

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**TESE**

**Avaliação epidemiológica da diarreia em uma coorte de  
bezerras no Município de Pirai, RJ**

**Thais Ferreira Fagundes**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA DIARREIA EM UMA  
COORTE DE BEZERRAS NO MUNICÍPIO DE PIRAÍ, RJ**

**THAIS FERREIRA FAGUNDES**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Maria Julia Salim Pereira**

*e Co-orientação dos Professores*  
**Rita de Cassia Alves Alcantara de Menezes, e  
Wagner de Souza Tassinari**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ  
Março, 2013

636.208963427

F156a

T

Fagundes, Thais Ferreira, 1982-

Avaliação epidemiológica da diarreia em uma coorte de bezerras no Município de Pirai, RJ / Thais Ferreira Fagundes - 2013. 79 f.: il.

Orientador: Maria Julia Salim Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Diarréia em bovino - Teses. 2. Bezerro - Parasito - Teses. 3. Bezerro - Infecções - Teses. 4. Bezerro - Doenças - Epidemiologia - Pirai (RJ) - Teses. 5. Patologia veterinária - Teses. I. Pereira, Maria Julia Salim, 1958-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**THAIS FERREIRA FAGUNDES**

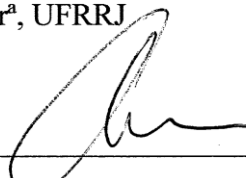
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM 08/03/2013



---

Maria Julia Salim Pereira, Dr<sup>a</sup>, UFRRJ  
(Orientadora)



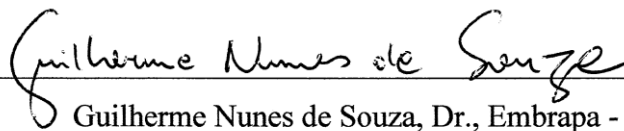
---

Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha, Dr<sup>a</sup>, UFLA



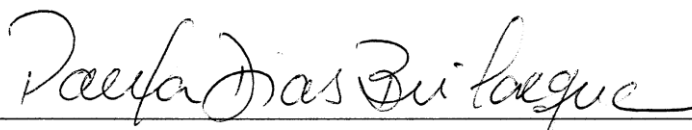
---

Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira, Dr., UENF



---

Guilherme Nunes de Souza, Dr., Embrapa - Gado de Leite



---

Paula Dias Bevilacqua, Dr<sup>a</sup>, UFV

## **AGRADECIMENTOS**

À CAPES pelo apoio financeiro concedido por meio de bolsa de estudos.

À FAPERJ pelo financiamento do projeto processo E-26/110.228/2010-APQ1.

Ao proprietário e administrador da fazenda, por terem aberto as portas para a equipe de pesquisa.

Ao Ivan Serafim por todo o apoio e amizade.

A todos os participantes desse projeto, pela contribuição, aprendizagem, e companheirismo.

A Dra. Claudia Maia Brigagão, laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro. E ao Dr. Felipe Anibal, laboratório de Sistemática e Bioquímica, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ pelo fornecimento cultura de *Giardia* e de DNA, respectivamente.

## RESUMO

FAGUNDES, Thais Ferreira. **Avaliação epidemiológica da diarreia em uma coorte de bezerras, no Município de Piraí, RJ.** 2013. 72p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Este trabalho teve como objetivos realizar uma análise descritiva da diarreia e da infecção por parasitas; estudar a associação entre a diarreia e os possíveis fatores de risco: infecção por *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Eimeria* e helmintos, idade, falha na transferência de imunidade passiva (FTP) tipo de fertilização (produção *in vitro* de embriões-PIVE, inseminação artificial- IA e monta natural), mãe novilha ou vaca e peso ao nascer, além de avaliar a influência da diarreia sobre o ganho de peso semanal de bezerras leiteiras criadas no sistema de casinhas tropicais, em uma propriedade de produção leiteira de Piraí, Estado do Rio de Janeiro. No período de setembro de 2009 a junho de 2011, semanalmente, foram realizadas coleta de fezes e dados de registro, e pesagem das bezerras. O sangue foi coletado após a ingestão de colostro. As bezerras foram recrutadas à medida que nasciam e acompanhadas até cem dias de idade, morte ou término do estudo. As amostras fecais foram classificadas como normais - consistência firme, cor marrom, períneo e cauda da bezerra limpos e secos ou diarreicas - pastosa, períneo ou cauda do animal sujos com fezes; ou aquosa, períneo ou cauda da bezerra sujos com fezes. Modelos de regressão logística via equações estimadas generalizadas foram utilizados para estudar os determinantes da diarreia, estimando-se os riscos relativos (RR). Modelos de regressão gaussiano via equações estimadas generalizadas foram utilizados para analisar a relação entre o ganho de peso semanal e a diarreia. Para ambos os modelos, adotaram-se intervalos com 90% de confiança. Cento e dezoito bezerras foram acompanhadas, totalizando 1457 amostras fecais. As taxas de incidência de diarreia, de infecção por *Cryptosporidium*, *G. intestinalis*, *Eimeria* e por helmintos foram 25,7, 13,2, 16,6, 26,9 e 7,3 casos novos por 100 bezerras-semana, respectivamente. Em bezerras com até 30 dias de idade, o tipo de fertilização PIVE [RR= 0,33 (IC 90% 0,14; 0,75)] é um fator de proteção e a infecção por *Cryptosporidium* spp [RR= 1,95 (IC 90% 1,22; 3,12)] fator de risco. Já para bezerras de 31 a 100 dias, PIVE [RR=0,50 (IC 90% 0,28; 0,89)] e peso ao nascer  $\geq 40$  kg [RR= 0,65 (IC 90% 0,47; 0,89)] são fatores de proteção. Observou-se que quanto maiores a idade ( $p < 0,001$ ) e o peso ao nascer ( $p = 0,10$ ), maior foi o ganho de peso. Em parte, a diarreia observada na faixa etária até 30 dias, pode ser explicada pela infecção por *Cryptosporidium* e apesar da falta de significância estatística, a FTP, aumenta o risco de diarreia, devendo-se dispensar maior cuidado à administração de colostro. Adicionalmente, para a faixa etária de 31 a 100 dias atenção especial deve ser dispensada àquelas que nasceram com baixo peso. As variáveis que influenciaram no ganho de peso das bezerras da propriedade, em geral, diferem das citadas na literatura, uma vez que a mãe e a absorção de imunoglobulinas do colostro não tiveram efeito sobre o ganho de peso. Embora o efeito da diarreia sobre o ganho de peso não tenha sido estatisticamente significativo sua relevância clínica deve ser considerada.

**Palavras-chave:** estudo longitudinal, sistema de criação em casinhas, GEE.

## ABSTRACT

FAGUNDES, Thais Ferreira. **Epidemiologic evaluation of diarrhea in a cohort of calves, in the municipality of Pirai/RJ.** 2013. 72p. Thesis (Doctorate in Veterinary Sciences, Animal Health) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

This study aimed to perform a descriptive analysis of diarrhea and parasites infection ; the association among diarrhea and risk factors such as infection by *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Eimeria* and helminths, age, failure of passive immunity transference (FPT), type of fertilization (*in vitro* embryo production - IVP, artificial insemination - AI and natural mount), dam (heifer or cow) and birth weight. Moreover, assessing the influence of diarrhea on the weekly weight gain of dairy heifer calves reared in individual calf pens under paddock in a farm of dairy production, Pirai, Rio de Janeiro. From September 2009 to June 2011, feces collection, weighing and data about the calves, were obtained weekly. Blood samples were collected only once after ingestion of colostrum. The calves in this study were followed up from birth to one hundred day old until the end of the study period / or death / or release. Feces were considered normal (firm, brown, tail and perineum clean and dry) or diarrhea (pasty or aqueous, tail and/or perineum soiled with feces). Logistic regression models by generalizes estimated equations were used to study relationship among diarrhea and its determinants factors, the relative risks (RR) were estimated. Gaussian regression models by generalizes estimated equations were used to obtained the relationship between weekly weigh gain and diarrhea. For both models, intervals with 90% confidence were estimated. One hundred and eighteen calves were followed up, in a total of 1457 fecal samples. The incidence rates of diarrhea, infection by *Cryptosporidium*, *G. intestinalis*, *Eimeria* and helminths were 25.7, 13.2, 16.6, 26.9 and 7.3 new cases per 100 calves week, respectively. In calves up to 30 dayold, the type of fertilization IVP [RR=0.33 (CI 90% 0.14 - 0.75)] is a factor protection and *Cryptosporidium* spp. infection [RR=1.95 (CI 90% 1.22 - 3.12)] risk factor. On the other hand, for calves with 31 to 100 days of age, IVP [RR=0.50 (CI 90% 0.28 -0.89)] and birth weight  $\geq$  40 kg [RR= 0.65 (CI 90% 0.47 - 0.89)] are protective factors. , Greater was the weight gain, in those calves more old ( $p<0.001$ ) and heavier at the birth ( $p=0.10$ ). In this population, part of diarrhea in animals aged up to 30 days, can be explained by infection with *Cryptosporidium* spp. and greater care should be dispensed in the administration of colostrums, despite the lack of statistical significance, animals with FTP are more sensitive to the occurrence of diarrhea. In the group from 31 to 100 days special attention should be given to those with low birth weight. The variables that influence the weight gain of calves in this study differ in general from the cited literatures since the mother and absorption of colostrum immunoglobulin's had no effect on weight gain. Moreover, although the effect of diarrhea has not been shown statistically significant its clinical relevance must be considered.

**Key-words:** longitudinal study, tropical houses under individual paddocks, GEE

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO I</b>	<b>2</b>
	ANALISE DESCRITIVA DA DIARREIA EM UMA COORTE DE BEZERRAS NO MUNICÍPIO DE PIRAÍ, RIO DE JANEIRO	
2.1	RESUMO	3
2.2	ABSTRACT	4
2.3	INTRODUÇÃO	5
2.4	MATERIAL E MÉTODOS	7
2.4.1	Localização da Fazenda, Animais e Desenho do Estudo	7
2.4.2	Manejo dos Animais	7
2.4.3	Definição de Caso de Diarreia	8
2.4.4	Análise Parasitológica	8
2.4.5	Análise Bacteriológica	9
2.4.6	Coleta de Sangue e Teste do Glutaraldeído	9
2.4.7	Análise Estatística	10
2.4.8	Análise Molecular	10
2.4.8.1	Extração de DNA	10
2.4.8.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	10
2.4.8.3	PCR com Digestão por Enzimas (RFLP)	11
2.5	RESULTADOS	12
2.5.1	Análise Parasitológica	12
2.5.2	Análise Bacteriológica	13
2.5.3	Absorção de Colostro	13
2.5.4	Análise Epidemiológica	13
2.5.5	Análise Molecular	17
2.6	DISCUSSÃO	20
2.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26



<b>3</b>	<b>CAPÍTULO II</b>	<b>35</b>
	DIARREIA EM UMA COORTE DE BEZERRAS NO MUNICÍPIO DE PIRAÍ, RIO DE JANEIRO: FATORES DE RISCO	
3.1	RESUMO	36
3.2	ABSTRACT	37
3.3	INTRODUÇÃO	38
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.4.1	Origem dos Dados	40
3.4.2	Análise Estatística	40
3.5	RESULTADOS	42
3.6	DISCUSSÃO	47
3.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO III</b>	<b>54</b>
	INFLUÊNCIA DA DIARREIA SOBRE O GANHO DE PESO EM BEZERRAS LEITEIRAS	
4.1	RESUMO	55
4.2	ABSTRACT	56
4.3	INTRODUÇÃO	57
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.4.1	Origem dos Dados	59
4.4.2	Análise Estatística	59
4.5	RESULTADOS	60
4.6	DISCUSSÃO	64
4.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>69</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>70</b>
	<b>A- Sintaxe da análise no pacote estatístico R</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A incidência de diarreias em bezerros lactentes pode causar perdas econômicas diretas e indiretas, inclusive levar à morte. Além disso, especialmente em bezerras, criadas para reposição dos rebanhos, o comprometimento do desenvolvimento futuro resulta em aumento da idade ao primeiro parto é um dos principais prejuízos. Portanto, o conhecimento dos fatores envolvidos nesses quadros diarreicos em cada sistema de criação pode subsidiar ações profiláticas que promovam a saúde das bezerras.

Em vários países do mundo foram, e estão sendo desenvolvidos estudos longitudinais para identificar fatores de risco para morbidade e mortalidade em bezerras. No Brasil, não há estudos dessa natureza que abordem esse tema em rebanhos leiteiros. Dentre os estudos observacionais, os longitudinais prospectivos são os que melhor propiciam a aferição de risco e conferem maior validade as inferências causais, devido a sua estrutura, que é o seguimento dos indivíduos desde antes da ocorrência do evento.

No Brasil, a maioria das criações de bezerros utiliza bezerreiros individuais ou coletivos. No entanto, algumas fazendas têm adotado o sistema de abrigo individual em piquetes, conhecido como “casinhas”. Com o objetivo de melhorar o rendimento das bezerras criadas na fazenda, onde foi realizado o estudo, este tipo de abrigo foi empregado, assim como tecnologias em relação à reprodução e melhoramento animal. Porém, de acordo com informações do administrador, apesar dos cuidados e investimentos ocorriam muitas perdas relacionadas à ocorrência de diarreia, o que motivou a realização deste estudo na propriedade, a fim conhecer os aspectos epidemiológicos da diarreia neste tipo de criação pois até o momento não há estudos, disponíveis na literatura.

Assim, este trabalho teve como objetivo principal a avaliação epidemiológica da diarreia em uma coorte de bezerras leiteiras do nascimento até 100 dias de idade, criadas sob sistema de casinhas em uma fazenda localizada no Município de Piraí.

O trabalho foi dividido em três capítulos onde no capítulo 1: “Análise descritiva da diarreia em uma coorte de bezerras no Município de Piraí, Rio de Janeiro”, cujos os objetivos foram, estimar a incidência de diarreia e de infecção por parasitas; verificar a distribuição da idade média e a idade de primeira observação de diarreia e infecção por parasitas e sua intensidade; caracterizar molecularmente *Giardia intestinalis*; avaliar a ocorrência de falha na transferência de imunidade passiva e diagnosticar a ocorrência de *Escherichia coli* enteropatogênica/enteroinvasiva nas bezerras do nascimento aos cem dias de idade criadas em sistema de casinhas. O segundo: “Diarreia em uma coorte de bezerras no Município de Piraí, Rio de Janeiro: fatores de risco” teve como objetivo estudar a associação entre a diarreia e possíveis fatores de risco para sua incidência, tais como: presença de protozoários e helmintos nas fezes, idade, absorção de colostro, tipo de fertilização, mãe novilha ou vaca e peso ao nascer na mesma coorte de bezerras. O terceiro capítulo: “Influência da diarreia sobre o ganho de peso em bezerras leiteiras”, teve como objetivo avaliar a influência da diarreia no ganho de peso semanal de bezerras leiteiras criadas no sistema de casinhas tropicais, controlando para as variáveis: peso ao nascer, idade, mãe, tipo de fertilização e absorção de colostro.

