores que os títulos de filhos de vacas pluríparas não vacinadas. Os menores títulos foram verificados em bezerros filhos de vacas primíparas não vacinadas. Essa dinâmica refletiu os achados no colostro das vacas.

Crouch, Oliver e Francis (2001), avaliando concentrações de anticorpos neutralizantes anti-rotavírus no colostro e leite de vacas vacinadas e não vacinadas e no soro sanguíneo de bezerros, verificaram que neonatos que receberam colostro de vacas vacinadas apresentaram maiores concentrações séricas de imunoglobulinas que aqueles que receberam colostro de vacas não vacinadas. O mesmo foi descrito por Parreño et al. (2004), e esses resultados estão de acordo com os achados do presente estudo, o que indica que a vacinação das mães aumentou de forma significativa os teores de imunoglobulinas específicas anti-BRV transferidas passivamente aos bezerros por meio da ingestão do colostro. Contrariamente, a isso, Silva (2004) não notou diferença significativa entre os títulos de IgG específica anti-BRV entre bezerros filhos de vacas imunizadas e não imunizadas com vacina comercial contra rotavírus, embora os títulos colostrais de IgG tenham sido maiores em vacas do grupo vacinado, quando comparado ao grupo não vacinado, o que mostra as discrepâncias observadas nos relatos de experimentos de campo, como descrito anteriormente.

Entre momentos, constatou-se aumento do título sérico de IgG em ambos os grupos após a ingestão do colostro, seguido por diminuição gradativa até os 30 dias de vida. Essa dinâmica é ocasionada pelo catabolismo normal das imunoglobulinas de origem colostrar, e também foi verificada na avaliação dos teores séricos de proteína total, globulinas e IgG determinada pela técnica de SDS-PAGE.

As concentrações de **cálcio ionizado** verificadas no decorrer do período experimental foram, de maneira geral, maiores nos bezerros do grupo B2, quando comparados aos animais do grupo B1. A faixa de variação desse parâmetro entre momentos foi pequena dentro dos subgrupos, e os valores constatados permaneceram abaixo do limite de referência para bovinos adultos, que é estabelecido entre 1,20 e 1,60 mMol/L (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Garel e

Barlet (1976) relataram que a concentração de PTH de bezerros neonatos foi similar à das suas mães, e que as concentrações plasmáticas de calcitonina, um hormônio responsável pela diminuição dos teores séricos de cálcio, aumentaram significativamente entre 24 e 60 horas de vida. Segundo esses mesmos autores, os teores de cálcio em neonatos acompanham a diminuição dos teores séricos de cálcio de suas mães, um fenômeno já bem descrito em vacas leiteiras de alta produção (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2007).

Nossos achados estão de acordo, ainda, com o relatado por Ježek; Klopčič e Klinkon (2006) e Mohri, Sharifi e Eidi (2007), que relataram que os teores de cálcio foram maiores às 24-48 horas de vida quando comparados às semanas subsequentes.

Embora tenham sido verificadas diferenças entre grupos e entre momentos quanto aos teores séricos de **cloretos, sódio e potássio**, os valores constatados no presente estudo mantiveram-se nos limites do intervalo de referência para a espécie bovina (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Mohri, Sharifi e Eidi (2007) não verificaram efeito da idade sobre as concentrações séricas de cloretos e sódio em bezerros, do nascimento aos 84 dias de vida. Com relação à concentração de potássio, os resultados do presente estudo diferem do relatado por Ježek, Klopčič e Klinkon (2006), que verificaram uma oscilação maior dos teores desse eletrólito em bezerros, em especial entre a segunda e sexta semanas de vida. Piccione et al. (2010) também não verificaram influência significativa da idade sobre os teores de sódio em bezerros, do nascimento aos 30 dias de vida.

Os teores séricos de **ureia** verificados no decorrer do período experimental estão de acordo com o relatado por Knowles et al. (2000) e, como esperado, não foram influenciados pelos tratamentos.

As concentrações séricas de **creatinina**, que diminuíram de forma marcante entre o nascimento e os 30 dias de vida, apresentaram dinâmica característica do período neonatal, que mostra a adaptação pela qual os animais estão passando para a manutenção da homeostase, e pode revelar o aumento na capacidade de depuração renal, bem como alterações da massa muscular (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Com relação às **proteínas de fase aguda positivas**, de maneira geral, verificaram-se maiores concentrações de ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína ácida nos bezerros do grupo B2, quando comparados aos animais do grupo B1. Esse resultado pode ser atribuído às diferenças entre as propriedades estudadas quanto ao tamanho do rebanho, manejo e exposição natural a patógenos. Rocha (2010) constatou que bezerros mestiços Canchim-Nelore filhos de vacas primíparas apresentaram menor teor de α_1 -glicoproteína ácida um dia após o nascimento, quando comparados aos bezerros filhos de vacas pluríparas, e esses resultados estão de acordo com o verificado no Grupo B1, mas não no Grupo B2.

Os teores séricos de **transferrina**, contrariamente ao aumento verificado nas concentrações e ceruloplasmina a partir dos 15 dias de vida, diminuíram no mesmo período, o que pode ser justificado pelo fato de que, por se tratar de uma PFA negativa, a concentração de transferrina diminuiu frente à fase aguda da resposta inflamatória (ECKERSALL, 2008).

Na avaliação das **fezes** dos bezerros, constatou-se que 93,03% das amostras coletadas no período experimental apresentavam-se normais, enquanto 6,97% apresentavam-se diarreicas. Bartels et al. (2010), avaliando a prevalência e os fatores de risco para a presença de enteropatógenos em fezes normais e diarreicas de 424 bezerros com 1 a 3 semanas de idade na Holanda, verificaram que a prevalência de fezes de consistência normal foi de 57,1%, de fezes semilíquidas foi de 23,8% e de fezes líquidas foi de 19,1%. No presente estudo, considerando-se a mesma faixa etária, os percentuais encontrados foram de 91,4%, 6,46% e 2,14%, respectivamente. Esses mesmos autores relataram que a porcentagem de bezerros com fezes diarreicas na segunda semana de vida foi maior que de animais nas mesmas condições com 1 e 3 semanas de idade, achado semelhante ao do presente estudo, no qual constatou-se que, nos bezerros com duas semanas de vida, o percentual de fezes diarreicas chegou a 13,1%, valor superior ao encontrado nas demais faixas etárias (que variaram de 4,22% à 8,51%).

A técnica de **PAGE** para detecção de rotavírus nas fezes revelou que apenas uma (2,43%) dentre as 41 amostras de consistência líquida coletadas, foi positiva para a detecção desse vírus, embora, segundo Cho et al. (2013), o rotavírus bovino tenha sido o único agente etiológico de enterite neonatal bovina associado de forma

significativa com a presença de fezes líquidas. Esse achado denota que as demais amostras de consistência líquida foram resultado de enterites de outras etiologias, o que contraria o relatado por Cho et al. (2013).

Oliveira Filho et al. (2007) e Cho et al. (2013) constataram a presença de rotavírus apenas em fezes diarreicas. No presente estudo, a presença desse enteropatógeno foi verificada tanto em fezes de consistência normal quanto em fezes diarreicas, o que concorda com o relatado por Alfieri et al. (2006) e Freitas et al. (2011).

Com relação à faixa etária, Nourmohammadzadeh et al. (2012) relataram que a maior taxa de prevalência da infecção por rotavírus foi verificada em bezerros com idade entre 2 e 4 semanas, e a menor em animais na primeira semana de vida, o que está de acordo com os achados do presente estudo, uma vez que, à exceção de um animal, os bezerros manifestaram diarreia por rotavírus no intervalo entre 7 e 15 dias de vida.

No presente estudo, notaram-se diferenças não só entre as estirpes de rotavírus presentes no rebanho vacinados (Subgrupos B1n e B1v) e não vacinado (Subgrupos B2n e B2v), bem como entre as cepas encontradas na vacina comercial e aquelas verificadas a campo. As estirpes presentes na vacina comercial empregada no presente estudo (G6P[1] e G10P[11]), não corresponderam ao sorotipo encontrado na propriedade, o que explica a ineficácia na proteção dos animais que receberam colostro de vacas vacinadas contra a enfermidade.

O sorotipo de rotavírus encontrado na propriedade que pratica a imunização (G6P[11]) pode ser decorrente de um rearranjo genômico, induzido como forma de adaptação do vírus frente à imunidade do rebanho conferida pela vacinação (STEELE; GEYER; GERDES, 2004), e justifica, associado à maior pressão de infecção decorrente do tamanho do rebanho e, provavelmente, do maior grau de exposição ao agente patogênico, a maior ocorrência de infecção por BRV no rebanho vacinado quando comparado ao rebanho não vacinado, ainda que os títulos de IgG séricos específicos anti-BRV tenham sido significativamente maiores nos animais do Grupo B1.

Parreño et al. (2004) afirmaram que o efeito protetor de altos títulos séricos de anticorpos anti-BRV reduz significativamente a diarreia por BRV, mas não a

eliminação do vírus, o que ajuda a explicar por que as vacinas comerciais utilizadas atualmente não são eficazes na prevenção da infecção por rotavírus, embora reduzam significativamente a morbidade, gravidade da diarreia e a mortalidade em situações de campo.