## **2 CAPÍTULO I**

### **ANÁLISE DESCRITIVA DA DIARREIA EM UMA COORTE DE BEZERRAS NO MUNICÍPIO DE PIRAÍ, RIO DE JANEIRO**

## 2.1 RESUMO

Este trabalho teve como objetivos estimar a taxa de incidência de diarreia e de infecção por parasitas; verificar a distribuição da idade média e de primeira observação de diarreia e infecção por parasitas e sua intensidade; caracterizar molecularmente *Giardia intestinalis*; avaliar a ocorrência de falha na transferência de imunidade passiva e de *Escherichia coli* enteropatogênica/enteroinvasiva (EPEC/EIEC) em bezerras do nascimento aos cem dias de idade, criadas em sistema abrigo individual em piquete. No período de setembro de 2009 a junho de 2011, semanalmente, foram realizadas coleta de fezes. O sangue foi coletado uma única vez após a ingestão de colostro. As técnicas de centrífugo-flutuação em solução saturada de açúcar e centrífugo-sedimentação em formol-éter e teste de coagulação pelo glutaraldeído a 10% foram utilizadas. A identificação bacteriológica se deu a partir de colônias em meios agar MacConkey, agar Eosina Azul de Metileno, e agar Salmonella-Shigella. As fezes foram consideradas normais (consistência firme, cor marrom, períneo e cauda limpos e secos) e diarreicas (pastosa, períneo e/ou cauda sujos com fezes; ou aquosa, períneo e/ou cauda sujos com fezes). A caracterização molecular se baseou em técnicas de PCR, nested-PCR e digestão com a enzima, utilizando-se o gene  $\beta$ -giardin. Modelos logísticos aditivos generalizados foram utilizados. Cento e dezoito bezerras foram acompanhadas, totalizando 1457 amostras fecais. Em 95,7% das bezerras foram observados quadros diarreicos. O risco de diarreia foi dividido em duas faixas etárias até 30 e de 31 a 100 dias de idade. Apenas um caso de morte foi atribuído à diarreia. As taxas de incidência de diarreia, de infecção por *Cryptosporidium*, *G. intestinalis*, *Eimeria* e por helmintos foram 25,7, 13,2, 16,6, 26,9 e 16,7 casos novos por 100 bezerras-semana, respectivamente. O primeiro episódio de diarreia e de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* foram observados em uma bezerra com apenas 5 dias de idade, já cistos de *Giardia* em fezes de bezerras a partir de 8 dias, oocistos de *Eimeria* a partir de 10 dias e ovos de Strongylida a partir de 15 dias de idade. A média de idade de bezerras que apresentaram diarreia foi  $54,2 \pm 26,6$ . A idade média em dias das bezerras quando eliminaram oocistos de *Cryptosporidium* foi de  $52,6 \pm 26,1$ , cistos de *G. intestinalis*  $40,1 \pm 20$ , oocistos de *Eimeria*  $49,5 \pm 21,8$  e ovos do tipo Strongylida  $64,9 \pm 22,3$ . Em nenhuma amostra a intensidade de infecção por *Cryptosporidium* e *Giardia* foi classificada como alta. Apenas, amostras de fezes de sessenta e duas bezerras foram submetidas à análise bacteriológica e nenhuma amostra foi caracterizada como *E. coli* enteropatogênica/enteroinvasiva. Em 69,6% bezerras, a quantidade de imunoglobulinas no sangue foi satisfatória, incompleta em 15,2% e, insuficiente também em 15,2% das bezerras. Identificaram-se os genótipos A e E de *G. intestinalis*. Apesar da alta incidência de diarreia, a letalidade foi baixa, devido em parte ao sistema de criação adotado na propriedade, que pode ter propiciado as baixas intensidades das infecções observadas, além da patogenicidade dos bioagentes em questão.

**Palavras-chave:** estudo longitudinal, sistema de criação em casinhas, colostro.

## 2.2 ABSTRACT

This study aimed to estimate the incidence rate of diarrhea and parasitic infections; verify the average age of first observation of diarrhea and parasitic infections and their intensity; evaluate the occurrence of failure of passive immunity transference and *Escherichia coli* EIEC/EPEC in heifer calves from birth to 100 day old, in individual calf pens under paddock. Weekly, from September 2009 to June 2011, feces were collected. Blood samples were collected only once after ingestion of colostrum. The flotation in saturated sugar solution, centrifugal-sedimentation in formaldehyde ether and coagulation test by 10% glutaraldehyde techniques were used. Bacteriological identification was made by means of colonies on agar MacConkey, agar Eosin Methylene blue and agar Salmonella-Shigella. Feces were considered normal (firm, brown, tail and perineum clean and dry) and diarrhea (pasty or aqueous, tail and/or perineum soiled with feces). Molecular characterization was based on PCR, nested-PCR and digestion with enzyme, using the gene  $\beta$ -giardin. Generalized additive logistic models were used. One hundred and eighteen heifers calves were followed, in a total of 1457 fecal samples. In 95.7% heifers calves were observed diarrheal disease. The risk of diarrhea was divided into two age groups up to 30 and 31 to 100 days of age. Only one case of death was due to diarrhea. The incidence rates of diarrhea and of infection by *Cryptosporidium*, *G. intestinalis*, *Eimeria* and helminths were 25.7, 13.2, 16.6, 26.9 and 16.7 new cases per 100 calves-week, respectively. The first episode of diarrhea and *Cryptosporidium* oocysts were observed in a heifer calf with just 5 days of age, *Giardia* cysts in calf's feces with 8 days, *Eimeria* oocysts and Strongylida type eggs in 15 day old calves. The average age of calves that had diarrhea was  $54.2 \pm 26.6$ . The average age when they eliminated *Cryptosporidium* oocysts was  $52.6 \pm 26.1$ , cysts of *G. intestinalis*  $40.1 \pm 20$ , oocysts of *Eimeria*  $49.5 \pm 21.8$  and  $64.9 \pm 22.3$  Strongylida type eggs. In non-sample the intensity of infection by *Cryptosporidium* and *Giardia* was high. Only, samples of sixty-two calves were submitted to bacteriological analysis and no sample was characterized as *E. coli* EIEC/EPEC. The amount of immunoglobulins was satisfactory in 69.6% of calves, incomplete in 15.2 % and insufficient in others 15.2 % calves. The genotypes A and E of *G. intestinalis* were identified. Despite the high incidence of diarrhea, mortality was low, due to the farming system management, which may have afforded the low intensities of infections observed, addition of bioagents pathogenicity.

**Key-words:** longitudinal study, tropical houses under individual paddocks, colostrum

## 2.3 INTRODUÇÃO

Os principais problemas de saúde em bezerros são os respiratórios e os relacionados a infecções intestinais (KANEENE; HURD, 1990). A diarreia é considerada uma das mais importantes causas de mortalidade em bezerros e tem uma complexa etiologia podendo ser causada por vários micro-organismos como, *Escherichia coli*, campilobacteria, rotavirus, e protozoários dos gêneros *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Eimeria* (SNODGRASS et al., 1986; de La FUENTE et al., 1999; GARCÍA et al., 2000; LASSEN et al., 2009; BARTELS et al., 2010).

Das 12 espécies de *Cryptosporidium* consideradas válidas em mamíferos, segundo Fayer (2010) quatro são as identificadas em bovinos: *C.andersoni*, *C.bovis*, *C.ryanae* e *C.parvum*. Este considerado patogênico para bezerros com menos de três semanas de idade (MOORE; ZEMAN, 1991). Bezerros jovens desempenham um importante papel na manutenção da infecção no rebanho e representam um grande risco zoonótico (BROOK et al., 2008, 2009). Mas, o risco de infecção diminui significativamente com o aumento da idade do animal (MALDONADO-CAMARGO et al., 1998; MOHAMMED et al., 1999). Em rebanhos do Estado do Rio de Janeiro já foram identificadas molercularmente as especies *C. parvum*, *C. andersoni* e *C. ryanae* em diferentes faixas etárias (HUBER et al., 2007; CHAMBARELLI, 2012).

Animais jovens são mais sensíveis à infecção com manifestação clínica por espécies do gênero *Eimeria*, que estão envolvidas em perdas econômicas, por causarem diarreia (CORNELISSEN et al., 1995; MATJILA; PENZHORN, 2002). A ocorrência das espécies de *Eimeria* varia de acordo com a idade dos animais hospedeiros (MENEZES; LOPES, 1995).

*Giardia intestinalis* (syn. *G. lamblia*, *G. duodenalis*) é um protozoário que pode ou não estar relacionado a quadros diarreicos em vários hospedeiros e é encontrado em bezerros de rebanhos leiteiros de diversos países (GUIMARÃES et al., 2001; MARK-CAREW et al., 2012; GEURDEN et al., 2012; MUHID et al., 2012). Compreende pelo menos oito genótipos (classificados de A a H) que são morfologicamente indistinguíveis (THOMPSON et al., 2000; FENG; XIAO, 2011). Assim, faz-se necessária a classificação dos genótipos por possuírem diferentes potenciais biológicos de infectar os humanos ou outras espécies animais (XIAO et al., 1993; MONIS et al., 1999; FENG; XIAO, 2011). Os genótipos A e B infectam humanos, bovinos e outras espécies domesticadas e selvagens; C e D infectam cães, E infecta animais ungulados, o F infecta gatos, o G, ratos e o H focas (MONIS et al., 2003; FENG; XIAO, 2011). Apesar de sua importância, até o momento não se conhece os genótipos deste protozoário que ocorrem em rebanhos do Estado do Rio de Janeiro.

Da mesma forma que as protozooses, as helmintoses são um problema na pecuária, pois quando não controladas, podem levar à perda de peso e morte dos bezerros (LIMA et al., 1997).

As taxas de morbidade e de mortalidade nas infecções respiratórias e intestinais em animais jovens são maiores nos que não absorveram quantidade adequada de imunoglobulinas, seja por ingestão insuficiente de colostro ou por falha na absorção intestinal de imunoglobulinas (BOYD, 1972; TENNANT et al., 1979; FURMAN-FRATCZAK et al., 2011). Assim, torna-se importante a detecção da concentração de imunoglobulinas no sangue dos bezerros para que medidas de controle sejam tomadas. Um teste de rastreamento rápido utilizando glutaraldeído a 10% se mostrou eficaz nesta detecção (TENNANT et al., 1979).

Na literatura, há vários estudos transversais sobre a ocorrência de diarreia e infecção por *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Eimeria* e helmintos em bovinos (PÉREZ et al., 1998; BARWICK et al., 2003; JIMENÉZ et al., 2010; BARTELS et al., 2010; GEURDEN et al., 2012; MUHID et al., 2012) que por suas características permitem avaliar a magnitude do problema por meio da análise da prevalência pontual, que é uma medida estática, não permitindo avaliar a força da morbidade. No entanto, poucos estudos são do tipo longitudinal (SIVULA et al., 1996; CASTRO-HERMIDA et al., 2002; SVENSSON et al., 2003, SANTÍN et al., 2008, 2009), cuja abordagem é adequada para observação da dinâmica da infecção por se basear em mais de uma amostra do mesmo indivíduo (MEDRONHO et al., 2008; MARTIN et al., 1997).

Dentre as bactérias identificadas em fezes de bezerros, a mais comumente relacionada à ocorrência de diarreia e perdas econômicas é *Escherichia coli*, principalmente em animais com até 30 dias de idade, sendo identificada em maior porcentagem em bezerros de 15 a 21 dias por De La Fuente et al. (1998). Porém de acordo com o mesmo autor os bezerros são mais susceptíveis a *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) nos primeiros 3 ou 4 dias de vida.

No Brasil, até o momento não foram encontrados relatos na literatura sobre estudos de incidência das diarreias em nenhum tipo de criação, inclusive no sistema de criação em abrigo individual em piquete (casinhas). Tal sistema foi desenvolvido para minimizar os problemas sanitários das criações em bezerreiros e vem sendo utilizado no manejo intensivo. Segundo Oliveira et al. (2005), o sistema apresenta diversas vantagens como, por exemplo, proteção contra excesso de chuva e sol, facilidade de limpeza e deslocamento evitando acúmulo de umidade. Além disso, o uso de casinhas pode evitar a reinfecção das bezerras por micro-organismos que possam permanecer viáveis no local, já que podem ser deslocadas e têm facilidade de limpeza, reduzindo, assim, o risco de diarreia.

Ademais, Machado Neto et al., (2004) ao compararem a casinha individual a campo com bezerreiros coletivos, pasto com abrigo, pasto e outros tipos encontraram menores taxas de mortalidade em bezerros mantidos em casinhas individuais.

Com objetivo de melhorar rendimento das bezerras criadas na fazenda, onde foi realizado o estudo, este tipo de abrigo foi utilizado, assim como tecnologias em relação à reprodução e melhoramento animal. Porém, de acordo com informações do administrador, apesar dos cuidados e investimentos ocorriam muitas perdas relacionadas à ocorrência de diarreia. Embora, haja difusão de tal criação, até o momento não há estudos, disponíveis na literatura, sobre os aspectos epidemiológicos da diarreia nestas bezerras.

Assim, este trabalho teve como objetivos: 1) estimar a incidência de diarreia e de infecção por parasitas; 2) verificar a distribuição da idade média e a idade de primeira observação de diarreia e infecção por parasitas e sua intensidade; 3) caracterizar molecularmente *Giardia intestinalis*; 4) avaliar a ocorrência de falha na transferência de imunidade passiva e 5) diagnosticar a ocorrência de *Escherichia coli* enteropatogênica e enteroinvasiva por meio de estudo prospectivo em bezerras do nascimento aos cem dias de idade criadas em sistema de casinhas individuais no Município de Piraí, Estado do Rio de Janeiro.

## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.4.1 Localização da Fazenda, Animais e Desenho do Estudo

Uma coorte de bezerras nascidas no período de setembro de 2009 a junho de 2011 foi acompanhada do nascimento aos cem dias de idade. As bezerras eram mestiças, com graus variados de sangue da raça holandesa preta e branca, criadas em um estabelecimento para produção de leite, no Município de Piraí (latitude 22°37'45" sul e longitude 43°53'53" oeste, estando a uma altitude de 387 metros). O estabelecimento mantinha instalações do tipo “free-stall” para as vacas lactantes e abrigos individuais em piquete (casinhas) para as fêmeas até 100 dias (Figura 1). Os machos eram vendidos logo após o nascimento.

Semanalmente, foram realizadas visitas para coleta de fezes de todas as bezerras, registro dos episódios de diarreia e de outras alterações clínicas.



**Figura 1.** (A) Imagem por satélite da fazenda em Piraí (GOOGLE, 2012), com área dos abrigos individuais em destaque; (B) abrigos individuais; (C) localização do Município de Piraí no mapa do Estado do Rio de Janeiro (ABREU, 2006).

### 2.4.2 Manejo dos Animais

As bezerras eram separadas das mães imediatamente após o nascimento e colocadas em abrigo individual em piquete, conhecidos como casinhas (Figura 1B). A casinha é um tipo de abrigo onde o animal fica protegido por uma cobertura com telha permanecendo com movimentação limitada ao seu interior e arredores por ser mantido em uma coleira presa por uma corrente fixada ao chão. Desta forma, a bezerra não tem contato direto com o animal da casinha ao lado.

As bezerras, já nos abrigos individuais, recebiam em mamadeira seis litros de colostro, divididos em duas frações. O colostro selecionado unicamente de vacas, após um teste usando colostrômetro, era armazenado em freezer e descongelado na hora da administração às bezerras. Cada casinha tinha dois baldes: um para o fornecimento de ração, oferecida desde o nascimento, e outro para leite e água, proveniente de poço artesiano. O fornecimento de leite era realizado até 90 dias após o nascimento, sendo de 0 a 30 dias – 3 litros de manhã e 3 litros à tarde, dos 31 a 60 dias – 2 litros de manhã e 2 litros à tarde, de 61 a 90 dias – 2 litros pela manhã. De 90 a 100 dias não era fornecido leite, apenas água e ração. A higienização dos baldes era realizada pela manhã utilizando-se apenas água.

No manejo adotado pela fazenda, também constava a administração do antiparasitário doramectina<sup>1</sup> uma vez ao mês, com o propósito de prevenir e tratar parasitoses por nematóides e artrópodes. Além disso, em casos graves de diarreia era

<sup>1</sup>Dectomax® - solução injetável a 1%, Pfizer Saúde Animal, Guarulhos, SP, Brasil.



administrada sulfametazina sódica<sup>2</sup> e, em casos de tristeza parasitária, oxitetraciclina<sup>3</sup> com diaceturato de diazominodibenzamidina<sup>4</sup>.

### 2.4.3 Definição de Caso de Diarreia

Os casos de diarreia foram definidos a partir de uma classificação, baseada nas características das fezes e também a presença de fezes no períneo e/ou cauda do animal. No entanto, pela periodicidade do estudo, com coletas semanais, apenas foram considerados casos de diarreia as amostras fecais classificadas como diarreicas no dia da coleta, não sendo possível saber se o animal teve diarreia nos outros dias da semana e quanto tempo durou essa diarreia. As amostras fecais foram classificadas adotando-se o seguinte critério: “normal” ou não diarreicas, quando a consistência firme, cor marrom, períneo e cauda da bezerra apresentaram-se limpos e secos; diarreicas, quando consistência pastosa ou aquosa, períneo e/ou cauda do animal sujos com fezes.

### 2.4.4 Análise Parasitológica

Durante as visitas semanais foram coletadas amostras de fezes, diretamente da ampola retal, acondicionadas em sacos plásticos identificados e mantidas sob refrigeração até o momento da análise.

A infecção por *Cryptosporidium* spp. e *G. intestinalis* foi diagnosticada pela presença de oocistos/cistos nas fezes, utilizando-se a técnica de centrífugo-sedimentação em formol-éter (BASSO et al., 1998) e observação em microscópio óptico em objetiva de 1000X com óleo de imersão. A partir do sedimento de amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. foram confeccionados esfregaços de fezes para coloração e assim facilitar a documentação fotográfica dos oocistos. Os esfregaços foram fixados em metanol e corados pela safranina-azul de metileno (BAXBY et al., 1984).

Já, para a pesquisa de *Eimeria* spp. e ovos de nematóides foi utilizada a técnica de centrífugo-flutuação em solução saturada de açúcar (densidade 1,20 – 1,25), como descrita por Menezes e Lopes (1995) para contagem de oocistos por grama de fezes (OoPG) e ovos por grama de fezes (OPG). Após a contagem dos ovos de nematóides, as amostras positivas foram separadas para a realização de coproculturas, seguindo-se a técnica descrita por Roberts e O’Sullivan (1950) para a obtenção de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) e posterior identificação dos gêneros de nematóides presentes nas fezes das bezerras, segundo Ueno e Gonçalves (1998).

A liberação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *G. intestinalis* foi classificada semi-quantitativamente segundo o número de cistos por campo, em 20 campos selecionados aleatoriamente em aumento de 1.000X: ausência de oocistos/cistos, intensidade baixa (=1 oocisto/cisto), intensidade moderada (2-5 oocistos/cistos), intensidade alta (6-10 oocistos/cistos) e intensidade muito alta (>10 oocistos/cistos), com base em Castro-Hermida et al.,(2002).

As amostras positivas para oocistos de *Eimeria* spp. foram classificadas de acordo com a intensidade de infecção em moderada (5-700) e alta (>700). Este critério foi adotado por extrapolação feita com base em Ueno e Gonçalves (1998) que consideram como moderada (200-700) e pesada (>700) a eliminação de OPG, no caso de infecção mista em bovinos. Assim, considerando que as infecções por espécies de *Eimeria* também são multiespecíficas adotaram-se os critérios relatados por esses autores para graduar, neste estudo, a intensidade de infecção por *Eimeria* e liberação de ovos de nematóides.

<sup>2</sup> Biosulfan® - solução injetável, Biofarm Química e Farmacêutica, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Terramicina® /LA solução injetável, Pfizer Saúde Animal, Guarulhos, SP, Brasil

<sup>4</sup> Diaseg® solução injetável a 7%, Schering-Plough Veterinária, Cotia, SP, Brasil.

Uma parte das fezes de cada bezerra positiva para infecção por *Eimeria*, de acordo com a intensidade de infecção (moderada e alta), foi misturada, diluída em água destilada e tamisada em parasitofiltro. A esta suspensão foi acrescentada solução de dicromato de potássio a 2,5% na proporção de (1: 2). Após homogeneização dessa mistura, a mesma foi distribuída em placas de Petri em finas camadas e mantida a temperatura ambiente por sete dias, para que ocorresse a esporulação dos oocistos de *Eimeria*. Após a esporulação dos oocistos foi realizada a identificação percentual das espécies de *Eimeria*, segundo os critérios apresentados por Levine (1985) e Eckert et al. (1995).

#### 2.4.5 Análise Bacteriológica

Amostras de fezes diarreicas de sessenta e duas bezerras foram enviadas ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Essas amostras de fezes foram repicadas nos meios ágar MacConkey<sup>5</sup> e ágar eosina azul de metileno<sup>5</sup>. Para a pesquisa de bactérias pertencentes aos gêneros *Salmonella* spp e *Shigella* spp, as amostras foram enriquecidas em caldo tetrionato de sódio e posteriormente repicadas em ágar Salmonella-Shigella<sup>5</sup>. Após o período de incubação de 18 a 24 horas a 37°C, as colônias foram observadas quanto à forma, cor, bordas, dentre outras características fenotípicas.

Após diferenciação prévia das colônias, estas foram submetidas à coloração de Gram para observação das características morfológicas e tintoriais e, teste de hidrólise ao Hidróxido de potássio a 3% para confirmação do Gram. Posteriormente, foram realizadas as seguintes provas de identificação das espécies: comportamento em ágar tríplice açúcar-ferro, comportamento em meio SIM (H<sub>2</sub>S Indol Motilidade), produção de ácidos a partir da glicose, fermentação de açúcares, teste Voges Proskauer, teste vermelho de metila, redução do nitrato, produção de gelatinase, degradação de citrato e malonato e outros diferenciais de acordo com o micro-organismo envolvido (KONEMAN et al., 2008).

Os isolados caracterizados como *Escherichia coli* foram enviados ao Laboratório de Enterobactérias, Centro de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, situado na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)- Rio de Janeiro para pesquisa de cepas EPEC (*E.coli* enteropatogênica) e EIEC (*E.coli* enteroinvasiva), segundo metodologia de soroaglutinação estabelecida pelo próprio laboratório.

#### 2.4.6 Coleta de Sangue e Teste do Glutaraldeído

Amostras sanguíneas de todas as bezerras recrutadas foram coletadas no primeiro contato com o animal, por meio de punção da veia jugular, usando agulhas descartáveis e tubos contendo vácuo. Em seguida, os tubos eram deixados inclinados para coagulação e remoção do soro que era então congelado (-20°C) até a realização do teste. A técnica consiste no uso de uma solução de glutaraldeído a 10%, diluída em água destilada, que reage de acordo com a concentração de imunoglobulinas no soro no decorrer do tempo. Uma alíquota de 0,5 ml de soro foi transferida para tubos do tipo Eppendorf com capacidade para 2,5 ml e 50 µl da solução de glutaraldeído a 10% foi adicionada. O soro e o reagente foram misturados imediatamente e, em seguida, observados a intervalos de 10, 15, 30 e 60 minutos. Foram consideradas como padrão, três amostras de soro de bezerras que sabidamente ingeriram colostro. As reações positivas foram caracterizadas pela formação de uma massa firme e opaca no fundo do tubo (em média, 1,46g de imunoglobulina/dl), que não se movia quando o tubo era inclinado. A reação incompleta foi caracterizada por formação de massa semi-sólida (em média, 0,6g de imunoglobulina

---

<sup>5</sup> Himedia® -Mumbai, Índia.

/dl), e a reação negativa não havia mudanças detectáveis (em média, 0,18g de imunoglobulina /dl) no soro (CHARLES et al., 1994). Os resultados considerados no teste de glutaraldeído foram os obtidos 60 minutos após a adição do reagente ao soro, uma vez que a reação de solidificação depende da concentração de imunoglobulinas e pode ocorrer tardiamente (TENNANT et al., 1979).

#### **2.4.7 Análise Estatística**

O cálculo da taxa de incidência foi realizado considerando-se no numerador o número de casos novos dos eventos estudados (diarreia e infecção por parasitos) e no denominador o somatório do período de tempo durante o qual cada bezerra esteve exposta ao risco de diarreia e de infecção (MARTIN et al., 1997).

Foram calculadas as proporções dos animais que apresentaram diarreia e infecção por parasitos, tendo como numerador o número de bezerras que apresentaram os eventos estudados durante o período do estudo e no denominador o número de bezerras expostas ao risco. A letalidade como consequência da síndrome diarreica foi calculada considerando-se no numerador o número de bezerras que morreram e no denominador o número de bezerras acometidas.

Os modelos logísticos aditivos generalizados (GAM) (HIN et al, 1999, WOOD, 2006) foram utilizados para avaliar a relação funcional entre idade e o risco do animal ser acometido por diarreia e pelos bioagentes encontrados, tais modelos são úteis para simplificar os cálculos e a tomada de decisões na categorização de alguma variável, quando necessário. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do pacote estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

#### **2.4.8 Análise Molecular**

Uma amostra de DNA obtida de material fecal e outra extraída de uma amostra de cultura celular, cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz e pelo laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, respectivamente, foram utilizadas como controle positivo para *Giardia*.

##### **2.4.8.1 Extração de DNA**

Trinta amostras positivas para cistos de *G. intestinalis* por microscopia óptica foram concentradas seguindo metodologia utilizada por Almeida (2004).

Os “pellets” após a concentração dos oocistos/cistos foram re-suspensos em 300 µl de tampão fosfato-salino gelado (pH 7,2), em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml com tampa de rosca contendo 50 mg de esferas de vidro (Sigma-Aldrich, produto # G8772). Os tubos foram colocados num aparelho mini-beadbeater-16 (Biospec, Bartlesville, OK, EUA), e as células foram rompidas utilizando um único ciclo de agitação (60 segundos). A lise celular foi concluída pela adição de 300 µl de solução de lise celular (20 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1% de dodecil sulfato de sódio), com 20 µl de proteinase K (20 mg / ml, Sigma-Aldrich), permanecendo por 3 horas a 56°C. O DNA foi extraído por adição de fenol clorofórmio e fenol, precipitando com isopropanol durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após a precipitação (16.000g durante 15 minutos), os “pellets” de DNA foram dessalinizados por duas vezes com etanol a 70% e ressuspensos a 40 ° C em 50 µl de água ultrapura (Sigma-Aldrich), com posterior armazenamento a -20°C.

##### **2.4.8.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Foi realizada a análise das amostras por meio da técnica de nested PCR seguida pela digestão por enzimas, para a detecção de fragmentos do genoma.

A reação de PCR foi realizada seguindo as condições e os iniciadores descritos previamente por Caccio et al. (2002)(Quadro 1), usados para amplificar um fragmento do gene  $\beta$ -*giardin* de 753 pares de base. A mistura da PCR continha 1X platinum PCR buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1.5mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 200  $\mu$ l (de cada) dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega, Madison, WI, EUA), 10.0 $\mu$ M de cada primer (G7 e G759), 2.5 U de platinum *Taq* polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e água pura, estéril. Dois microlitros de DNA de *Giardia* purificado de cada amostra foi adicionado a cada tubo de PCR para obter um volume total de 25 $\mu$ l. Os parâmetros da PCR utilizados na reação externa incluíram uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos em 35 ciclos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para confirmação do amplicom de 753 pb uma nested PCR, foi designada para gerar um produto com 511 pb, foi realizada usando 1  $\mu$ l do produto da primeira reação empregando os primers utilizados por Ramos (2010)(Quadro 1). A segunda reação de PCR foi idêntica à primeira com exceção da temperatura de anelamento que passou a ser de 55°C.

Uma alíquota (10 $\mu$ l) de cada reação de PCR foi examinada por eletroforese em gel de agarose 1,2% para confirmar a presença dos amplicons.

**Quadro 1.** Sequência de iniciadores (“primers”) utilizados na PCR para identificação de espécies de *Giardia intestinalis*. de acordo com Caccio et al. (2002) e Ramos (2010).

Primer	Sequência (5' – 3')	Tamanho do produto (pares de base)
PCR primária		
G7(F1)	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC	753
G759 (R1)	CTGCTGCGAGGCCGCCCTGGATCTTCGACGAC	
PCR secundária		
BG1A1F(F2)	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG	511
BG1A1R (R2)	CTCGACGAGCTTCGTGTT	

#### 2.4.8.3 PCR com digestão por enzimas (RFLP) e sequenciamento

Alíquotas de 5  $\mu$ l do produto de PCR de 753 pb foram digeridas usando 10 U de *Hae*III (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 2 horas a 37 °C. Produtos de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado por brometo de etídeo. Após a digestão com enzimas, as identificações dos genótipos serão confirmadas a partir de sequenciamento realizado no Setor de Sequenciamento de DNA no Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências – USP.