Quando é verificada resposta do animal à vacinação, mas, ainda assim, esse procedimento não confere proteção, as causas de falha vacinal são decorrentes de uma série de fatores, como a administração tardia da vacina, a utilização de uma cepa errada do microrganismo ou a utilização de antígenos não protetores (TIZARD, 2009). No presente experimento, em razão da estratégia de proteção empregada se basear na transferência passiva de imunoglobulinas das vacas para os bezerros por meio do colostro, a falha vacinal decorre da utilização de antígenos não protetores.

Segundo Ishizaki et al. (1996), Falcone et al. (1999) e Gulati et al. (1999), à exceção das cepas G10P[11]; G6P[5] e G6P[1], o genótipo G6P[11] consiste na associação genotípica mais relatada em bezerros com diarreia em estudos realizados em todo o mundo, inclusive no Brasil (BARREIROS et al., 2004; SILVA et al., 2012).

Barreiros et al. (2004) apontou que, embora o genótipo G6P[1] seja encontrado na maioria das vacinas comerciais, como é o caso da vacina empregada no presente estudo, o genótipo mais prevalente em vários locais do mundo, inclusive no Brasil, é o G6P[5]. A implicação desse fato é que os BRVs que apresentam genótipos similares às cepas de referência são detectados, na maioria das ocasiões, em amostras de fezes provenientes de bezerros diarreicos de propriedades que não praticam rotineiramente a vacinação do rebanho. Além disso, segundo esses mesmos autores, embora o uso de vacinas resulte em boa produção de anticorpos homotípicos, ela é deficiente na indução de proteção cruzada, bem como tem a tendência de induzir o surgimento de estirpes recombinantes, o que dificultaria os programas de controle que empregam vacinas que não contêm o genótipo específico circulante em determinada região.

Experimento 3

Em razão da variabilidade na idade de início da manifestação de diarreia entre animais, destaca-se a importância do acompanhamento diário de bezerros a campo, uma vez que a coleta de amostras em momentos pré-estabelecidos pode subestimar a ocorrência e a excreção de agentes patogênicos no ambiente e, dessa forma, a exposição de animais susceptíveis aos patógenos presentes na propriedade.

O **leucograma** dos bezerros alocados nos grupos A, B e C, do nascimento aos 30 dias de vida, seguiu a mesma dinâmica verificada para os animais alocados nos grupos B1 e B2, do Experimento 2.

Constatou-se que no primeiro dia de manifestação de diarreia, os bezerros positivos para detecção de rotavírus nas fezes (grupo C) apresentaram maior contagem de leucócitos que os animais que apresentaram diarreia, mas foram negativos quanto à detecção de rotavírus (grupo B). Embora diferença significativa entre grupos tenha sido constatada apenas no primeiro dia de manifestação de diarreia, ela se manteve por todo o período de observação.

Segundo Jain (1986), apenas contagens de leucócitos acima de 13.800 células/ μ L são consideradas excessivas, no entanto, a diferença verificada entre os grupos B e C no primeiro dia de manifestação de diarreia indica que esse agente promoveu uma maior agressão aos tecidos do hospedeiro, em especial a mucosa intestinal, ocasionando uma reação leucocitária mais exacerbada que os demais patógenos causadores de diarreia em bezerros com a mesma faixa etária. Essa resposta leucocitária se confirma pelos achados da contagem de neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados e linfócitos, que foram maiores no grupo C que no Grupo B, considerando o mesmo período de avaliação.

A ausência de diferença significativa quanto à contagem de leucócitos entre os grupos B e C no sétimo dia de manifestação de diarreia decorre de uma particularidade do método estatístico utilizado para avaliar os dados, uma vez que, no grupo C, esse valor reflete a contagem de leucócitos de um único animal, como pode ser verificado pelos dados do Quadro 7.

A maior **atividade sérica de GGT** nos bezerros dos grupos A e B, quando comparados aos animais do grupo C, é um indicativo indireto da melhor taxa de transferência de imunidade passiva nesse grupo, uma vez que foi verificada correlação positiva e significativa entre os teores de proteína total e a atividade dessa enzima após a ingestão do colostro (ROCHA, 2010). Essa hipótese é reforçada pelo fato de que a atividade de GGT no soro lácteo das vacas, contrariamente ao que seria esperado, foi menor no grupo A que nos grupos B e C, embora sem diferença significativa entre eles (Apêndice D). A cinética da atividade sérica dessa enzima no decorrer do primeiro mês de vida dos bezerros dos grupos A, B e C assemelhou-se àquela verificada nos grupos B1 e B2.

Assim como constatado na comparação entre os Grupos A, B e C, a maior atividade sérica de GGT nos bezerros do grupo B nos momentos de manifestação de diarreia indica uma melhor taxa de transferência de imunidade passiva nos animais desse grupo quando comparados aos bezerros do grupo C.

Do nascimento aos 30 dias de vida, com relação aos demais parâmetros de avaliação de transferência de imunidade passiva, constatou-se que os teores séricos de **proteína total, globulinas e IgG** foram sempre menores nos bezerros do grupo C, quando comparados aos bezerros dos grupos A e B, inclusive com diferença significativa quanto ao teor de globulinas no momento 2, e ao teor de IgG nos momentos 1 e 2. Não foram verificadas diferenças quanto a esses mesmos parâmetros no soro lácteo das vacas no dia do parto (Apêndice D), o que significa que, seja pelo tempo transcorrido entre o nascimento e a ingestão do colostro, seja pelo volume de colostro ingerido, seja por alterações individuais quanto à capacidade de absorção de imunoglobulinas colostrais, os bezerros do grupo C apresentaram uma TIP menos eficiente, quando comparados aos bezerros dos grupos A e B. É importante salientar, no entanto, que segundo Feitosa et al. (2010), os bezerros dos três grupos apresentaram TIP adequada, como revelado pelos teores de IgG sérica no momento 1.

Não foi verificada diferença entre os grupos A, B e C com relação às médias da concentração sérica de **IgA** determinada pela técnica de SDS-PAGE, do nascimento aos 30 dias de vida, assim como não foi constatada diferença significativa entre grupos ao avaliar o teor de IgA no soro colostrais das vacas no dia

do parto. Entre momentos, constatou-se a mesma tendência de aumento gradativo dos teores de IgA a partir da ingestão do colostro até os 30 dias de vida, observada na comparação entre os grupos B1 e B2. É interessante notar, no entanto, que nos bezerros do grupo C a partir dos 15 dias de vida, houve diminuição da concentração dessa imunoglobulina, enquanto nos grupos A e B os teores de IgA aumentaram.

Com relação aos momentos de manifestação de diarreia, não foi constatada diferença entre os grupos B e C. Ávila (2009) também não constatou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos de bezerros infectados experimentalmente com *Salmonella* Typhimurium no decorrer de seis dias de avaliação.

Contrariamente ao que seria esperado, os **títulos séricos de IgG específica anti-BRV**, determinados pela técnica de EIE indireto, não diferiram significativamente entre os grupos A, B e C, do nascimento aos 30 dias de vida, bem como não foi verificada diferença entre os títulos de IgG anti-BRV no soro colostrado das vacas dos grupos A, B e C no dia do parto. Uma vez que a maioria dos bezerros acometidos por BRV era proveniente do rebanho vacinado ($n = 5$), é interessante notar que a semelhança entre grupos quanto a esse parâmetro ratifica a afirmação de outros autores (PARREÑO et al., 2004; SILVA et al., 2008), de que a imunidade passiva adquirida por meio da ingestão do colostro contendo altos títulos de imunoglobulinas específicas anti-BRV não evita a ocorrência de infecção, mas pode ter efeitos benéficos, como o retardo na eliminação do vírus e menor gravidade de infecção nos animais afetados.

O Grupo C, conforme mostrado no Quadro 3, foi composto por bezerros provenientes tanto do rebanho vacinado ($n=5$) quanto do rebanho não vacinado ($n=3$). Uma vez que a propriedade que praticava vacinação regular do rebanho era muito maior que a propriedade que não praticava vacinação, a uniformidade na distribuição dos grupos quanto à origem dos animais e o maior grau de desafio ao qual os bezerros foram expostos pode explicar essa ausência de diferença. Freitas et al. (2011), avaliando fatores de risco e a prevalência de rotavírus em rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo, afirmaram que a maioria das amostras positivas se concentrou em rebanhos maiores, o que pode ser explicado pelo menor intervalo

entre partos, associado à maior pressão de infecção à qual os animais são submetidos em rebanhos com tais características.

Os teores séricos de **cálcio ionizado** dos bezerros dos grupos A, B e C, do nascimento aos 30 dias de vida, assim como verificado para os animais dos grupos B1 e B2, foram menores que o intervalo considerado normal para bovinos adultos, que varia de 1,20 a 1,60 mMol/L (RADOSTITS et al., 2007). A justificativa para tal achado encontra-se na discussão do Experimento 2.