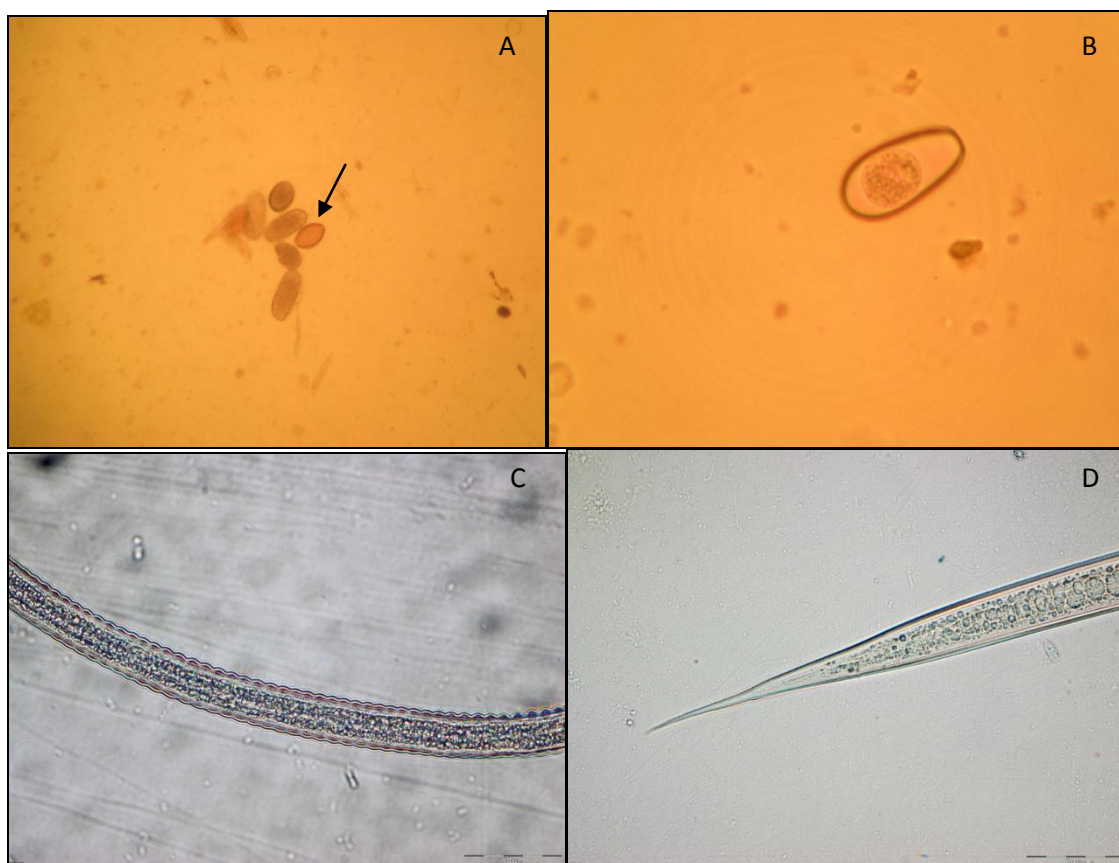
## 2.5 RESULTADOS

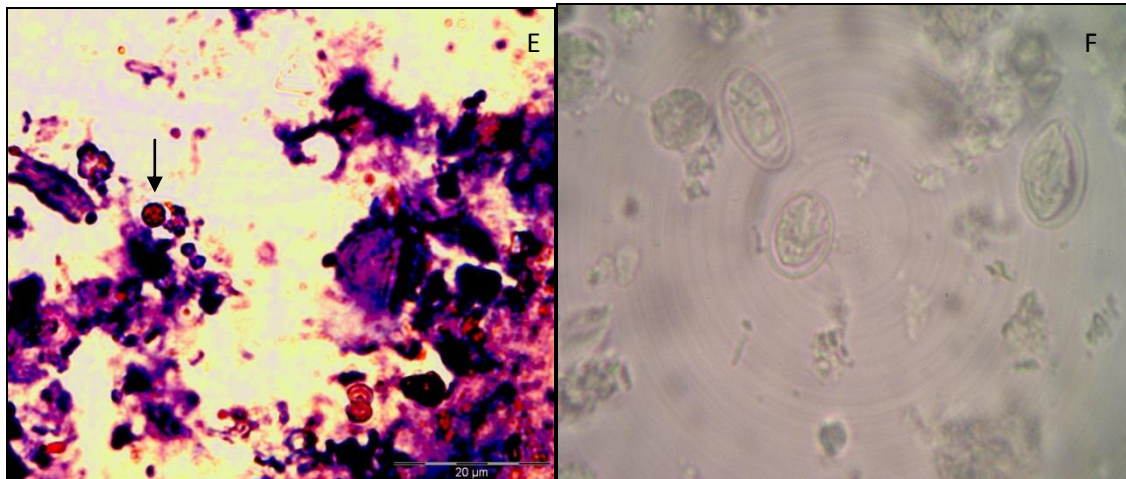
### 2.5.1 Análise Parasitológica

Foram identificados nas amostras de fezes ovos da ordem Strongylida, e esporadicamente, ovos de *Strongyloides*, *Trichuris* e *Moniezia*. Após coprocultura, as larvas identificadas, com base em Ueno e Gonçalves (1998), foram dos gêneros: *Trichostrongylus*, *Haemonchus* e *Chabertia*, sendo o gênero *Haemonchus* o mais encontrado (Figura 2).

Foram identificadas nove espécies de *Eimeria*: *E. subspherica*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis*, *E. cylindrica*, *E. alabamensis*, *E. bovis*, *E. canadensis*, *E. wyomingensis*, *E. auburnensis*. Os oocistos da espécie *E. bovis* foram mais observados em infecções de intensidade moderada e *E. ellipsoidalis* naquelas de intensidade alta.

Também foram identificados oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*, estes últimos foram concentrados para realização de análises moleculares (Figura 2).





**Figura 2.** (A) Ovos do tipo Strongylida e ovo de *Trichuris*; (B) Oocisto não esporulado de *Eimeria*; (C) Larva de *Chabertia*; (D) Larva de *Haemonchus*; (E) Oocisto de *Cryptosporidium*, corado por safranina-azul de metileno; (F) Cisto de *Giardia intestinalis* em formol-éter.

### 2.5.2 Análise Bacteriológica

Nas amostras de sessenta e duas bezerras foram diagnosticadas as seguintes espécies de bactérias: *E. coli* (54 - 87,1%), *Proteus mirabilis* (5 - 8,1%), *P. vulgaris* (4 - 6,4%), *Citrobacter diversus* (20-32,3%), *C. freundii* (1 - 1,6%), *Shigella spp.* (1- 1,6%), *S. sonneo* (2- 3,2%), *Edvardstella tarda* (3- 4,83%), *Salmonella spp.* (2- 3,2%), *Enterobacter spp.* (1- 1,6%), *E. sakazakii* (1 - 1,6%), *E. cloacae* (1- 1,61%), *Klebsiella oxytoca* (1- 1,6%), *Providencia stuartii* (1 - 1,6%). Nenhum isolado caracterizado como *E. coli* aglutinou nos antíssoros EPEC/EIEC.

### 2.5.3 Absorção de Colostro

A média de idade das bezerras, quando da coleta do sangue foi de  $4 \pm 2,7$  dias. Esta variação ocorreu em função do manejo da propriedade e da periodicidade semanal do estudo.

A reação ao teste do glutaraldeído foi positiva para 82 bezerras, incompleta em 18 bezerras, e negativa para 18. Os animais com falha na transferência de imunidade (negativos e incompletos para o teste do glutaraldeído) possuíam idade entre 0 a 7 dias e os que não apresentaram falha possuíam idade entre 0 a 13 dias de nascidos.

### 2.5.4 Análise Epidemiológica

Durante o período deste estudo foram acompanhadas 118 bezerras do nascimento até o término da pesquisa, morte ou soltura, totalizando 1.457 amostras fecais analisadas, em 94 semanas. Dessas amostras, 29,0% (423) foram classificadas como diarreicas e 71,0% (1.034) como normais. Durante o estudo, quatro (3,4%) animais morreram, porém destes, apenas um apresentava quadro diarreico, resultando em letalidade por diarreia igual a 0,8%. As taxas de incidência observadas foram: 25,7 casos novos por 100 bezerras-semana (113 casos novos/439 bezerras-semana) para diarreia; 13,3 casos novos por 100 bezerras-semana (98 casos novos/739 bezerras-semana), para infecção por *Cryptosporidium*; 16,6 casos novos por 100 bezerras-semana (94 novos casos/566 bezerras-semanas) para infecção por *G. intestinalis* e 26,9 casos novos por 100 bezerras-semana (113 casos novos/ 420 bezerras-semana) para infecção por *Eimeria*. A taxa de

incidência de eliminação de ovos de helmintos foi de 16,7 casos novos por 100 bezerras-semana (95 casos novos/ 568 bezerras-semana).

Em 95,7% (113/118) das bezerras, foram observados quadros diarreicos, oocistos de *Cryptosporidium* foram eliminados por 83,0% (98/118) das bezerras, cistos de *G. intestinalis* por 80,0% (94/118), oocistos de *Eimeria* por 95,7% (113/118) e ovos de helmintos por 64,4% (76/118) das bezerras durante o período.

Nenhuma amostra teve a intensidade de infecção por *Cryptosporidium* e *Giardia* classificada como alta. O resultado da pesquisa de oocistos de *Eimeria* e de *Cryptosporidium*, cistos de *Giardia* e ovos do tipo Strongylida, classificado de acordo com intensidade de infecção e presença ou ausência de diarreia, está demonstrado na Tabela 1.

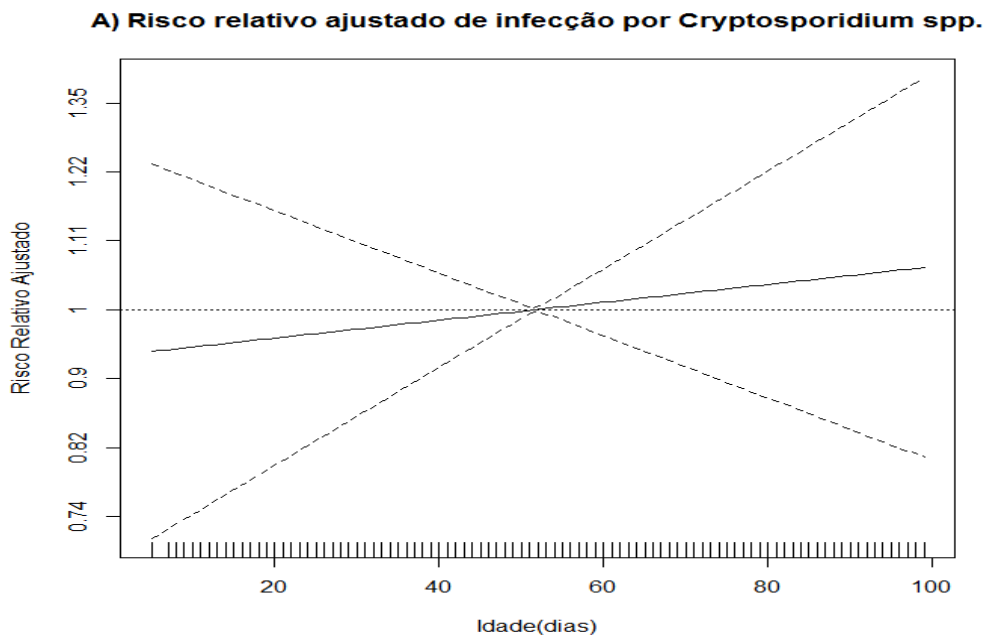
O primeiro episódio de diarreia foi observado em uma bezerra com apenas cinco dias de idade, oocistos de *Cryptosporidium* foram observados em fezes de bezerras também a partir de cinco dias de idade e a média de idade da primeira eliminação foi igual a  $41,2 \pm 25,7$  dias. Já cistos de *Giardia* foram observados em fezes de bezerras a partir de oito dias de idade, tendo como média de primeira eliminação  $27,2 \pm 14,3$  dias; oocistos de *Eimeria* foram eliminados a partir de 10 dias de idade com média de  $26,7 \pm 13,7$  dias e ovos do tipo Strongylida a partir de 15 dias de idade e a média da idade de primeira eliminação foi de  $54,2 \pm 23,0$  dias.

**Tabela 1.** Resultado da pesquisa de oocistos de *Eimeria* e de *Cryptosporidium*, cistos de *Giardia* e ovos do tipo Strongylida, classificado segundo a intensidade de infecção e presença ou ausência de diarreia.

Intensidade	Amostras de fezes	
	Diarreicas (n=423)	Não diarreicas (n=1.034)
<i>Cryptosporidium</i>		
negativa	349 (82,5%)	905 (87,5%)
baixa	68 (16,1%)	120 (11,6%)
moderada	6 (1,4%)	9 (0,8%)
<i>Giardia</i>		
negativa	361(85,3%)	860 (83,3%)
baixa	34 (8,1%)	111 (10,6%)
moderada	28 (6,6%)	63 (6,1%)
<i>Eimeria</i>		
negativa	255 (60,2%)	589 (56,9%)
moderada	143 (33,4%)	383 (37,0%)
alta	25 (5,9%)	62 (5,9%)
Strongylida		
negativa	382 (90,3%)	923 (89,2%)
moderada	41 (9,6%)	110 (10,6%)
alta	-	1 (0,09%)

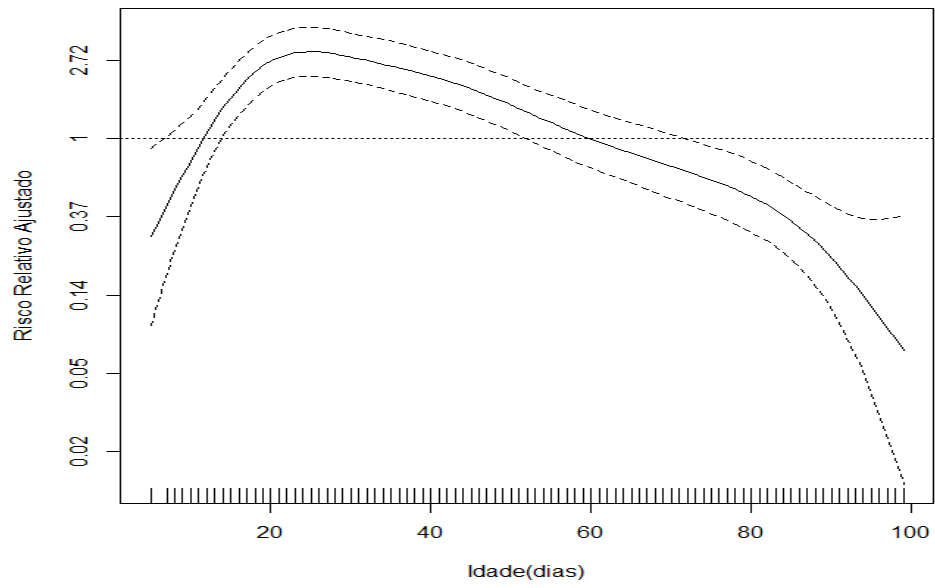
A média de idade de bezerras que apresentaram diarreia foi  $54,2 \pm 26,6$ , com idade modal de 79 dias. Já a idade das bezerras quando eliminaram oocistos de *Cryptosporidium* foi  $52,6 \pm 26,1$  (moda= 65 dias); quanto à eliminação de cistos de *G. intestinalis* foi  $40,1 \pm 20$  dias (idade modal de 19 dias); oocistos de *Eimeria* aos  $49,5 \pm 21,8$  dias (moda= 25 dias); e ovos do tipo Strongylida aos  $64,9 \pm 22,3$  dias (moda= 68 dias).

A análise pelo GAM sugere uma relação linear entre a idade e a infecção por *Cryptosporidium* e uma relação não-linear para as infecções por *G. intestinalis*, *Eimeria*, e helmintos (Figura 3). O risco de infecção por *Cryptosporidium* aumenta conforme aumenta a idade das bezerras. Já a infecção por *G. intestinalis* aumenta até em torno dos 25 dias e depois decresce. Sentido semelhante ao observado no gráfico que demonstra a relação entre a infecção por *Eimeria*, que tem o pico de eliminação de oocistos aos 32 dias, aproximadamente. O risco de liberação de ovos de helmintos é maior em bezerras acima de 45 dias. Já o risco de ocorrência de diarreia oscila de acordo com a idade dos animais, sendo maior nas primeiras semanas e em torno do 80º dia de vida.

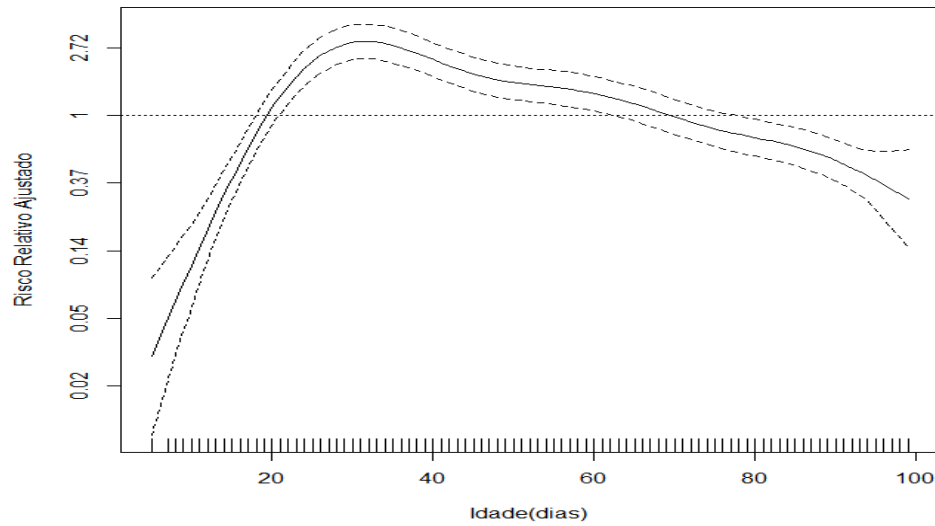


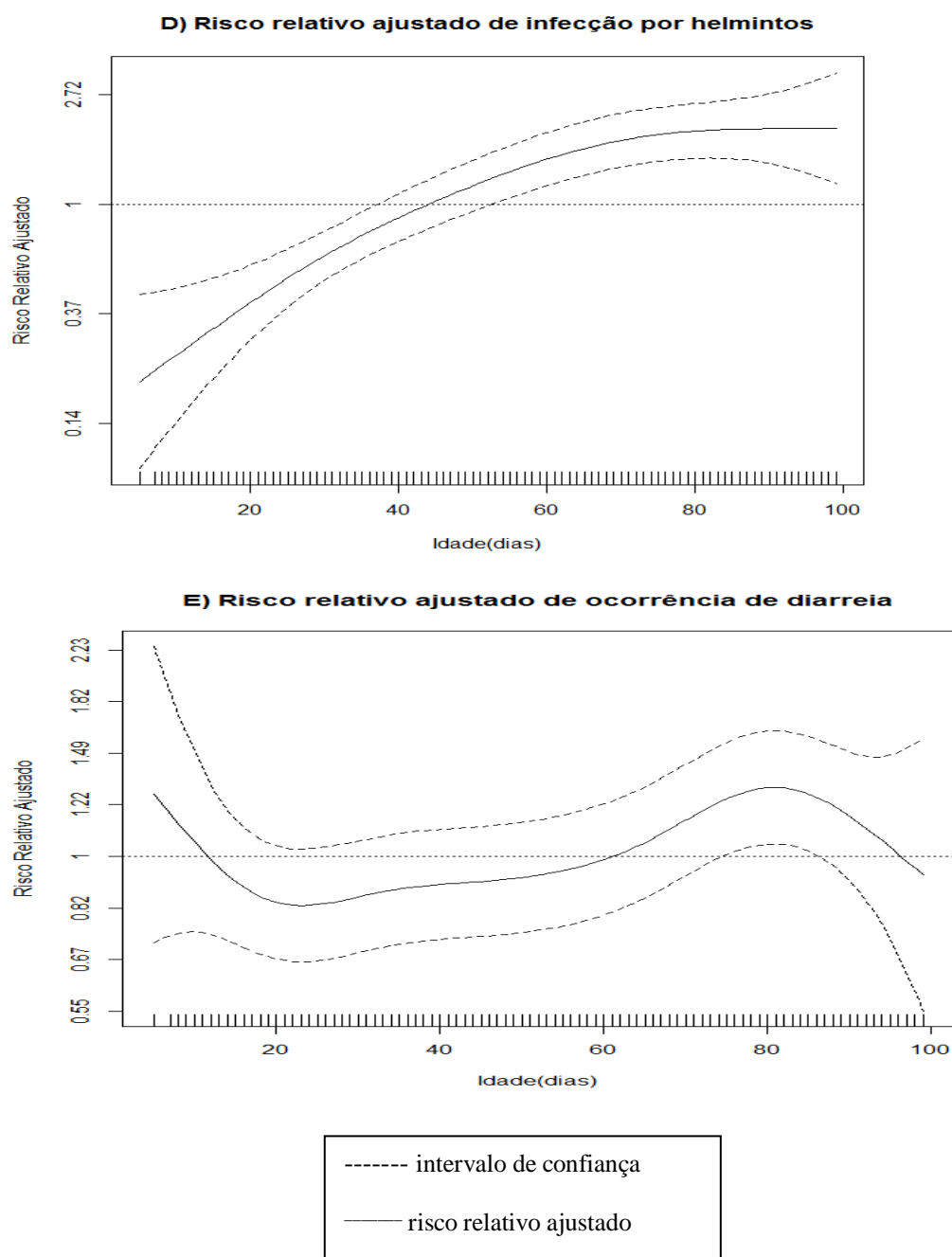


**B) Risco relativo ajustado de infecção por *Giardia intestinalis***



**C) Risco relativo ajustado de infecção por *Eimeria* spp.**



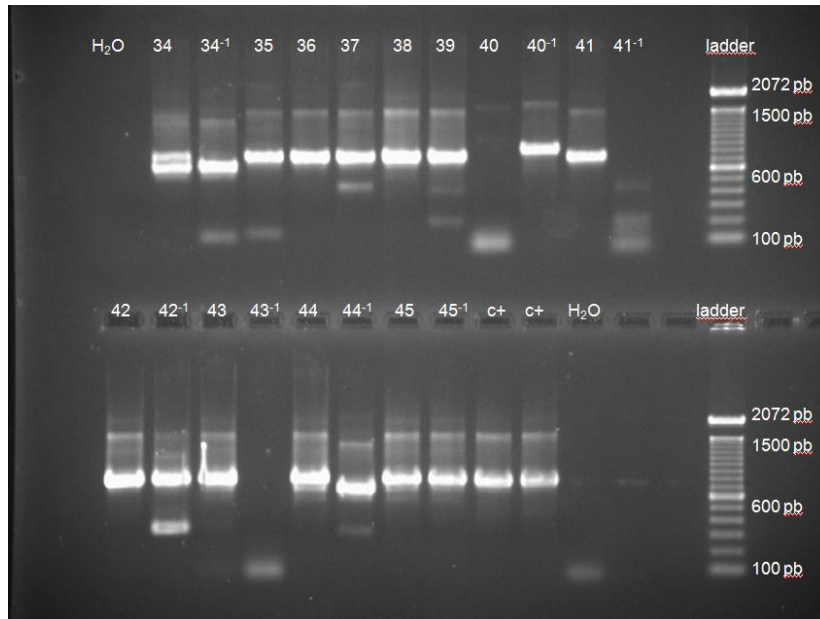


**Figura 3.** Modelos logísticos aditivos generalizados para o estudo da relação funcional do risco do animal: (A) eliminar oocistos de *Cryptosporidium* spp.; (B) eliminar cistos de *Giardia intestinalis*; (C) eliminar oocistos de *Eimeria* spp.; (D) eliminar ovos do tipo Strongylida; (E) apresentar diarreia de acordo com a idade em bezerras criadas no sistema de casinhas em uma produção leiteira do município de Piraí, no estado do Rio de Janeiro.

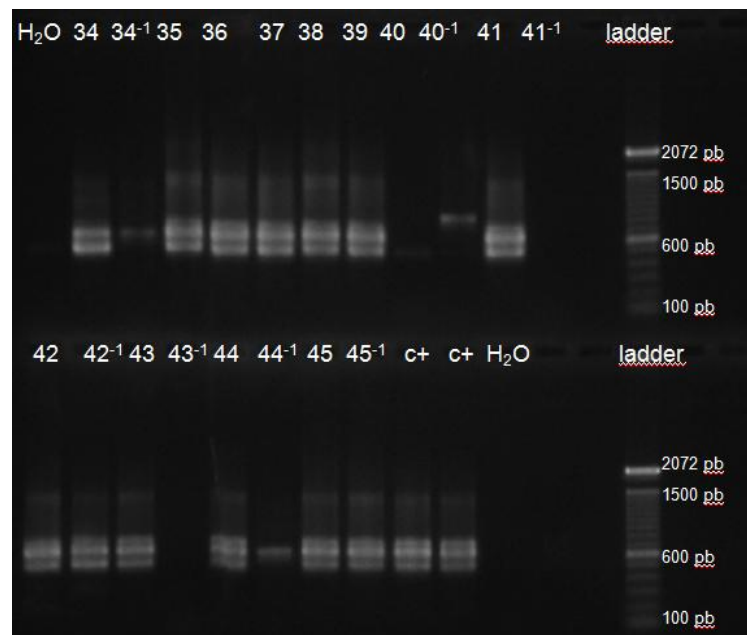
### 2.5.5 Análise Molecular

A concentração média de DNA nas amostras positivas para *Giardia* foi de 45 ng/ $\mu$ l (variando de 7,1-86,5 ng/ $\mu$ l).

Nas Figuras 7 e 8 são mostrados os resultados da PCR primária e “nested”, respectivamente, para *G. intestinalis*.

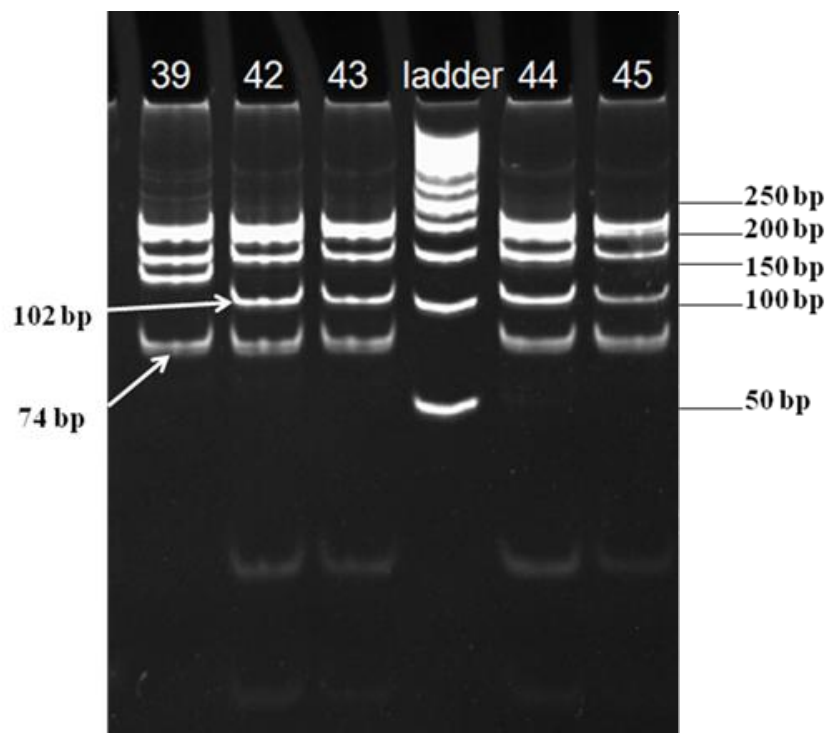


**Figura 4.** Resultado da PCR primária em gel de agarose para amplificação dos fragmentos do gene  $\beta$ - *Giardin* das amostras de *Giardia* (34 - 45), duas amostras controle (C+) e marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen) .



**Figura 5.** Resultado da PCR “nested” em gel de agarose para amplificação dos fragmentos do gene  $\beta$ - *Giardin* das amostras de *Giardia* (34 - 45), duas amostras controles (C+) e marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen) .

Após a confirmação da espécie com as duas reações de amplificação, foram selecionadas as dez amostras com maiores concentrações de DNA para serem submetidas à digestão com a enzima sendo identificados os genótipos A e E (Figura 9). O genótipo A foi identificado em 30% (3/10) e o genótipo E em 70% das amostras analisadas



**Figura 6.** Padrões de bandas visualizados em eletroforese após digestão de produtos de PCR de amostras (39, 42, 43, 44 e 45) com 753 pares de base com a enzima *HaeIII* e marcador de peso molecular de 50 bp (Fermentas, Ontario, Canadá).

Após a digestão com enzimas, cinco amostras foram enviadas para sequenciamento e quatro foram identificadas como genótipo E e uma como genótipo A, confirmando os resultados obtidos com a digestão com enzimas visualizados com eletroforese.

## 2.6 DISCUSSÃO

O percentual de bezerras com diarreia no presente estudo (95,7%) está bem acima dos 19,75% (390/1974) observados por Botteon et al. (2008) em bezerros lactentes de 1 a 90 dias em 20 propriedades nos municípios de Valença e Rio das Flores, ambos no estado do Rio de Janeiro e Rio Preto, estado de Minas Gerais. Não obstante, a porcentagem de bezerras com fezes não normais durante a segunda semana de vida (39%) foi maior que na primeira (7%) e na terceira semanas (21%), resultado similar ao obtido por Bartels et al. (2010), na Holanda, mas em estudo transversal, onde na segunda semana de vida 51,6% dos bezerros apresentaram fezes não normais, sendo maior que na primeira (38,2%) e na terceira (37,8%) semanas de idade.

Na Costa Rica, Pérez et al. (1998) coletaram amostras de fezes, sendo que 186 eram diarreicas e 194 eram normais, dentre as diarreicas, três amostras (1,6%) apresentaram *Salmonella* spp. e 2% dos bezerros com diarreia reagiram com antissoros de *E.coli* enteropatogênica. Fato que não foi observado no presente estudo, onde nenhuma colônia de *E. coli* foi classificada como EPEC/EIEC. Já o percentual de amostras positivas para *Samonella* spp. foi superior no presente estudo (3,2%) onde das 62 amostras analisadas, 2 eram positivas para o gênero. Diferente do observado no presente estudo, em que nenhum isolado caracterizado como *E. coli* aglutinou nos antissoros EPEC/EIEC, Saridakis et al. (1997) identificaram *E. coli* enteropatogênica em amostras de fezes de 153 bezerros no estado do Paraná, demonstrando, assim, sua ocorrência no rebanho brasileiro. Mesmo não tendo sido identificado no presente estudo, deve-se continuar dando a devida atenção a este agente que pode causar perdas econômicas na criação de bezerros.