Ao avaliar o período de manifestação de diarreia, constatou-se que os bezerros do grupo B apresentaram teor de cálcio ionizado maior que os bezerros do grupo C no decorrer dos 7 dias de observação, embora diferença significativa tenha sido constatada apenas no primeiro dia. Da mesma forma que apontado para a contagem de leucócitos, a concentração de cálcio ionizado dos bezerros do grupo C, no sétimo dia de manifestação de diarreia, como consequência do tratamento estatístico utilizado, refletiu o resultado de apenas um animal. Os teores séricos das frações de cálcio são afetados pelo pH sanguíneo, uma vez que, na acidose, uma parcela maior do cálcio circulante não está ligada à albumina, o que ocasiona um aumento proporcional na concentração de cálcio ionizado (RUSSEL; ROUSSEL, 2007).

Foi constatada diferença significativa entre grupos quanto ao teor sérico de **cloretos** ao nascimento, com maior concentração no grupo A, quando comparado ao grupo C. A concentração desse parâmetro nos grupos A e B permaneceu no intervalo de referência estabelecido para bovinos adultos, que varia de 97 a 111 mMol/L (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Piccione et al. (2010) constataram concentração de cloretos semelhantes às do presente estudo ao avaliarem bezerros saudáveis no decorrer do primeiro mês de vida, e afirmaram não haver influência do momento de coleta sobre esse parâmetro, o que foi constatado nos grupos A e B.

Durante os momentos de manifestação de diarreia verificou-se que o teor sérico de cloretos foi menor no grupo C quando comparado ao grupo B, embora apenas no segundo dia de manifestação de diarreia essa diferença tenha sido significativa. Segundo Carlson (2008), alterações modestas no estado de hidratação tendem a produzir mudanças proporcionais nos teores séricos de cloretos, o que poderia explicar as diferenças entre grupos verificadas no presente estudo.

Independentemente das variações verificadas entre grupos e entre momentos quanto aos teores séricos de **sódio**, a concentração desse eletrólito manteve-se dentro do intervalo considerado normal para a espécie, que varia de 132 a 152 mMol/L, tanto em bezerros quanto em animais adultos (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; PICCIONE et al., 2010). Nos momentos de manifestação de diarreia, não foi verificada diferença significativa entre os grupos B e C, e os valores verificados mantiveram-se no intervalo considerado normal para a espécie (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Os teores séricos de **potássio** em bovinos variam de 3,9 a 5,8 mMol/L (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008), dessa forma, a concentração desse eletrólito manteve-se no intervalo considerado normal para a espécie no decorrer de todo o período experimental, inclusive nos momentos de manifestação de diarreia.

Com relação à concentração de **ureia**, os valores constatados no presente estudo estão de acordo com o relatado por Knowles et al. (2000) em bezerros. A ureia constitui a principal forma de eliminação do nitrogênio do organismo dos mamíferos. Após sua síntese, ela é distribuída livremente no compartimento corporal, bem como é livremente filtrada pelos glomérulos renais e reabsorvida do túbulo coletor. Sua reabsorção passiva aumenta quando o fluxo de urina nos túbulos é reduzido (BRAUN, 2008), dessa forma, uma vez que não foi verificado aumento do teor de ureia no decorrer do período experimental, conclui-se que a diarreia verificada nos Grupos B e C não afetou de forma significativa o estado de hidratação dos bezerros avaliados.

Os teores séricos de **creatinina** dos bezerros dos grupos A, B e C, do nascimento aos 30 dias de vida, seguiram a mesma cinética característica do período neonatal, constatada nos grupos B1 e B2.

Com relação às **proteínas de fase aguda**, no decorrer do primeiro mês de vida, o maior teor de **ceruloplasmina** verificado no grupo C, quando comparado aos grupos A e B aos 7 e 15 dias de vida pode ser um indicador de maior estímulo à produção dessa PFA diante da diarreia induzida por rotavírus, quando comparada a diarreia induzida por outros patógenos. O fato de que, durante o episódio de manifestação de diarreia, constatou-se que o teor de ceruloplasmina foi maior nos

bezerros do grupo C, quando comparados aos bezerros do grupo B, corrobora essa justificativa.

A utilização da ceruloplasmina como marcador diagnóstico em bovinos permanece menos comum que das demais PFAs, no entanto, alguns estudos mostram que essa ferroxidase é um indicador de infecção em bovinos (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Em estudos a respeito de outras causas infecciosas de diarreia, Ávila (2009) verificou aumento do teor sérico de ceruloplasmina em bezerros infectados experimentalmente com *Salmonella* Typhimurium no decorrer do período experimental, bem como Silva et al. (2011), que verificaram aumento do teor sérico de ceruloplasmina a partir de 24 horas após a infecção experimental de bezerros com *Salmonella* Dublin.

Na avaliação dos grupos A, B e C do nascimento aos 30 dias de vida, a concentração de **transferrina**, embora sem diferença significativa - à exceção dos 30 dias de vida - foi mais alta nos bezerros do grupo C, quando comparados aos demais grupos. O mesmo foi verificado na comparação entre os grupos B e C, nos momentos de manifestação de diarreia. Embora seja considerada uma proteína de fase aguda negativa, o que significa que sua concentração tende à diminuir quando há uma reação inflamatória aguda, o aumento verificado na concentração dessa PFA pode estar relacionado à etiologia da diarreia, uma vez que seu mecanismo de ação é mais importante diante de enfermidades de origem bacteriana, na qual o sequestro de íons férricos evita que os patógenos utilizem esses íons como nutriente (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

Não foi notada diferença entre grupos quanto ao teor sérico de **haptoglobina** nos grupos A, B e C, do nascimento aos 30 dias de vida. Os valores verificados e a cinética dessa PFA após o nascimento corroboram o relatado por Orro et al. (2008). No presente estudo, o aumento verificado nas concentrações de haptoglobina nos animais acometidos por diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (Grupos B e C) foi muito discreto, o que pode indicar que os agentes etiológicos que afetaram os animais dos grupos B e C não ocasionaram estímulo suficiente para deflagrar uma resposta da haptoglobina.

Os teores de **α_1 -glicoproteína ácida** não diferiram significativamente entre os grupos A, B e C no decorrer do primeiro mês de vida, bem como não diferiram entre os grupos B e C nos dias de manifestação de diarreia.

Segundo Orro et al. (2008), a ingestão do colostro é o principal estímulo externo ao aumento do teor de PFA's em bezerros neonatos, uma vez que essa secreção contém altos teores de citocinas pró-inflamatórias, conhecidas por serem os principais indutores da produção hepática de PFAs, o que justifica o aumento das concentrações de haptoglobina, transferrina e α_1 -glicoproteína ácida a partir do momento 1, nos três grupos avaliados.

A discussão da avaliação das fezes encontra-se no Experimento 2.

6 CONCLUSÕES

A imunização de vacas ao final da gestação com vacina comercial inativada contra rotavírus aumentou significativamente os títulos de IgG específica anti-BRV no soro sanguíneo e no soro colostrar desses animais, sendo os títulos de IgG maiores em vacas pluríparas que em vacas primíparas.

No soro lácteo, a imunização influenciou os teores de proteína total e IgG, que foram maiores em vacas vacinadas que nas vacas não vacinadas, e o número de parições também influenciou esse parâmetro, uma vez que o teor de proteína total e IgG foram maiores em vacas pluríparas que em vacas primíparas.

O puerpério influenciou significativamente as concentrações de imunoglobulinas e proteínas de fase aguda no soro sanguíneo das vacas, sendo que os teores de IgA, IgG e transferrina diminuíram significativamente por ocasião do parto, enquanto os teores de ceruloplasmina aumentaram.

Os títulos de imunoglobulina G específica anti-BRV no soro sanguíneo dos bezerros aumentaram significativamente após a ingestão do colostro, diminuindo então gradativamente até os 30 dias de vida, e foram maiores em filhos de vacas pluríparas quando comparados à filhos de vacas primíparas.

O leucograma, os parâmetros bioquímicos e o proteinograma avaliados seguiram o padrão típico verificado para a faixa etária em estudo.

Foram identificados bezerros infectados por rotavírus tanto no rebanho vacinado quanto no rebanho não vacinado, logo, a imunização pré-parto das vacas e a transferência de imunidade passiva de imunoglobulinas anti-BRV não protegeu de maneira efetiva os bezerros contra diarreia.

O genótipo de rotavírus que infectou os bezerros do grupo vacinado foi diferente do sorotipo encontrado na vacina, ou seja, a imunidade cruzada não é efetiva na proteção de bezerros contra diarreia por BRV.

O leucograma dos bezerros foi influenciado pela ocorrência de diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, contrariamente à maior parte dos parâmetros bioquímicos avaliados.

A atividade de GGT e os teores de proteína total, globulinas e IgG determinada pela técnica de SDS-PAGE foram menores nos bezerros que

apresentaram diarreia por rotavírus que nos animais que não apresentaram diarreia, ou que apresentaram diarreia de outras etiologias.