A taxa de incidência de diarreia pode estar subestimada, tendo em vista a periodicidade semanal do estudo, onde o ideal seria a observação e coleta de amostras diariamente. Mesmo assim, a taxa de incidência de diarreia foi alta, contrastando com taxas bem mais baixas (1,05 e 0,88 por 100 bezerras-semanas) registradas em bezerros do nascimento até 16 semanas e do nascimento até 90 dias, nos Estados Unidos e na Suécia com observação diária, respectivamente (SIVULA et al., 1996; SVENSSON et al.; 2003). No entanto, a mortalidade por diarreia 0,84% (1/118) no presente estudo, está abaixo dos 3,31% (28/843) relatados por Sivula et al. (1996). As diferenças entre os resultados deste e dos estudos citados podem ser atribuídas em parte as diferentes metodologias usadas, a região e manejo dos animais.

A taxa de incidência de infecção por *Cryptosporidium* no presente estudo foi alta (13,2 casos por 100 bezerras-semana), quando comparado com pesquisa realizada nos Estados Unidos por Starkey et al., (2005), onde a incidência foi de 1,4 casos por 100 animais-semana. A taxa de incidência de animais infectados por *G. intestinalis* (16,6 casos novos por 100 bezerras-semana) também pode ser considerada alta, já que Mark-Carew et al. (2010) em Nova Iorque, relataram taxas de incidência bem mais baixas (0,28 casos novos por 100 animais-semana em coorte de baixo risco de ocorrência de infecção a 0,77 casos novos por 100 animais-semana em coorte de alto risco). A diferença entre os resultados dos autores acima e os do presente estudo pode em parte ser explicadas pelas faixas etárias dos animais acompanhados uma vez que a intensidade de infecção é menor nos animais adultos e pela sensibilidade das técnicas de diagnóstico utilizadas.

A análise do GAM para o risco de ocorrência de diarreia em diferentes faixas etárias mantém aderência com o comportamento da infecção por *Cryptosporidium* relatado por Santín et al. (2008) também em estudo longitudinal. Neste estudo, a relação linear observada entre o risco de infecção por *Cryptosporidium* e idade difere dos resultados de

Brook et al. (2008) que observaram uma relação não linear. No entanto, deve-se considerar a diferença entre os desenhos dos estudos, sendo o primeiro um estudo longitudinal e o segundo um estudo transversal. Além disso, Santín et al. (2008) observaram que cada espécie e genótipo de *Cryptosporidium* têm padrão de prevalência por período diferente em relação à idade dos bovinos, com *C. parvum* atingindo o pico na terceira semana de idade e a partir da quarta e décima semanas surgem *C. bovis* e *C. ryanae* que atingem o pico na décima sexta e décima oitava semanas, respectivamente. Considerando-se que no presente estudo, a elaboração do gráfico foi realizada com o resultado do exame de fezes, portanto sem distinção de espécies e tratando-se de um estudo longitudinal, a relação linear observada é explicada. A idade média das bezerras quando eliminaram oocistos de *Cryptosporidium* em Piraí foi de  $52,6 \pm 26,1$  dias. Estes resultados estão de acordo com os de Santín et al. (2008), que também em estudo longitudinal, observaram que bezerras com até 60 dias de idade têm maior risco de eliminação de oocistos. Em relação à precocidade de infecção, a primeira observação de oocistos nas fezes se deu aos cinco dias de idade, mais tardiamente que no estudo realizado por Castro-Hermida et al. (2002) na Espanha, onde a eliminação de oocistos de *C. parvum* ocorreu a partir de 3 dias. Resultado semelhante ao deste estudo, foi observado por Guimarães et al. (2009) em Minas Gerais, onde a eliminação mais precoce foi aos 6 dias de vida.

A idade média ( $40,1 \pm 20$  dias) das bezerras que eliminaram cistos de *G. intestinalis* foi maior que a observada por Guimarães et al. (2001) em animais da mesma faixa etária ( $30 \pm 19$  dias). Porém foi menor do que a média encontrada no estudo realizado no Canadá por O'Handley et al. (1999) com bezerros até 120 dias de idade, onde a mesma foi de  $89 \pm 7,1$ . O risco de infecção aumenta até 25 dias (Figura 2B) e decresce após, fato também observado em estudo longitudinal conduzido por Santín et al. (2009), no qual o número de animais infectados aumenta do nascimento até 4 a 5 semanas de idade. Além disso, em estudo transversal em quatro países da Europa, Geurden et al. (2012) observaram que a infecção ocorre em animais com menos de 2 meses e a proporção de positivos decresce gradualmente com a idade.

Em estudo com acompanhamento diário até 60 dias de idade e, a partir daí, semanal até 100 dias, Guimarães et al. (2009) observaram que o início mais precoce de eliminação de cistos de *G. intestinalis* nas fezes foi aos 17 dias e o mais tardio aos 25 dias de vida. Ao passo que neste estudo, a idade mais precoce foi aos oito dias e a mais tardia, aos 83 dias de vida, com média igual a  $27,2 \pm 14,3$ . Tal média foi pouco menor que a observada por O'Handley et al. (1999) na primeira eliminação ( $31,5 \pm 4,1$  dias). Já Mark-Carew et al. (2010) detectaram cistos em um bezerro com dois dias de idade, mas a maioria dos bezerros começou a eliminar cistos entre 11 e 20 dias de idade. A variação na precocidade das bezerras em eliminar oocistos/cistos relatada nos diversos estudos pode estar relacionada principalmente ao manejo, ao estado imune dos animais, à intensidade da infecção, que por sua vez está relacionada com a dose infectante, assim como, à sensibilidade da técnica utilizada para o diagnóstico e ao tipo de amostragem realizada, já que no presente estudo as amostras foram coletadas semanalmente, e não diariamente, que seria o ideal para determinar o dia exato de primeira eliminação de cistos. No presente estudo, a intensidade de infecção por *Cryptosporidium* spp. e *G. intestinalis* pode ser considerada baixa, uma vez que nenhum animal infectado apresentou mais que 5 cistos por campo da lâmina examinada. Silva- Junior et al. (2011) também relataram intensidade baixa /média de *G. intestinalis* ( $\leq 10$  cistos/lâmina), porém o uso de metodologia diferente para detecção de oocistos/cistos não permite comparação entre os resultados.

A presença de cistos de *G. intestinalis* e oocistos de *Cryptosporidium* de maneira equivalente em fezes diarreicas e normais corrobora os resultados de Björkman et al.

(2003) na Suécia com *G. intestinalis* e Brook et al. (2008) que afirmam que a consistência das fezes não tem correlação com eliminação de oocistos de *Cryptosporidium*. No entanto, são discordantes dos achados de Wade et al. (2000) que observaram eliminação de cistos de *G. intestinalis* duas vezes maior por animais com fezes diarreicas em relação aqueles com fezes normais. Já em estudo realizado na Índia por Singh et al. (2006) aproximadamente 83% das amostras fecais com oocistos de *Cryptosporidium* eram diarreicas, o mesmo aconteceu na Argentina (DEL COCO et al., 2008), onde 68% das bezerras que liberaram oocistos nas fezes tiveram diarreia. O fato de animais com fezes normais eliminarem oocistos e cistos tanto quanto aqueles com fezes diarreicas tem grande relevância epidemiológica, dado que estes se constituem em portadores assintomáticos, servindo de fonte de infecção para outros hospedeiros susceptíveis.

A eimeriose em bovinos é observada em todas as faixas etárias, mas é mais comum e importante em animais jovens. Em 86 fazendas polonesas, a prevalência nos animais investigados foi de 80,1% em bezerras de 3 a 9 meses, 18,2% naqueles de um a três meses e 1,7% entre os com 9 e 18 meses (KLOCKIEWICZ et al., 2007). Em Piraí o maior risco de eliminação de oocistos de *Eimeria* foi próximo dos 30 dias de vida, porém a idade média de infecção foi igual a 45 dias.

Na Holanda, Cornelissen et al. (1995) encontraram doze espécies de *Eimeria* em 38 rebanhos e verificaram que a prevalência variou de acordo com a faixa etária, sendo que *E. bovis*, *E. auburnensis* e *E. canadensis* apresentaram alta prevalência nos animais jovens. No presente estudo, das nove espécies identificadas *E. bovis* e *E. ellipsoidalis* foram as mais frequentes, nos animais de até 100 dias de vida. *Eimeria bovis* é uma das espécies mais diagnosticadas no Brasil, uma vez que muitos estudos relatam sua ocorrência (FIGUEIREDO et al., 1984; REBOUÇAS et al., 1994; ALMEIDA et al., 2011; BRUHN et al., 2012). No Município de Valença, que está situado na mesorregião do Sul Fluminense, a mesma que o Município de Piraí, no Estado do Rio de Janeiro, foram diagnosticadas dez espécies de *Eimeria* em bovinos de aptidão leiteira (FIGUEIREDO et al., 1984), demonstrando, que em geral, a infecção por *Eimeria* é multiespecífica (MENEZES; LOPES, 1995).

Em estudo realizado por Lima et al. (1997), em Minas Gerais, com bezerras do nascimento aos 27 meses de vida, os animais apresentaram infecção por helmintos gastrintestinais antes dos 2 meses de idade e apresentaram período crítico dessas infecções até os 18 meses. Neste estudo a maior ocorrência de eliminação de ovos se deu nos animais com mais de 45 dias de vida, tendo idade média de 64,9 dias. No entanto, a taxa de incidência da eliminação de ovos de helmintos não foi muito alta, provavelmente pelo fato da faixa etária estudada ser até 100 dias.

No estudo conduzido por Lima et al. (1997), com animais do nascimento aos 27 meses de vida, o gênero mais encontrado foi *Cooperia* e *Haemonchus* o segundo mais incidente. Assim como em estudo realizado no Rio de Janeiro por Pimentel Neto e Fonseca (2002), com bezerras entre 6 e 9 meses os helmintos mais prevalentes foram *Cooperia* spp. e *H. placei* com 88 e 10,6%, respectivamente. No presente estudo, não foi identificado o gênero *Cooperia* e *Haemonchus* foi o mais frequente, seguido de *Chabertia*, sendo o gênero *Haemonchus* um helminto causador de anemia, e o gênero *Chabertia* relacionado com diarreia em animais severamente afetados (SOUSLBY, 1982). O controle destas helmintoses necessita de cuidados para se evitar infecções que comprometam o desenvolvimento dos animais.

Em estudo realizado em Araçatuba, estado de São Paulo, com bezerras das raças holandesa (205 animais) e Nelore (208 animais), Feitosa et al. (2010) observaram entre 10 a 20% de falha de transferência de imunidade passiva dependendo do componente sanguíneo

e o padrão escolhido para interpretação. Resultado semelhante foi observado no presente estudo, no qual aproximadamente 15,0% das bezerras apresentaram falha, 15,0% com insuficiente e 69,5% adequada na transferência de imunidade passiva. No entanto, diferentemente do estudo de Feitosa et al. (2010), no presente estudo, as bezerras receberam o colostro na mamadeira, indicando que as falhas na transferência de imunidade estão ligadas a outros fatores, que pode ser decorrente da influência de maior liberação de adrenalina em algum momento no fornecimento deste colostro, seja pela temperatura ambiente, umidade, presença de dor, medo ou apreensão, que segundo Stott et al. (1976) pode influenciar na quantidade de imunoglobulinas absorvidas

Feitosa et al (2010) demonstraram que as principais perdas de bezerros ocorreram no período próximo do parto pela ocorrência de doenças infecciosas, confirmando a importância da realização de um teste para identificar os bezerros mais susceptíveis nos primeiros dias de vida para realização de manejo diferenciado e maior possibilidade de sucesso na criação. Reforçando a importância da falha na transferência de imunidade passiva, Furman-Fratczak et al. (2011) relatam que animais com concentrações altas de imunoglobulinas no sangue nas primeiras 60 horas de vida apresentaram morbidade e intensidade do curso da doença mais baixos, além de não adoecerem antes dos 14 dias de vida.

O sistema de criação em casinhas tem diversas vantagens como evitar a reinfecção das bezerras por micro-organismos que possam permanecer viáveis no local, já que utilizam o sistema de rotação e ter facilidade de limpeza, reduzindo assim o risco de diarreia por diversas etiologias (OLIVEIRA et al., 2005). Porém, tal sistema de criação não foi suficiente para impedir a ocorrência de parasitoses no rebanho, embora a presença de cistos nas fezes tenha ocorrido em proporções semelhantes naquelas diarreicas e normais. A alta incidência de parasitos nesta criação, provavelmente, se deve à má higienização do local com relação à retirada do material fecal e à lavagem dos comedouros e bebedouros, observada durante o período do estudo. A higiene e desinfecção de baldes e instalações são fatores fundamentais para o sucesso da criação e desenvolvimento das bezerras (OLIVEIRA et al., 2005). Segundo Bangoura et al. (2012), a limpeza e desinfecção dos alojamentos dos animais, e a troca de alojamentos são os pilares para o controle da coccidiose em bezerros. Na propriedade estudada apesar de haver um manejo estratégico de rotação das casinhas, não havia um manejo tático, importante para sanar problemas decorrentes de situações de emergência como excesso de chuva ou acúmulo de umidade que podem facilitar a manutenção de formas infectantes de parasitos nas pastagens. Outro aspecto observado nas visitas semanais, foi a presença eventual de animais adultos no local das casinhas com conseqüente eliminação de fezes contaminando a pastagem, provável fonte de infecção para as bezerras (Figura 10). Adicionalmente, moscas comumente presentes no ambiente das casinhas são vetores mecânicos de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* (CONN et al., 2007).





Embora o genótipo E de *G. intestinalis* seja o mais frequentemente identificado em bovinos (SOUZA et al., 2007; BARIGYE et al., 2008; MUHID et al., 2012), altas prevalências do genótipo A vêm sendo relatadas nesta espécie em várias partes do mundo (TROUT et al., 2004; SANTÍN et al., 2009; GEURDEN et al., 2012), enquanto o genótipo B também reportado neste hospedeiro (LALLE et al., 2005; COCKLIN et al., 2007; WINKWORTH et al., 2008), parece ser menos frequente. A identificação, nesse estudo, dos genótipos A e E, é semelhante ao encontrado por Souza et al. (2007) em São Paulo.. Os resultados de vários estudos transversais (TROUT et al., 2004, 2005, 2006, 2007) relatam o genótipo A como mais prevalente em bezerros lactentes e o genótipo E em bezerros desmamados, novilhas e vacas, indicando uma possível relação dos genótipos com a idade dos animais. No entanto, em um estudo longitudinal, no qual 30 bovinos foram acompanhados do nascimento até dois anos de idade, Santín et al. (2009), relatam maior prevalência do genótipo E em bezerros lactentes, enquanto que o genótipo A não foi encontrado nesta faixa etária. Esses autores afirmam que os genótipos A e E ocorrem simultânea ou consecutivamente e que os protocolos utilizados em vários estudos só detectam infecções mistas quando os genótipos estão presentes em quantidades aproximadamente iguais, caso contrário, só o genótipo predominante é detectado. Assim, sugerem que o genótipo A esteja sendo subnotificado porque o genótipo E está presente em níveis mais elevados. Mais recentemente, também em estudo longitudinal realizado em 34 fazendas, Mark-Carew et al. (2012) detectaram os genótipos A e E com todas as amostras identificadas como genótipo A pertencentes a bezerros com menos de 84 dias de idade. No presente estudo, 10 amostras foram caracterizadas molecularmente, todas eram de bezerras lactentes e apresentaram os genótipos A ou E, não sendo detectadas infecções mistas.