A concentração de ceruloplasmina foi significativamente maior nos animais que apresentaram diarreia por BRV do que nos animais que apresentaram diarreia de outras etiologias, o que indica que essa PFA é um bom marcador da ocorrência de rotavirose em bezerros.

Os títulos de IgG específica anti-BRV não diferiram significativamente entre os bezerros que apresentaram diarreia por rotavírus e os animais que não apresentaram diarreia, ou que apresentaram diarreia de outras etiologias no decorrer do primeiro mês de vida.

7 REFERÊNCIAS¹⁶

ABE, M.; ITO, N.; MORIKAWA, S.; TAKASU, M.; MURASE, T.; KAWASHIMA, T.; KAWAI, Y.; KOHARA, J.; SUGIYAMA, M. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: isolation of a novel bovine rotavirus bearing a new P and G genotypes. **Virus Research**, Amsterdam, v. 144, n. 1-2, p. 250-257, 2009.

ACRES, S. D.; BABIUK, L. A. Studies on rotaviral antibody in bovine serum and lacteal secretions using radioimmunoassay. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 173, n. 5, p. 553-559, 1978.

ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; BARREIROS, M. A. B.; LEITE, J. P. G.; RICHTZENHAIN, L. J. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 3-4, p. 167-173, 2004.

ALFIERI, A. A.; PARAZZI, M. E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 38, n. 7-8, p. 521-526, 2006.

ALKAN, F.; OZKUL, A.; OGUZOGLU, T. C.; TIMURKAN, M. O.; CALISKAN, E.; MARTELA, V.; BURGU, I. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997–2008. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n. 3-4, p. 231–237, 2010.

ÁVILA, L.G. **Estudo clínico, laboratorial e terapêutico da diarreia experimental em bezerros induzida por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium**. 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

BADARACCO, A.; GARAICOECHEA, L.; RODRÍGUEZ, D.; LOUGE URIARTE, E.; ODEÓN, A.; BILBAO, G.; GALARZA, R.; ABDALA, A.; FERNANDEZ, F.; PARREÑO, V. Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 158, n. 3-4, p. 394-399, 2012.

¹⁶ ABNT – NBR 6023/2002

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JUNIOR, W. **AgroEstat** - Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos, versão 1.0, 2008.

BARREIROS, M. A. B.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C.; LEITE, J. P. G.; ALFIERI, A. A. G and P genotypes of Group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against NCDV (P[1], G6) rotavirus strain. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlin, v. 51, p. 104-109, 2004.

BARRINGTON, G. M.; PARISH, S. M. Bovine neonatal immunology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 17, n. 3, p. 463-476, 2001.

BARTELS, C. J. M.; HOLZHAUER, M.; JORRITSMA, R.; SWART, W. A. J. M.; LAM, T. J. G. M. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of Young Dutch dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 93, n. 2-3, p. 162-169, 2010.

BENESI, F. J.; TEIXEIRA, C. M. C.; LEAL, M. L. R.; LISBOA, J. A. N.; MIRANDOLA, R. M. S.; SCHECAIRA, C. L.; GOMES, V. G. Leukograms of healthy calves within the first month of life. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 32, n. 4, p. 352-356, 2012.

BESSER, T. E.; GAY, C. C.; MCGUIRE, T. C.; EVERMANN, J. F. Passive immunity to bovine rotavirus infection associated with transfer of serum antibody into the intestinal lumen. **Journal of Virology**, Washington, v. 62, n. 7, p. 2238-2242, 1988.

BIRGEL JÚNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H. Valores de referência do leucograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 136-141, 2001.

BIRGEL JÚNIOR, E. H.; NEVES, F. S.; SALVATORE, L. C. A.; MIRANDOLA, R. M. S.; TÁVORA, J. P. F.; BIRGEL, E. H. Avaliação da influência da gestação e do puerpério sobre a função hepática de bovinos da raça Holandesa. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 172-178, 2003.

BLUM, J. W.; KUNZ, P.; LEUENBERGER, H.; GAUTSCHI, K.; KELLER, M. Thyroid hormones, blood plasma metabolites and haematological parameters in relationship to milk yield in dairy cows. **Animal Science**, v. 36, n. 1, p. 93-104, 1983.

BOSSAERT, P.; TREVISI, E.; OPSOMER, G.; BERTONI, G.; VliegHER, S. The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in high-yielding dairy cows: An observational study. **The Veterinary Journal**, London, v. 192, n. 2, p. 222-225, 2012.

BRANDÃO, P. E.; CORTEZ, A.; GREGORI, F.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L. J.; ROSALES, C. A. R.; JEREZ, J. A. Ocorrência de anticorpos anti-rotavírus em bovinos no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 115-116, 2002a.

BRANDÃO, P. E.; CORTEZ, A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; GREGORI, F.; HEINEMANN, M. B.; HOMEM, V. S. F.; RODRIGUEZ, C. A. R.; JEREZ, J. A. Seroprevalence of antibodies against group A rotavirus in cattle from a pioneer frontier in Brazilian Amazon. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 18-29, 2002b.

BRAUN, J. P. Kidney function and damage. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6. ed., San Diego: Academic Press. 2008. p. 485-528.

BUZINARO, M. G.; FREITAS, P. P. S. Rotavírus do Grupo A em rebanhos bovinos leiteiros da região nordeste do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 23-26, 2002.

CAO, D.; IGBOELI, B.; YUAN, L.; KAPIKIAN, A. Z.; AYERS, J. L.; ABINANTI, F. R.; HOSHINO, Y. A longitudinal cohort study in calves evaluated for rotavirus infections from 1 to 12 months of age by sequential serological assays. **Archives of Virology**, Wien, v. 154, n. 5, p. 755-763, 2009.

CARLSON, G. P. Fluid, electrolyte and acid-base balance. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6. ed., San Diego: Academic Press. 2008. p. 529-559.

CHASE, C. C. L.; HURLEY, D. J.; REBER, A. J. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 24, n. 1, p. 87-104, 2008.

CHAUHAN, R. S.; SINGH, N. P. Detection of rotavirus infection in calves employing immunofluorescence. **Journal of Applied Animal Research**, v. 1, n. 1, p. 51-55, 1992.

CHAUHAN, R. S.; SINGH, N. P. Detection of rotavirus in experimentally infected calves using immunoperoxidase technique. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 69, n. 5, p. 239–291, 1999.

CHO, Y. I.; HAN, J. I.; WANG, C.; COOPER, V.; SCHWARTZ, K.; ENGELKEN, T.; YOON, K. Y. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 166, n. 3-4, p. 375-385, 2013.

COLE, D. J.; ROUSSEL, A. J.; WHITNEY, M. S. Interpreting a bovine CBC: Evaluating the leukon and acute-phase proteins. **Veterinary Medicine**, v. 92, n. 5, p. 470-478, 1997.

COZZI, G.; RAVAROTTO, L.; GOTTARDO, F.; STEFANI, A. L.; CONTIERO, B.; MORO, L.; BRSCIC, M.; DALVITT, P. Short communications: Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. **Journal of Dairy Science**, Champagne, v. 94, n. 8, 2011.

COSTA, J. N.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; AYRES, M. C. C.; BARROS FILHO, I. R. fatores etários no leucograma de fêmeas zebuínas sadias da raça Nelore (*Bos Indicus*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 399-403, 2000.

CROUCH, C. F.; OLIVER, S.; FRANCIS, M. J. Serological, colostral and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and *Escherichia coli* F5 (K99). **The Veterinary Record**, London, v. 149, p. 105-108, 2001.

DE GRAAF, D. C.; VANOPDENBOSCH, E.; ORTEGA-MORA, L. M.; ABASSI, H.; PEETERS, J. E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal of Parasitology**, Stuttgart, v. 29, n. 8, p. 1269-1287, 1999.

DHAMA, K.; CHAUHAN, R. S.; MAHENDRAN, M.; MALIK, S. V. S. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 33, n. 1, p. 1-23, 2009.

DIRKSEN, G.; GRUNDER, H. D.; STÖBER, M. **Exame Clínico dos Bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, 419p.

ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6. ed., San Diego: Academic Press. 2008. p. 117-155.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds), **Fields Virology**, 4.ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. pp. 1747–1785.

FAGLIARI, J. J.; LUCAS, A.; OLIVEIRA, J. A.; FERREIRA NETO, J. M. Quadro seroproteico de bezerros submetidos a 3 sistemas e imunização contra paratifo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 38, n. 5, p. 665-683, 1986.

FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; LUCAS, F. A.; CAMPOS FILHO, E.; CURI, P. R. Constituintes sanguíneos de bovinos recém-nascidos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, n. 3, p. 253-262, 1998.

FAGLIARI, J. J.; RIZOLLI, F. W.; SILVA, S. L.; SILVA, D. G. Proteinograma sérico de bezerros recém-nascidos da raça Holandesa obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 6, p. 1-4, 2006.

FALCONE, E.; TARANTINO, M.; DI TRANI, L.; CORDIOLI, P.; LAVAZZA, A.; TOLLIS, M. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 3879–3882, 1999.

FEITOSA, F. L. F.; CAMARGO, D. G.; YANAKA, R.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; BOVINO, F.; LISBOA, J. A. N.; PERRI, S. H. V.; GASPARELLI, E. R. F. Índices de falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) em bezerros holandeses e nelores às 24 e 48 horas de vida: valores de proteína total, de gamaglobulina, de imunoglobulina G e da atividade sérica de gamaglutamiltransferase, para o diagnóstico de FTIP. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 30, n. 8, p. 696-704, 2010.

FERNANDEZ, F. M.; CONNER, M. E.; PARWANI, A. V.; TODHUNTER, D.; SMITH, K. L.; CRAWFORD, S. E.; ESTES, M. K.; SAIF, L. J. Isotype-specific antibody responses to rotavirus and virus proteins in cows inoculated with subunit vaccines composed of recombinant SA11 rotavirus core-like particles (CLP) or virus-like particles (VLP). **Vaccine**, Kidlington, v. 14, n. 14, p. 1303-1312, 1996.

FERNANDEZ, F. M.; CONNER, M. E.; HODGINS, D. C.; PARWANI, A. V.; NIELSEN, P. R.; CRAWFORD, S. E.; ESTES, M. K.; SAIF, L. J. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. **Vaccine**, Kidlington, v. 16, n. 5, p. 507-516, 1998.

FREITAS, P. P. S.; UYEMURA, S. A.; SILVA, D. G.; SAMARA, S. I.; BUZINARO, M. G. Rotavírus bovino: fatores de risco, prevalência e caracterização antigênica de amostras em rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n.4, p. 820-827, 2011.

FUKAI, K.; SAKAI, T.; HIROSE, M.; ITOU, T. Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 66, n.4, p. 301-311, 1999.

GARCÍA, A.; RUÍZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; ORDEN, J. A.; CID, D.; SANZ, R.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. DE LA FUENTE, R. Rotavirus and concurrent infection with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 175-183, 2000.

GAREL, J. M.; BARLET, J. P. Calcium metabolism in newborn animals: the interrelationship of calcium, magnesium and inorganic phosphorus in newborn rats, foals, lambs and calves. **Pediatric Research**, Baltimore, v. 10, p. 749-754, 1976.

GENTSCH, J. R.; WOODS, P. A.; RAMACHANDRAN, M.; DAS, B. K.; LEITE, J. P.; ALFIERI, A.; KUMAR, R.; BHAN, M. K.; GLASS, R. I. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications of vaccine development. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 174, suppl. 1:S30-6, p. 30-36, 1996.

GERDTS, V.; UWIERA, R. R.; MUTWIRI, G. K.; WILSON, D. J.; BOWERSOCK, T.; KIDANE, A.; BABIUK, L. A.; GRIEBEL, P. J. Multiple intestinal 'loops' provide an in vivo model to analyze multiple mucosal immune responses. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 256, n. 1-2, p. 19-33, 2001.

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

GOMES, V.; MADUREIRA, K. M.; SORIANO, S.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; BLAGITZ, M. G.; BENESI, F.J. Factors affecting immunoglobulin concentration in colostrum of healthy Holstein cows immediately after delivery. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 31 (supl. 1), p. 53-56, 2011.

GOUVEA, V.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H. F.; FORRESTER, B.; FANG, Z. Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 2, p. 276-282, 1990.

GOUVEA, V.; SANTOS, V.; TIMENETSKY, M. C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 5, p. 1338- 1340, 1994a.

GOUVEA, V.; SANTOS, V.; TIMENETSKY, M. C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotavirus by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 5, p. 1333-1337, 1994b.

GULATI, B. R.; NAKAGOMI, O.; KOSHIMURA, Y.; NAKAGOMI, T.; PANDNEY, R. Relative frequencies of G and P types among rotaviruses from indian diarrheic cows and buffalo calves. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 2074–2076, 1999.

HALL, G. A.; BRIDGER, J. C.; PARSONS, K. R.; COOK, R. Variation in rotavirus virulence: a comparison of pathogenesis in calves between two rotavirus of different virulence. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 30, n. 3, p. 223–233, 1993.

HAN, M. G.; CHEETHAM, S.; AZEVEDO, M.; THOMAS, C.; SAIF, L. J. Immune responses to bovine norovirus-like particles with various adjuvants and analysis of protection in gnotobiotic calves. **Vaccine**, Kidlington, v. 24, n. 3, p. 317–326, 2006.

HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 16, n. 3, p. 473-77, 1982.

ISHIZAKI, H.; SAKAI, T.; SHIRAHATA, T.; TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; URASAWA, S.; GOTO, H. The distribution of G and P types within isolates of bovine rotavirus in Japan. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 48, p. 367–372, 1996.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417p.

JEREZ, J. A.; CANDEIAS, J. A. N.; DURIGON, E. L.; RÁCZ, M. L. Anticorpos anti-rotavírus em bovinos. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.18, n.4, p.371-374, 1987.

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

KEHOE, S. I.; HEINRICHS, A. J.; MOODY, M. L.; JONES, C. M.; LONG, M. R. Comparison of immunoglobulin G concentrations in primiparous and multiparous bovine colostrum. **The Professional Animal Scientist**, v. 27, p. 176-180, 2011.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6. ed., San Diego: Academic Press. 2008. 904p.

KILLINGTON, R. A.; STOKES, A.; HIERHOLZER, J. C. Virus Purification. In: MAHY, B. W. J.; KANGO, H. O.; **Virology Methods Manual**. Academic Press, 1996, p. 72-74.

KIM, Y.; NIELSEN, P. R.; HODGINS, D.; CHANG, K. O.; SAIF, L. J. Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines. **Vaccine**, Kidlington, v. 20, n. 7-8, p. 1248-1258, 2002.

KNOWLES, T. G.; EDWARDS, J. E.; BAZELEY, K. J., BROWN, S. N., BUTTERWORTH, A.; WARRISS, P. D. Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. **Veterinary Record**, London, v. 147, n. 21, p. 593-598, 2000.

KOHARA, J.; TSUNEMITSU, H. Correlation between maternal serum antibodies and protection against bovine rotavirus diarrhea in calves. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 62, n. 2, p. 219-221, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 277, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LARSON, B. L. Transfer of specific blood serum proteins to lacteal secretions near parturition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 41, n. 8, p. 1033-1044, 1958.

LARSON, B. L.; TOUCHBERRY, R. W. Blood serum protein level as a function of age. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 18, p. 983-990, 1959.

LANGONI, H.; LINHARES, A. C.; AVILA, F. A.; DA SILVA, A. V.; ELIAS, A. O. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n. 5, p. 313-319, 2004.

MALLARD, B. A.; DEKKERS, J. C.; IRELAND, M. J.; LESLIE, K. E.; SHARIF, S.; LACEY VANKAMPEN, C.; WAGTER, L.; WILKIE, B. N. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 2, p. 585-595, 1998.

MCNEILLY, T. N.; NAYLOR, S. W.; MITCHELL, M. C.; McATEER, S.; MAHAJAN, A.; SMITH, D. G. E.; GALLY, D. L.; LOW, J. C.; HUNTLEY, J. F. Simple methods for measurement of bovine mucosal antibody responses in vivo. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 118, n. 1-2, p. 160-167, 2007.

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, n. 1, p. 30-39, 2007.

MONTASSIER, M. F. S. **Avaliação do nível de reatividade cruzada entre as estirpes vacinal A24 Cruzeiro e isoladas de campo do sorotipo "A" do vírus da febre aftosa com base na resposta imune humoral de um rebanho vacinado, através do método de bloqueio em fase líquida do ELISA.** 1999. 121f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Câmpus de Jaboticabal, 1999.

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

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. Reoviridae. In: _____ (Ed.), **Veterinary Virology**, USA: Academic Press. 1999. pp.391–404.

MYERS, L. L.; SNODGRASS, D. R. Colostral and milk antibody titers in cows vaccinated with a modified live rotavirus-coronavirus vaccine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 181, n. 5, p. 486-488, 1982.

NOURMOHAMMADZADEH, F.; DAVOUDI, Y.; ABDOLLAHPOUR, G.; NOURI, A. The prevalence of rotavirus in neonatal calf diarrhea, using electron microscopic examination. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 21, n. 6, p. 1231-1234, 2012.

NRC - **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**, 7 ed., 2001. 408p. Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog/9825.html>.

OLIVEIRA FILHO, J. P.; SILVA, D. P. G.; PACHECO, M. D.; MASCARINI, L. M.; RIBEIRO, M. G.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; STIPP, D. T.; BARROS, B. J.; BORGES, A. S. Diarreia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 27, n. 10, p. 419-424, 2007.

ORRO, T.; JACOBSEN, S.; LEPAGE, J. P.; NIEWOLD, T.; ALASUUTARI, S.; SOVERI, T. Temporal changes in serum concentrations of acute phase proteins in newborn dairy calves. **The Veterinary Journal**, ..., v. 176, p. 182-187, 2008.

PARASHAR, U. D.; HUMMELMAN, E. G.; BRESEE, J. S.; MILLER, M. A.; GLASS, R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 5, p. 565–572, 2003.