Deve-se ter em mente que as diferenças entre este e os outros estudos podem ser atribuídas a vários fatores, entre eles, região estudada, tipo de estudo, tipo de amostragem, tamanho das amostras e metodologia empregada na caracterização molecular. Considerando-se que o genótipo A de *G. intestinalis* é infectante para o ser humano e que este pode adquirir a infecção tanto por contato direto quanto pela contaminação da água e alimentos, esta parasitose reveste-se de importância em saúde pública dado que bezerras acometidas podem servir de fonte de infecção tanto para aqueles envolvidos nos trabalhos pecuários, como para a população de uma forma geral, indicando a necessidade de cuidados por parte do proprietário para tratamento dos dejetos desses animais evitando-se a contaminação dos mananciais e dos alimentos.

Apesar de alta, a incidência de diarreia produziu baixa letalidade possivelmente devido à baixa intensidade das infecções, além da patogenicidade dos bioagentes encontrados, em parte, ao sistema de criação adotado na propriedade, mesmo tendo apresentado algumas deficiências de higiene, e ao tratamento que era realizado em casos graves de diarreia. A semelhança entre a idade média das bezerras com diarreia e a idade média daquelas que eliminaram oocistos de *Cryptosporidium* spp., indica que dentre os bioagentes pesquisados este pode estar envolvido nos quadros diarreicos observados, tendo em vista que a diarreia é multifatorial, e outros agentes podem estar presentes neste rebanho.

O estudo em Piraí foi realizado em apenas uma propriedade, onde se utiliza tecnologias consideradas de ponta, como por exemplo, o tipo de fertilização empregado para dar origem a animais de maior valor genético. Todos os animais estavam sob as mesmas condições de manejo e climáticas, diminuindo assim a influência destas variáveis no resultado.

Este é o primeiro estudo que estima a incidência de diarreia e parasitos gastrintestinais em bezerras até 100 dias criadas em sistema de casinhas tropicais no

Estado do Rio de Janeiro. No entanto, mais estudos devem ser realizados envolvendo diversas fazendas e em diferentes regiões para obtenção de dados que possam propiciar acurácia e maior validade externa das informações geradas sobre a incidência de diarreia e parasitos e os genótipos de *Giardia intestinalis* presentes em rebanhos de bezerras criadas sob o sistema de casinhas.

## 2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, R.L. de. Mapa do Estado do Rio de Janeiro, com localização do Município de Pirai. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:RioDeJaneiro\\_Municip\\_Pirai.svg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:RioDeJaneiro_Municip_Pirai.svg)>. Acesso em: 28 dez 2012.

ALMEIDA, T.T.C. de. Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais. 2004. Tese (Doutorado em Serviços de Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6135/tde-22032005-093557/>>. Acesso em: 03 jan 2010.

ALMEIDA, V.A.; MAGALHÃES, V.C.S.; NETA, E.S.M.; MUNHOZ, A.D. Frequency of species of the genus *Eimeria* in naturally infected cattle in Southern Bahia, Northeast Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.20, n.1, p.78-81, 2011.

BANGOURA, B.; MUNDT, H-C.; SCHMÄSCHKL, R.; WESTPHAL, B.; DAUGSECHIES, A. Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing oocyst excretion. *Parasitology Research*, v.110, n.2, p.875-881, 2012.

BARIGYE, R.; DYER, N.W.; NEWELL, T.K.; KHAITSA, M.L.; TROUT, J.M.; SANTÍN, M.; FAYER, R. Molecular and immunohistochemical detection of assemblage E, *Giardia duodenalis* in scouring North Dakota calves. *Veterinary Parasitology*, v.157, n.3-4, p.196-202, 2008.

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

BARWICK, R.S.; MOHAMMED, H.O.; WHITE, M.E.; BRYANT, R.B. Prevalence of *Giardia* spp. And *Cryptosporidium* spp. on dairy farms in southeastern New York state. *Preventive Veterinary Medicine*, v.59, n.1, p.1-11, 2003.

BASSO, W.U.; VENTURINI, L.; RISSO, M.A. Comparación de técnicas parasitológicas para el examen de heces de perro. *Parasitologia al Día*, v.22, n.1-2, p.52-56, 1998.

BAXBY, D.; BLUNDELL, N; HART, C.A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *Journal of Hygiene*, v.93, n.2, p.317-323, 1984.

BJÖRKMAN, C.; SVENSSON, C.; CHRISTENSSON, B.; VERDIER, K. de. *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.44, n.3-4, p.145-152, 2003.

BOTTEON, R.C.C. M.; BOTTEON, P. T. L.; SANTOS JÚNIOR, J. C. B.; PINNA, M. H.; LÓSS, Z.G. Freqüência de diarréia em bezerros mestiços sobdiferentes condições de manejo na região do médioParaíba – Rio de Janeiro e Minas Gerais. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 45, n.2, p. 153-162, 2008.

BOYD, J.W. The relationship between serum immune globulin deficiency and disease in calves: a farm survey. *The Veterinary Record*, v.90, n.3, p.645-649, 1972.

BROOK, E.; HART, C.A.; FRENCH, N.; CHRISTLEY, R. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. *Veterinary Parasitology*, v.152, n.1-2, p.46-52, 2008.

BROOK, E.; HART, C.A.; FRENCH, N.; CHRISTLEY, R. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *The Veterinary Journal*, v.179, n.3, p.378-382, 2009.

BRUHN, F. R. P.; SILVA JÚNIOR, F. A.; CARVALHO, A. H. O.; ORLANDO, D. R.; ROCHA, C. M. B. M. DA; GUIMARÃES, A. M. Occurrences of *Eimeria* spp. and gastrointestinal nematodes in dairy calves in southern Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 2, p. 171-175, 2012.

CACCIÒ, S. M.; GIACOMO, M.; POZIO, E. Sequence analysis of the  $\beta$ -*giardin* gene and development of polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parasitology*, v.32, n.8, p.1023-1030, 2002.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; GONZÁLEZ-LOSADA, Y.A.; MEZO-MENÉNDEZ, M.; ARES-MAZÁS, E. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Veterinary Parasitology*, v.106, n.1, p.11-17, 2002.

CHAMBARELLI, M. M. do C. *Cryptosporidium* em bezerros destinados a exploração leiteira no estado do Rio de Janeiro: Padronização das técnicas moleculares, caracterização genotípica e influência do manejo na infecção. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <[http://r1.ufrrj.br/wp/ppgcv/category/teses\\_menu/page/16/](http://http://r1.ufrrj.br/wp/ppgcv/category/teses_menu/page/16/)>. Acesso em: 13 maio 2013.

CHARLES, T. P.; CAMPOS, O.F. de.; LUZIERE, R.S. Uso do teste de coagulação pelo glutataldeído como indicador do nível de imunoglobulinas no soro de bezerros recém-nascidos. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v.23, n.1, p.65-72, 1994.

COKLIN, T.; FARBER, J.; PARRINGTON, L.; DIXON, B. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Veterinary Parasitology*, v.150, n.4, p.297-305, 2007.

CONN, D.B.; WEAVER, J.; TAMANG, L.; GRACZYK, T.K. Synanthropic flies as vectors of *Cryptosporidium* and *Giardia* among livestock and wildlife in a multispecies agricultural complex. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v.7, n.4, p.643-651, 2007.

CORNELISSEN, A. W. C. A.; VERSTEGEN, R.; BRAND, H.; PERIE, N. M.; EYSKER, M.; LALM, T. J. G. M.; PIJPERS, A. An observational study of *Eimeria* species in housed cattle on Dutch dairy farms. *Veterinary Parasitology*, v. 56, n. 1-3, p. 7 - 16, 1995.

De la FUENTE, R.; GARCÍA, A.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; LUZÓN, M.; CID, D.; GARCÍA, S.; ORDEM, J.A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, v.36, n.2, p.145-152, 1998.

De la FUENTE, R.; LUZÓN, M.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; GARCÍA, A.; CID, D.; ORDEM, J.A.; GARCÍA, S.; SANZ, R.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30 day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Veterinary Parasitology*, v.80, n.3, p.179-185, 1999.

DEL COCO, V.F.; CÓRDOBA, M.A.; BASUALDO, J.A. *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, v.158, n.1-2, p.31-35, 2008.

ECKERT, J.; BRAUN, R.; SHIRLEY, M.W.; COUDERT, P. COST.89/820. Biotechnology: guidelines on techniques in coccidiosis research. Luxembourg: Office for official publications of the European communities, 1995. 300p.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, v.124, n.1, p.90-97, 2010.

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 nelore, 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*, v.30, n.8, p.696-704, 2010.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology reviews*, v.24, n.1, p.110-140, 2011.

FIGUEIREDO, P. C.; SERRA FREIRE, N. M.; GRISI, L. Eimerias de bovinos leiteiros no Estado do Rio de Janeiro: técnica de diagnóstico e espécies identificadas. *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro*. v. 24, n.1, p. 3 – 10, 1984.

FURMAN-FRATCZAK, K.; RZASA, A.; STEFANIAK, T. The influence of colostral immunoglobulin concentration in heifer calves serum on their health and growth. *Journal of Dairy Science*, v.94, n.11, p.5536-5543, 2011.

GARCIA, A.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; ORDEN, J.A.; CID, D.; SANZ, R.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; De La FUENTE, R. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comparative Immunology Microbiology Diseases*, v.23, n.3, p.175-183, 2000.

GEURDEN, T.; VANDERSTICHEL, R.; POHLE, H.; EHSAN, A.; von SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; MORGAN, E.R.; CAMUSET, P.; CAPELLI, G.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. A multicentre prevalence study in Europe on *Giardia duodenalis* in calves, with molecular identification and risk factor analysis. *Veterinary Parasitology*, v.190, n.3-4, p.383-390, 2012.

GOOGLE MAPS. Imagem de satélite do Google Earth. Disponível em: <<http://maps.google.com.br/>>. Acesso em: 28 dez 2012.

GUIMARÃES, A.M.; GUEDES, E.; CARVALHO, R.A. Ocorrência de *Giardia* spp. em bezerros leiteiros no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.6, p.652-653, 2001.

GUIMARÃES, L.B.; FACURY FILHO, E.J.; CARVALHO, A.U. de.; FERREIRA, P.M.; RIBEIRO, M.F.B.; FERREIRA, M.G.; FREITAS, M.D. Comportamento da excreção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de cistos de *Giardia* spp. em bezerros infectados naturalmente. *Ciência Animal Brasileira*, s.1, p.660-665, 2009.

HIN, L.Y.; LAU, T.K.; ROGERS, M.S.; CHANG, A.M. Dichotomization of continuous measurements using generalized additive modelling—application in predicting intrapartum caesarean delivery. *Statistics in Medicine*, v.18, n.9, p.1101–1110, 1999.

HUBER, F.; SILVA, S. da; BOMFIM, T.C.B.; TEIXEIRA, K.R.S.; BELLO, A.R. Genotypic Characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.150, n.1-2, p.65-74, 2007.

JIMÉNEZ, A.E.; FERNANDÉZ, A.; ALFARRO, R.; DOLZ, G.; VARGAS, B.; EPE, C.; SCHNIEDER, T. A cross-sectional survey of gastrointestinal parasites with dispersal stages in feces from Costa Rican dairy calves. *Veterinary Parasitology*, v.173, n.1-4, p.236-246, 2010.

KANEENE, J.B.; HURD, S. The national animal health monitoring system in Michigan. I. Design, data and frequencies of selected dairy cattle diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, v.8, n.2-3, p.103-114, 1990.

KLOCKIEWICZ, M.; KABA, ; TOMCZUK, K.; JANECKA, E.; SADZIKOWSKI, A. B.; RYPUŁA, K.; STUDZIŃSKA, M.; MAŁECKI-TEPICHT, J. The epidemiology of calf coccidiosis (*Eimeria* spp.) in Poland. *Parasitology Research*, v. 101, s1, p.5121-5128, 2007.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C. & WINN JR. *Diagnóstico Microbiológico*. Rio de Janeiro: MEDS, 2008. 1760 p.

LALLE, M.; POZIO, E.; CAPELLI, G.; BRUSCHI, F.; CROTTI, D.; CACCIÒ, S. Genetic heterogeneity at  $\beta$ -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal for Parasitology*, v. 35, n.2, p. 207-213, 2005.

LASSEN, B.; VILTROP, A.; RAAPERI, K.; JÄRVIS, T. *Eimeria* and *Cryptosporidium* in Estonian dairy farms in regard to age, species, and diarrhea. *Veterinary Parasitology*, v.166, n.3-4, p.212-219, 2009.

LEVINE, N.D. *Veterinary Protozoology*. Ames: Iowa State University Press, 1985, 414p.

LIMA, W.S.; FAKURI, E.; GUIMARÃES, M.P.; MALACCO, M.A. Dinâmica das helmintoses de bovinos de leite na região metalúrgica de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.6, n.2, p.97-103, 1997.

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

MALDONADO-CAMARGO, S.; ATWILL, R.E.; SALTIJERAL-OAXACA, J.A.; HERRERA-ALONSO, L.C. Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central México. *Preventive Veterinary Medicine*, v.36, n.2, p.95-107, 1998.

MATJILA, P. T.; PENZHORN, B. L. Occurrence and diversity of bovine coccidia at three localities in South África. *Veterinary Parasitology*, v. 104, n. 2, p. 93 - 102, 2002.

MARK-CAREW, M.P.; KHAN, Y.; WADE, S.E.; SCHAAF, S.; MOHAMMED, H.O. Incidence of and risks associated with *Giardia* infections in herds on dairy farms in the New York City Watershed. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 52, n.44, 2010.

MARK-CAREW, M.P.; WADE, S.E.; CHANG, Y-F.; SCHAAF, S.; MOHAMMED, H.O. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblages among dairy herds in the New York City Watershed. *Veterinary Parasitology*, v.185, n.2-4, p.151-157, 2012.

MARTIN, S.W.; MEEK, A.H.; WILLEBERG, P. *Epidemiología veterinaria: principios y metodos*. Zaragoza: Acribia, 1997. 384 p.

MEDRONHO, R.A.; BLOCH, K.V.; RAGGIO LUIZ, R.; WERNECK, G. L. *Epidemiologia*. São Paulo: Atheneu, 2008. 676 p.

MENEZES, R. de C.A.A. de; LOPES, C.W.G. Epizootiologia da *Eimeria arloingi* em caprinos na Microrregião Serrana Fluminense, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida*, v.17, p.5-12, 1995.

MOHAMMED, H.O.; WADE, S.E.; SCHAAF, S. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection on dairy cattle in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, v.83, n.1, p.1-13, 1999.

MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H.; MAYRHOFER, G., EY, P.L. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology and Evolution*, v.16, n.9, p.1135-1144, 1999.

MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C.A. *Cryptosporidium* and *Giardia* – zoonoses: fact or fiction? *Infection, Genetics and Evolution*, v.3, n.4, p.233-244, 2003.

MOORE, D.A.; ZEMAN, D.H. Cryptosporidiosis in neonatal calves 277 cases (1986-1987). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.198, n.11, p.1969-1971, 1991.