PARWANI, A. V.; HUSSEIN, H. A.; ROSEN, B. I.; LUCHELLI, A.; NAVARRO, L.; SAIF, L. J. Characterization of field strains of Group A bovine rotaviruses by using polymerase chain reaction-generated G and P type-specific cDNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 8, p. 2010-2015, 1993.

PARREÑO, V.; BÉJAR, C.; VAGNOZZI, A.; BARRANDEGUY, M.; COSTANTINI, V.; CRAIG, M. I.; YUAN, L.; HODGINS, D.; SAIF, L. J.; FERNÁNDEZ, F. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 100, n. 1-2, p. 7-24, 2004.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P.; CANDEIAS, J. A.; RÁCZ, M. L.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; TRABULSI, J. R. Eletrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. **Journal of Hygiene**, London, v. 90, n. 1, p. 117–125, 1983.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P.; ANDRADE, Z. P.; DE CASTRO, L. Combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 21–28, 1985.

PERINO, L. J.; SUTHERLAND, R. L.; WOOLLEN, N. E. Serum gamma-glutamyltransferase activity and protein concentration at birth and after suckling in calves with adequate and inadequate passive transfer of immunoglobulin G. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 54, n. 1, p. 56-59, 1993.

PERINO, L. J.; WITTUM, T. E.; ROSS, G. S. Effects of various risk factors on plasma protein and serum immunoglobulin concentrations of calves at postpartum hours 10 and 24. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 56, n. 9, p. 1144-1154, 1995.

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

PICCIONE, G.; MESSINA, V.; MARAFIOTI, S.; CASELLA, S.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F. Changes in some haematological parameters in dairy cows during late gestation, post partum, lactation and dry periods. **Veterinarija ir Zootechnika**, v. 58, n. 80, p. 59-64, 2012.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine – a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses**. 10.ed. Edinburgh: Saunders. 2007. pp.127-160.

ROCHA, T. G. **Avaliação da transferência de imunidade passiva em bezerros de vacas da raça Canchim**. 2010. 108f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.

ROCHA, T. G.; FRANCIOSI, C.; NOCITI, R. P.; NOGUEIRA, C. A. S.; FAGLIARI, J. J. Hemograma e proteínas do soro sanguíneo de bezerros Canchim-Nelore e da raça Holandesa nos primeiros 30 dias de vida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 5, p. 1250-1254, 2010a.

ROCHA, T. G.; NOCITI, R. P.; SAMPAIO, A. A. M.; FAGLIARI, J. J. Passive immunity transfer and serum constituents of crossbred calves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 32, n. 6, p. 515-522, 2012.

ROUSIC, S.; KLEIN, N.; HOUGHTON, S.; CHARLESTON, B. Use of colostrum from rotavirus-immunized cows as a single feed to prevent rotavirus-induced diarrhea in calves. **Veterinary Record**, London, v. 147, n. 6, p. 160-161, 2000.

RUSSEL, K. E.; ROUSSEL, A. J. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 23, n. 3, p. 403-426, 2007.

SAIF, L. J.; REDMAN, D. R.; SMITH, L.; THEIL, K. W. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from immunized or non-immunized cows. **Infection and Immunity**, Washington, v. 41, n. 3, p. 1118-1131, 1983.

SAIF, L. J.; SMITH, K. L. Enteric viral infections of calves and passive immunity. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 1, p. 206-228, 1985.

SAIF, L. J.; ROSEN, B. I.; PARWANI, A. V. Animal rotaviruses. In: KAPIKIAN, A.Z. (ed) **Viral infections of the gastrointestinal tract**. New York: Marcel Dekker. 1994. pp. 279-367.

SALMON, H. The mammary gland and neonate mucosal immunity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 72, n.1-2, p. 143-155, 1999.

SANT'ANA, V. A. C. **Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade**. 2004. 161f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SANT'ANA, V. A. C.; BIRGEL, E. H. Obtenção de soro lácteo para fracionamento das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. In: XI CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 2003, Bahia. **Anais...** Salvador, Bahia, Brasil.

SAUT, J. P. E.; MIYASHIRO, S. I.; RAIMONDO, R. F. S.; BIRGEL JUNIOR, E. H. Influência do período pós-parto no proteinograma de vacas Holandesas, obtido através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, suplemento 1, p. 244-249, 2009.

SCHNEIDER, A.; CORRÊA, M. N.; BUTLER, W. R. Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in Veterinary Science**, London, v. 95, n. 1, p. 269-271, 2013.

SCOTT, P. R.; HALL, G. A.; JONES, P. W.; MORGAN, J. H. Calf Diarrhoea. In: ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Bovine Medicine – diseases and husbandry**, 2.ed., Oxford: Blackwell Science. 2004. Cap.14, p.185-214.

SILVA, D. G. **Monitoramento da imunidade passiva em bezerros alimentados com colostro de vacas imunizadas e não imunizadas com vacina inativada contra rotavirus**. 2004. 76f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, 2004.

SILVA, D. G. **Estudo clínico, laboratorial e terapêutico da diarreia experimental em bezerros induzida por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Dublin**. 2007. 153f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, 2007.

SILVA, P. R. L. **Perfil sanguíneo de fêmeas bovinas em gestação e no parto e avaliação da transferência de imunidade passiva aos descendentes**. 2009. 87f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

SILVA, D. G.; SILVA, P. R. L.; SILVA, P. C.; FAGLIARI, J. J. Serum protein concentrations, including acute phase proteins, in calves experimentally infected with *Salmonella* Dublin. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 31, n. 7, p. 551-554, 2011.

SILVA, F. D. F.; GREGORI, F.; GONÇALVES, A. C. S.; SAMARA, S. I.; BUZINARO, M. G. Molecular characterization of group A bovine rotavirus in southeastern and central-western Brazil, 2009-2010. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 32, n. 3, p.237-242, 2012.

SNODGRASS, D. R.; FAHEY, K. J.; WELLS, P. W. Passive immunity in calf rotavirus infections: maternal vaccination increases and prolongs immunoglobulin G1 antibody secretion in milk. **Infection and Immunity**, Washington, v. 28, n. 2, p. 344-349, 1980.

SNODGRASS, D. R.; FITZGERALD, D. R.; CAMPBELL, I.; SCOTT, F. M.; BROWNING, G. F.; MILLER, D. L.; HERRING, A. J.; GREENBERG, H. B. Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 3, p. 504-507, 1990

SNOECK, V.; PETERS, I. R.; COX, E. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. **Veterinary Research**, Paris, v. 37, n. 3, p. 455-467, 2006.

STEELE, A. D.; GEYER, A.; GERDES, G. H. Rotavirus infections. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (eds), **Infectious Diseases of Livestock**, Oxford University Press, Southern Africa, p.1256–1264. 2004.

TEIXEIRA, W. T.; FONTEQUE, G. V.; RAMOS, A. F.; MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A.; MARTINS, V. M. V.; SAITO, M. E.; FONTEQUE, J. H. Transfer of passive immunity and serum proteinogram in the first six months of life of Criollo Lageano and Black and White Holstein calves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 32, n. 10, p. 980-986, 2012.

THIRY, E. Age and immune response: tailoring of vaccination schedule. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2012, Lisbon. **Keynote lectures and round table proceedings**. Revista Portuguesa de Buiatria – Edição Especial. Lisbon: p.57-59

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 582p.

TONIETTI, P. O.; SILVA, F. D. F.; HORA, A. S.; GREGORI, F. Group A rotaviruses: and updated review. **Journal of Cientific Research and Reviews**, v. 2, n. 4, p. 41-55, 2013.

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

VAN METRE, D. C.; TENNANT, B. C.; WHITLOCK, R. H. Infectious diseases of the gastrointestinal tract. In: DIVERS, T. J.; PEEK, S. P. **Rebhun's Diseases of Dairy cattle**, 2.ed., St. Louis: Saunders Elsevier. 2008. p. 200-294.

ZANKER, I. A.; HAMMON, H. M.; BLUM, J. W. Activities of γ -Glutamyltransferase, Alkaline Phosphatase and Aspartate Aminotransferase in colostrum, milk and blood plasma of calves fed first colostrum at 0-2, 6-7, 12-13 and 24-25 h after birth. **Journal of Veterinary Medicine A**, Berlin, v. 48, n. 3, p. 179-185, 2001.

8 IMPLICAÇÕES

Embora a vacinação de vacas no período pré-parto induza ao aumento dos títulos séricos de imunoglobulina G específica anti-BRV, bem como incrementa a transferência de maiores títulos dessa imunoglobulina específica aos bezerros alimentados com colostro de vacas imunizadas, quando comparado ao colostro de vacas não imunizadas, a incompatibilidade entre os sorotipos vacinais e aqueles encontrados a campo é um entrave à proteção efetiva dos bezerros contra a diarreia por rotavírus.

Uma vez que foi confirmada a diferença entre os sorotipos encontrados a campo e aqueles presentes na vacina, não só no presente estudo, como em trabalhos anteriores, para que essa proteção seja efetiva, é necessário que os genótipos presentes a campo sejam estabelecidos, e as vacinas utilizadas sejam direcionadas especificamente para tais genótipos, ressaltando-se, assim, a importância dos levantamentos epidemiológicos para determinação das estirpes mais prevalentes a campo, levando-se em consideração, inclusive, diferenças regionais em um país de dimensões continentais, como o Brasil. Além disso, esse monitoramento deve ser periódico, uma vez que a utilização da vacina, em longo prazo, estimula o rearranjo genético das cepas circulantes a campo, levando a infecções mistas ou à geração de genótipos diferentes daqueles aos quais os animais apresentam imunidade.

Associado às boas práticas de manejo e higiene, a vacina pode trazer vantagens econômicas aos proprietários, uma vez que é capaz de diminuir a gravidade e a duração da excreção de rotavírus no ambiente, além de ser indicada para a proteção contra outros enteropatógenos. Cabe aos proprietários, no entanto, avaliarem a necessidade de uso desse método preventivo da enfermidade, uma vez que, pelo menos com relação ao rotavírus, a vacina não é capaz de evitar a ocorrência da doença de forma efetiva, podendo acarretar a necessidade de tratamento, mesmo em bezerros que receberam colostro de vacas vacinadas.

O estudo em condições controladas e utilizando desafio experimental pode esclarecer se, mesmo apresentando títulos menores de IgG anti-BRV, tanto em rebanhos vacinados quanto em rebanhos não vacinados, os bezerros filhos de

vacas primíparas apresentam menor incidência de diarreia por rotavírus que os bezerros filhos de vacas pluríparas.

Comprovou-se que o colostro de vacas pluríparas vacinadas mantém maiores títulos de IgG específica anti-BRV no primeiro dia após o parto e que, portanto, é mais adequado ao fornecimento prolongado aos bezerros, visando a proteção das mucosas contra o estabelecimento de enteropatógenos. O monitoramento frequente da qualidade do colostro, tanto de primeira ordenha pós-parto quanto das duas coletas subsequentes em propriedades que ordenham as vacas duas vezes ao dia, pode colaborar na determinação de amostras adequadas à esse fim e, dessa maneira, manter os níveis de proteção mucosa dos bezerros altos o suficiente para evitar a infecção.

A avaliação da resposta imune de mucosa é um dado importante, que deve ser avaliado com o intuito de estabelecer a efetividade da proteção conferida aos animais mediante a ingestão de colostro de vacas que, sabidamente, apresentam imunidade contra rotavírus.

A resposta conferida pelo aumento dos teores séricos de ceruloplasmina frente à infecção por rotavírus indicou que essa proteína é um bom biomarcador da ocorrência dessa enfermidade em bezerros, no entanto, seria interessante realizar mais estudos para confirmar essa aplicação.

APÊNDICES

APÊNDICE A

1A. Tabela de datas da 1ª coleta (60 dias pré-parto), 2ª coleta (30 dias pré-parto) e 3ª coleta (dia do parto) de sangue das vacas dos Grupos vacinado (V1n, V1v) e não vacinado (V2n e V2v):

ANO 2011					
Grupo	Vaca	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	
V1n	2512	03/02	02/03	10/04	
	2511	10/02	02/03	12/04	
	2385	17/02	15/03	21/04	
	2281	17/02	15/03	09/04	
	2390	17/02	15/03	22/04	
	2357	01/03	15/03	17/04	
	2618	01/03	15/03	28/04	
	2480	01/03	15/03	24/04	
	2428	01/03	15/03	30/04	
	2577	10/03	04/04	05/05	
	2474	10/03	04/04	07/05	
	2584	10/03	04/04	01/05	
	V1v	9316	03/02	02/03	09/04
		616	03/02	02/03	19/04
1148		03/02	02/03	06/04	
1001		03/02	02/03	10/04	
27		03/02	02/03	01/04	
891		10/02	14/03	07/04	
649		10/02	14/03	13/04	
8332		10/02	14/03	07/04	
9824		17/02	23/03	18/04	
9157		17/02	14/03	13/04	
1019		01/03	14/03	21/04	
1083		01/03	23/03	18/04	
ANOS 2012/2013					
V2n		839	06/08	03/09	04/10
	894	01/10	29/10	14/11	
	913	29/10	26/11	17/12	
	929	26/11	21/12	07/01	
	926	-	-	07/01	
	931	26/11	21/12	21/01	
	920	07/01	21/01	07/02	
	921	07/01	21/01	18/02	
	938	07/01	21/01	19/02	
	915	07/01	21/01	20/02	
	916	07/01	21/01	21/02	
	924	07/01	21/01	27/02	
	V2v	705	06/08	03/09	08/10
		824	06/08	03/09	11/10
791		01/10	29/10	11/11	
616		03/09	01/10	17/11	

	837	01/10	29/10	23/11
	564	01/10	29/10	03/12
	547	01/10	29/10	10/12
	832	21/12	07/01	02/02
	869	21/12	07/01	07/02
	833	07/01	21/01	17/02
	667	07/01	21/01	18/02
	756	07/01	21/01	28/02

APÊNDICE B

1B - Diluições ideais do antígeno viral, amostras e conjugados imunoenzimáticos utilizados no EIE indireto

1.1B – Diluições ideais dos imunorreagentes - soro sanguíneo das vacas e bezerras:

Imunorreagente	Diluições ideais IgG
Antígeno viral	1:32
Amostra de soro	1:400
Conjugado	1:1.000

1.2B - Diluições ideais dos imunorreagentes - colostro das vacas:

Imunorreagente	Diluições ideais IgG
Antígeno viral	1:32
Amostra de colostro	1:1.600
Conjugado	1:1.000

SOLUÇÕES EMPREGADAS NO PREPARO DOS IMUNORREAGENTES E NA TÉCNICA DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO

1. Tampão salina fosfatada (PBS – 0,01M PO₄; 0,14M NaCl; pH 7,4)

1A – Solução estoque de fosfato sódico dibásico 0,2 M (Na₂HPO₄)

Reagente	Quantidade
Na ₂ HPO ₄	28,4 g
Água bidestilada	q.s.p. 1.000 mL

2A – Solução estoque de fosfato sódico monobásico 0,2 M (NaH₂PO₄)

Reagente	Quantidade
NaH ₂ PO ₄	27,6 g
Água bidestilada	q.s.p. 1.000 mL

3A – Solução de NaCl 1,4M

Reagente	Quantidade
NaCl	81,816 g
Água bidestilada	q.s.p. 1.000 mL

4A – Tampão PBS (0,01M PO₄; 0,14M NaCl; pH 7,4)

Reagente	Quantidade
NaCl	200 mL
Na ₂ HPO ₄	81 mL
NaH ₂ PO ₄	19 mL
Água bidestilada	q.s.p. 2.000 mL

2. Tampão carbonato-bicarbonato 0,05M; pH 9,6 (TCB)

2A – Solução de carbonato de sódio

Reagente	Quantidade
Na ₂ CO ₂ 0,2 M	2,11 g
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

2B – Solução de bicarbonato de sódio

Reagente	Quantidade
NaHCO ₂ 0,2 M	3,36 g
Água bidestilada	q.s.p. 200 mL

2C – Tampão carbonato-bicarbonato 0,05M; pH 9,6 (TCB)

Reagente	Quantidade
Na ₂ CO ₂ 0,2 M	80 mL
NaHCO ₂ 0,2 M	170 mL
Água bidestilada	q.s.p. 1.000 mL

3. Tampão salina fosfatada acrescida de Tween 20 (PBST – 0,01M PO₄; 0,14M NaCl; pH 7,4; 0,05% Tween 20)

Reagente	Quantidade
Tween 20	0,5 mL
PBS	q.s.p. 1.000 mL

4. HCl 2M

Reagente	Quantidade
HCl 37%	82,8 mL
Água bidestilada	q.s.p. 500 mL

5. Peróxido de hidrogênio a 3% (H₂O₂ 3%)

Reagente	Quantidade
H ₂ O ₂ 30%	100 µL
Água bidestilada	q.s.p. 1 mL

SOLUÇÕES EMPREGADAS NA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS

- Solução Tris/HCl (Tris/HCl 0,1 M; CaCl₂ 1,5 mM; pH 7,3)

Reagentes	Quantidade
Trizma base (PM 121,1)	12,114 g
CaCl ₂	0,1662 g (0,22 g para bi-hidratada)
Água bidestilada	q.s.p. 1.000 mL
HCl concentrado	q.s.p. pH 7,3

- Dodecilsulfato de sódio 10% (SDS 10%)

Reagentes	Quantidade
Lauril sulfato de sódio	10 g
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

- Dissociador da Amostra

Reagentes	Quantidade
SDS 10%	3,0 mL
Upper Tris 4X	1,25 mL
2-mercapto-etanol	0,5 mL
Glicerol	4,0 mL
Azul de bromofenol 0,5%	100 uL
Água bidestilada	q.s.p. 10 mL

- Solução de Acrilamida/Bisacrilamida (30/0,8)

Reagentes	Quantidade
Acrilamida para eletroforese	30 g
Bisacrilamida	0,8 g
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

- Lower Tris 4X (0,5 M Tris/HCl; pH 8,8)

Reagentes	Quantidade
Tris (base)	18,17 g
HCl concentrado	q.s.p. pH 8,8
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

- Upper Tris 4X (0,5 M Tris/HCl; pH 6,8)

Reagentes	Quantidade
Tris (base)	6,06 g
HCl concentrado	q.s.p. pH 6,8
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

- Gel de poliacrilamida

Reagente	Gel inferior (7,5%)	Gel superior (3,5%)
Solução mãe acril/bis (30/0,8)	7,84 mL	0,63 mL
Lower Tris 4X	8,05 mL	-----
Upper Tris 4X	-----	1,40 mL
Água bidestilada	14,9 mL	3,26 mL
Persulfato de Amônio	1,4 mL	280 µL
TEMED	20 µL	20 µL
VOLUME TOTAL	32,2 mL	5,60 mL

- Soluções para o preparo do Tampão de Corrida

- Solução estoque Tris-Glicina 4X

Reagentes	Quantidade
Tris (base)	12 g
Glicina	57,6 g
Água bidestilada	q.s.p. 1.000 mL

- Tampão de Corrida

Reagentes	Quantidade
Tris glicina 4X	50 mL
Água bidestilada	q.s.p. 200 mL

- Solução de álcool isoamílico, clorofórmio e fenol

Reagente	25 amostras	50 amostras	75 amostras	150 amostras
Álcool isoamílico	160 µL	320 µL	480 µL	960 µL
Clorofórmio	3,9 mL	7,8 mL	11,7 mL	23,4 mL
Fenol	6,0 mL	12 mL	18 mL	36 mL

- Persulfato de Amônio a 20%

Reagentes	Quantidade
Persulfato de Amônio	60 mg
Água destilada	3,0 mL

Coloração com nitrato de prata

1. Solução fixadora (etanol - ácido acético)

Reagentes	Quantidade 1 gel	Quantidade 2 géis
Etanol	15 mL	30 mL
Ácido Acético	0,75 mL	1,5 mL
Água bidestilada	q.s.p. 150 mL	q.s.p. 300 mL

2.Solução corante (nitrato de prata 0,01M)

Reagentes	Quantidade 1 gel	Quantidade 2 géis
Nitrato de Prata	0,2775 g	0,555 g
Água bidestilada	150 mL	300 mL

3.Solução reveladora

Reagentes	Quantidade 1 gel	Quantidade 2 géis
NaOH	5,63 g	11,26 g
Formaldeído 40%	1,43 mL	2,86 mL
Água bidestilada	q.s.p. 188 mL	q.s.p. 376 mL

4.Solução de Ácido Acético 5%

Reagentes	Quantidade 1 gel	Quantidade 2 géis
Ácido Acético	7,5 mL	15,0 mL
Água bidestilada	q.s.p. 150 mL	q.s.p. 300 mL

5.Solução de etanol 10%

Reagentes	Quantidade 1 gel	Quantidade 2 géis
Etanol	15 mL	30 mL
Água bidestilada	q.s.p. 150 mL	q.s.p. 300 mL

APÊNDICE C

1C. Média e desvio-padrão da concentração sérica de proteínas de vacas da raça Holandesa cujos bezerros não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (Grupo A), cujos bezerros apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (Grupo B) e cujos bezerros apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, e foram positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (Grupo C), aos 60 e 30 dias pré-parto e no dia do parto (0).

1.1 C Concentração sérica de proteína total (g/dL)

Momentos	Grupos		
	A	B	C
60	8,06±0,45 ^{Aa}	7,90±0,38 ^{Ba}	8,39±0,70 ^{ABa}
30	8,29±0,34 ^{Aa}	7,97±0,38 ^{Aa}	8,38±0,90 ^{Aa}
0	7,01±0,60 ^{Ab}	6,27±0,46 ^{Ab}	6,9±0,75 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

1.2 C Concentração sérica de globulinas (g/dL)

Momentos	Grupos		
	A	B	C
60	5,38±0,51 ^{Aa}	5,32±0,37 ^{Aa}	5,94±0,84 ^{Aa}
30	5,79±0,52 ^{Aa}	5,41±0,36 ^{Aa}	5,88±0,81 ^{Aa}
0	4,36±0,63 ^{Ab}	3,62±0,48 ^{Bb}	4,24±0,63 ^{ABb}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

1.3 C Concentração sérica de imunoglobulina A (mg/dL)

Momentos	Grupos		
	A	B	C
60	77,5±30,1 ^{Aa}	89±51,5 ^{Aa}	101±33,5 ^{Aa}
30	84,3±47,9 ^{Aa}	89,2±39,4 ^{Aa}	102±35,4 ^{Aa}
0	58,2±57,5 ^{Aa}	32,2±15,2 ^{Ab}	45,2±21,9 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

1.4 C Concentração sérica de ceruloplasmina (mg/dL)

Momentos	Grupos		
	A	B	C
60	36,1±16,4 ^{Aa}	35,2±5,80 ^{Ab}	48,2±36,1 ^{Aa}
30	39,6±11,6 ^{Aa}	41,6±17,3 ^{Aab}	33,6±14,8 ^{Aa}
0	55,8±28,8 ^{Aa}	61,0±43,8 ^{Aa}	55,4±27,6 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

1.5 C Concentração sérica de transferrina (mg/dL)

Momentos	Grupos		
	A	B	C
60	305±88,8 ^{Aa}	287±59,6 ^{Aa}	334±138 ^{Aa}
30	301±81,1 ^{Aa}	261±88,8 ^{Aa}	302±96,3 ^{Aa}
0	274±111 ^{Aa}	173±31,5 ^{Ab}	201±89,1 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

1.6 C Concentração sérica de imunoglobulina G (mg/dL)

Momentos	Grupos		
	A	B	C
60	2.102±412 ^{Aa}	2.178±419 ^{Aa}	2.376±573 ^{Aa}
30	2.177±274 ^{Aa}	2.234±420 ^{Aa}	2.374±348 ^{Aa}
0	1.872±506 ^{Aa}	1.520±586 ^{Ab}	1.541±504 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

1.7 C Concentração sérica de haptoglobina (mg/dL)

Momentos	Grupos		
	A	B	C
60	22,4±10,5 ^{Ab}	16,1±2,17 ^{Aa}	23,7±22,7 ^{Aa}
30	22,7±11,2 ^{Ab}	15,1±3,16 ^{Aa}	22,4±20,4 ^{Aa}
0	36,2±20,0 ^{Aa}	17,0±7,60 ^{Ba}	29,9±18,5 ^{ABa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

1.8 C Concentração sérica de α_1 -glicoproteína ácida (mg/dL)

Momentos	Grupos		
	A	B	C
60	7,93±6,30 ^{Aa}	8,59±7,71 ^{Aa}	10,1±4,93 ^{Aa}
30	11,1±9,42 ^{Aa}	9,93±6,38 ^{Aa}	12,2±4,27 ^{Aa}
0	7,48±2,35 ^{Aa}	9,37±8,79 ^{Aa}	11,7±7,09 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

APÊNDICE D

1D. Média e desvio-padrão da atividade de gamaglutamiltransferase (GGT), do teor de proteína total e das concentrações de imunoglobulinas A e G no soro lácteo de vacas da raça Holandesa cujos bezerros não apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida (Grupo A), cujos bezerros apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, mas foram negativos para a detecção de rotavírus nas fezes (Grupo B) e cujos bezerros apresentaram diarreia no decorrer do primeiro mês de vida, e foram positivos para a detecção de rotavírus nas fezes (Grupo C) no dia do parto (momento 0) e no primeiro dia após o parto (momento 1).

1.1 D Atividade de gamaglutamiltransferase no soro lácteo (U/L)

Grupo	Momento	
	0	1
A	26.397±11.074 ^{Aa}	17.788±9.125 ^{Ab}
B	35.719±12.546 ^{Aa}	26.680±10.284 ^{Ab}
C	30.413±14.735 ^{Aa}	23.340±11.203 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

1.2 D Concentração de proteína total no soro lácteo (g/dL)

Grupo	Momento	
	0	1
A	20,9±5,99 ^{Aa}	13,9±11,2 ^{Ab}
B	23,0±5,11 ^{Aa}	14,9±7,31 ^{Ab}
C	20,7±6,08 ^{Aa}	12,5±6,31 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

1.3 D Concentração de imunoglobulina A no soro lácteo (mg/dL)

Grupo	Momento	
	0	1
A	507±326 ^{Aa}	324±255 ^{Ab}
B	532±180 ^{Aa}	387±173 ^{Aa}
C	623±202 ^{Aa}	341±148 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

1.4 D Concentração de imunoglobulina G total no soro lácteo (mg/dL)

Grupo	Momento	
	0	1
A	14.528±5.350 ^{Aa}	10.073±9.103 ^{Ab}
B	15.461±4.642 ^{Aa}	10.826±5.789 ^{Ab}
C	14.684±4.627 ^{Aa}	8.644±5.069 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).