MUHID, A.; ROBERTSON, I.; NG, J.; YANG, R.; RYAN, U. Prevalence of *Giardia* spp. infection in pre-weaned and weaned calves in relation to management factors. *The Veterinary Journal*, v.191, n.1, p.135-137, 2012.

OLIVEIRA, A. A. de.; AZEVEDO, H. C. ; MELO, C. B. de.; Criação de bezerras em sistemas de produção de leite. Circular Técnica – EMBRAPA, 2005. Disponível em: [http://www.cpatc.embrapa.br/publicações\\_2005/ct-38.pdf](http://www.cpatc.embrapa.br/publicações_2005/ct-38.pdf). Acesso em: 24 abr 2012.

O'HANDLEY, R.M.; COCKWILL, C; McALLISTER, T.A.; JELINSKI, M.; MORCK, D.W.; OLSON, M.E. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v.214, n.3, p.391-396, 1999.

PÉREZ, E.; KUMMELING, A.; JANSSEN, M.M.H.; JIMÉNEZ, C.; ALVARADO, R.; CABALLERO, M.; DONADO, P.; DWINGER, R.H. Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of Tilarán, Costa Rica. *Preventive Veterinary Medicine*, v.33, n.1-4, p.195-205, 1998.

PIMENTEL NETO, M.; FONSECA, A.H. Epidemiologia das helmintoses pulmonares e gastrintestinais de bezerros em região de baixada do Estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.22, n.4, p. 148-152, 2002.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011).R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.R-project.org>> Acesso em: 15 set 2011.

RAMOS, N.M.D.Desenvolvimento da PCR em Tempo Real para amplificação do gene da Enzima Málica (ME) em isolados de *Giardia duodenalis*. 2010. Dissertação. (Mestrado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

REBOUÇAS, M. M; GRASSO, M.P.S.; SPÓSITO, F. E.; AMARAL, V.; SANTOS, S.M.; SILVA, D.M. Prevalência e distribuição de protozoários do gênero *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) em bovinos nos municípios de Altinópolis, Taquaritinga, São Carlos e Guairá - Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.3, n.2, p.125-130, 1994.

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, J.P. Methods for eggs counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.1, n.1, p.99-102, 1950.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R.A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, v. 155, n. 1-2, p. 15-23, 2008.



SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R.A longitudinal study of *Giardia duodenalis* genotypes in dairy cows from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, v.162, n.1-2, p.40-45, 2009.

SARIDAKIS, H.O.; GARED, S.A. El.; VIDOTTO, M.C.; GUTH, B.E.C. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. *Veterinary Microbiology*, v.54, n.2, p.145-153, 1997.

SINGH, B.B.; SHARMA, R.; KUMAR, H.; BANGA, H.S.; AULAKH, R.S.; GILL, J.P.S.; SHARMA, J.K. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Veterinary Parasitology*, v.40, n.1-2, p.162-165, 2006.

SILVA JUNIOR, F.A.; CARVALHO, A.H.O.; ROCHA, C.M.B.M.; GUIMARÃES, A.M. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das Vertentes de Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n. 8, p.690-696, 2011.

SIVULA, N.J.; AMES, T.R.; MARSH, W.E.; WERDIN, R.E. Descriptive epidemiology of morbidity and mortality in Minnesota dairy heifer calves. *Preventive Veterinary Medicine*, v.27, n.3-4, p.155-171, 1996.

SNODGRASS, D.R.; TERZOLO, H.R.; SHERWOOD, D.; CAMPBELL, I.; MENZIES, J.D.; SYNGE, B.A. Aetiology of diarrhoea in young calves. *Veterinary Records*, v.119, n.2, p.31-34, 1986.

SOULSBY, E. HELMINTHS, ARTHROPODS AND PROTOZOA OF DOMESTICATED ANIMALS. Philadelphia: Lea & Febiger. 1982. 809 p.

SOUZA, S.L.P.; GENNARI, S.; RICHTZENHAIM, L.J.; PENA, H.F.J.; FUNADA, M.R.; CORTEZ, A.; GREGORI, F.; SOARES, R.M. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. *Veterinary Parasitology*, v.149, n.3-4, p.258-264, 2007.

STARKEY, S.R.; WADE, S.E.; SCHAAF, S.; MOHAMMED, H.O. Incidence of *Cryptosporidium parvum* in the dairy cattle population in a New York City Watershed. *Veterinary Parasitology*, v.131, n.3-4, p.197-205, 2005.

STURBAUM, G.D.; REED, C.; HOOVER, P.J.; JOST, B.H.; MARSHALL, M.M.; STERLING, C.R. Species-specific, nested PCR- restriction fragment length polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, n.6, p.2665-2668, 2001.

SVENSSON, C.; LUNDBORG, K.; EMANUELSON, U.; OLSSON, S.-O. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, v.58, n.3-4. p.179-197, 2003.

TENNANT, B.; BALDWIN, B.H.; BRAUN, R.K.; NORCROSS, N.L.; SANDHOLM, M. Use of the glutaraldehyde coagulation test for detection of hypogammaglobulinemia in neonatal calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.174, n.8, p.848-853, 1979.

THOMPSON, R.C.A.; HOPKINS, R.A.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic grouping of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today*, v.16, n.5, p.210-213, 2000.

TROUT, J.M.; SANTÍN, M.; GREINER, E.C.; FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. *Veterinary Parasitology*, v.124, n.3-4, p.179-186, 2004.

TROUT, J.M.; SANTÍN, M.; GREINER, E.C.; FAYER, R. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in pos-weaned dairy calves. *Veterinary Parasitology*, v.130, n.3-4, p.177-183, 2005.

TROUT, J.M.; SANTÍN, M.; GREINER, E.C.; FAYER, R. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in 1-2 year old dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, v.140, n. 3-4, p.217-222, 2006.

TROUT, J.M.; SANTÍN, M.; GREINER, E.C.; FAYER, R. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in adult dairy cows. *Veterinary Parasitology*, v.147, n.3-4, p.205-209, 2007.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. 4. ed. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143 p.

XIAO, L.; HERD, R.P.; RINGS, D.M. Concurrent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. *Veterinary Parasitology*, v.51, n.1-2, p.41-48, 1993.

XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R.C.A.; FAYER, R.; LAL, A.A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n.8, p.3386-3391, 1999.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, v.17, n.1, p.72-77, 2004.

WADE, S.E.; MOHAMMED, H.O.; SCHAAF, S.L. Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five countries of southeastern New York. *Veterinary Parasitology*, v.93, n.1, p.1-11, 2000.

WINKWORTH, C.L.; LEARMONTH, J.J.; MATTHAEI, C.D.; TOWNSEND, C.R. Molecular characterization of *Giardia* isolates from calves and humans in a region in which dairy farming has recently intensified. *Applied Environmental Microbiology*, v.74, n.16, p. 5100-5105, 2008.

WOOD, S.N. *Generalized Additive Models: An Introduction with R*. Londres: Chapman and Hall/CRC. 2006. 410 p.

## **3 CAPÍTULO II**

### **DIARREIA EM UMA COORTE DE BEZERRAS NO MUNICÍPIO DE PIRAÍ, RIO DE JANEIRO: FATORES DE RISCO**

### 3.1 RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a associação entre a diarreia e possíveis fatores de risco para sua incidência, tais como: infecção por *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Eimeria* e nematóides, idade, falha na transferência de imunidade passiva (avaliada por meio do teste de coagulação pelo glutaraldeído), tipo de fertilização, mãe novilha ou vaca e peso ao nascer em bezerras criadas em sistema de casinhas em uma propriedade de produção leiteira de Piraí, Estado do Rio de Janeiro. Os dados analisados neste estudo referem-se ao acompanhamento de uma coorte de 118 bezerras do nascimento aos cem dias de idade até o término do período do estudo/ou morte/ou soltura, totalizando 94 semanas. Foi ajustado um modelo logístico aditivo generalizado (GAM) para avaliar a relação funcional entre o risco de ser acometido por diarreia e as variáveis, peso ao nascer e idade. Para estudar a relação entre o risco de ser acometido por diarreia e os possíveis fatores envolvidos em sua determinação, foram realizadas análises bivariadas e multivariadas, utilizando os modelos de regressão logística via equações estimadas generalizadas. Todas as variáveis foram incluídas nos modelos, sendo retiradas uma a uma, segundo a estatística de Wald, considerando-se também a plausibilidade biológica, até a obtenção do modelo final. Foram estimados os riscos relativos (RR) e seus respectivos intervalos com 90% de confiança. A análise pelo GAM mostrou uma relação linear crescente entre diarreia e peso ao nascer, assim, a variável peso ao nascer foi dicotomizada em  $< 40$  kg e  $\geq 40$  kg. Em função da relação não-linear entre diarreia e a idade, o banco de dados foi dividido em bezerras com até 30 e bezerras de 31 a 100 dias para fins de análise. O modelo final para bezerras com até 30 dias de idade, mostrou que o tipo de fertilização PIVE [RR= 0,33 (IC 90% 0,14; 0,75)] é um fator de proteção e a infecção por *Cryptosporidium* spp. [RR= 1,95 (IC 90% 1,22; 3,12)] fator de risco. O resultado do teste de coagulação pelo glutaraldeído negativo sugere ser um fator de risco para ocorrência de diarreia, indicando falha na transferência de imunidade passiva, embora sem significância estatística [RR=1,46 (IC 90% 0,98; 2,18)]. No modelo final para bezerras de 31 a 100 dias, há evidências estatísticas de que PIVE [RR=0,50 (IC 90% 0,28; 0,89)] e peso ao nascer  $\geq 40$  kg [RR= 0,65 (IC 90% 0,47; 0,89)] são fatores de proteção, enquanto que a infecção por *Cryptosporidium* spp [RR= 1,25 (IC 90% 0,95; 1,64)] deixa de ser um fator de risco significativo. Os resultados deste estudo indicam que parte da diarreia observada na faixa etária até 30 dias pode ser explicada pela infecção por *Cryptosporidium*, recomendando-se um melhor acompanhamento dos animais. Maior cuidado deve também ser dispensado na administração do colostro, visto que animais com hipoglobulinemia são mais sensíveis à ocorrência de diarreia. Embora, deva ser dispensada atenção a todos os animais com baixo peso ao nascer, especial cuidado deve ser dado àqueles na faixa etária de 31 a 100 dias.

**Palavras chave:** fatores de risco, estudo longitudinal, modelos via equações estimadas generalizadas

### 3.2 ABSTRACT

This work aimed study the association among diarrhea and risk factors for incidence, such as infection by *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Eimeria* and helminths, age, failure of passive immunity transference (FPT) - assessed by testing glutaraldehyde coagulation, type of fertilization (*in vitro* embryo production - IVP, artificial insemination - AI and natural mount), dam (heifer or cow) and birth weight of calves in individual calf pens under paddock in a farm of dairy production, in Piraí, State of Rio de Janeiro. The data analyzed refer to the following up of a cohort of 118 calves from birth to 100 days of age until the end the study/or death/ or release, in a total of 94 weeks. Generalized additive models (GAM) were adjusted to evaluate the functional relationship among the risk of being affected by diarrhea and the variables birth weight and age. To study the relationship among the risk of being affected by diarrhea and the factors involved in their determination were performed bivariate and multivariate analyzes, using logistic regression models by generalized estimated equations. All variables included in the models were withdrawn one by one, according Wald statistic, until obtaining the final model. The relative risks (RR) and their respective intervals with 90% confidence were estimated. The GAM shows a linear increasing relationship between birth weight and diarrhea. Thus, the variables were dichotomized birth weight < 40 kg and  $\geq 40$  kg. Due to non-linear relationship between age and diarrhea, the database was divided into up to 30 days and 31 to 100 days of age for purposes of analysis. The final model for calves up to 30 of age, type of fertilization IVP [RR=0.33 (90% CI 0.14; 0.75)] is a protective factor and infection by *Cryptosporidium* spp. [RR =1.95 (90% CI 1.22; 3.12)] risk factor. The negative result of the glutaraldehyde coagulation test, indicating failure in the passive immunity transference [RR =1.46 (90% CI 0.98; 2.18)] suggest to be a risk factor for the occurrence of diarrhea. In the final model for heifer calves 31 to 100 days old, IVP [RR =0.50 (90% CI 0.28; 0.89)] and birth weight  $\geq 40$  kg [RR=0.65 (90% CI 0.47; 0.89)] are protective factors, while infection by *Cryptosporidium* spp. [RR =1.25 (90% CI 0.95; 1.64)] is no significant. The result of this study indicate that part of diarrhea observed in the age group up to 30 days can be explained by *Cryptosporidium* infection, recommending better monitoring of these animals. The hypoglobulinemic heifer calves are more sensitive to the occurrence of diarrhea, so greater care should be dispensed in the administration of colostrum. Although attention should be given to all animals with low birth weight, special care should be given to those in the age group from 31 to 100 days.

**Key-words:** risk factors, longitudinal study, models via generalized estimated equations

### 3.3 INTRODUÇÃO

As diarreias estão entre os principais problemas de saúde em bezerros (WALTNER-TOEWS et al., 1986; KANEENE; HURD, 1990; SIVULA et al., 1996) porque podem levar ao atraso no crescimento, mortalidade e maior idade ao primeiro parto e, conseqüentemente, perdas econômicas diretas e/ou indiretas (TZIPORI, 1981; de GRAAF et al., 1999; HASCHEK et al., 2006). Adicionalmente às perdas econômicas, devem ser consideradas as implicações em saúde pública, devido ao caráter zoonótico de alguns bioagentes causadores, bem como aos resíduos de antibióticos e outras drogas, utilizados no controle das diarreias, que impossibilitam ou restringem a utilização do produto de origem destes animais na alimentação humana (FRANK; KANEENE, 1993).

A diarreia em bezerros tem etiologia multifatorial em que vírus, bactérias, protozoários e até o manejo pode ser a causa, além de fatores ambientais, nutricionais, imunológicos e possivelmente fatores genéticos (TZIPORI, 1981; de GRAAF et al., 1999; HASCHEK et al., 2006).

Apesar da falha na transferência passiva de imunoglobulinas ter sido identificada como fator de risco para a saúde de bezerros (SVENSSON et al., 2003; FURMAN-FRATCZAK et al., 2011) ainda há controvérsias quanto sua influência sobre o estado de saúde desses animais (SIVULA et al., 1996 e PIMENTA-OLIVEIRA et al., 2011).

A técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) foi relacionada à maior ocorrência de natimortos e mortalidade perinatal (NUMABE et al., 2000). Mais recentemente, Pimenta-Oliveira et al. (2011) relataram não haver influência desta técnica de fertilização sobre o status de saúde e performance de bezerros da raça Brahman, que apresentaram peso ao desmame semelhante aos gerados pelo emprego da técnica de inseminação artificial (IA). No entanto, o período de gestação e o peso ao nascer diferiram entre bezerros nascidos pelo emprego de PIVE e os nascidos pelo emprego de IA.

Na literatura, há vários estudos transversais sobre a ocorrência de diarreia e infecção por *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Eimeria* e helmintos em bovinos (PÉREZ et al., 1998; BARWICK et al., 2003; JIMENÉZ et al., 2010; BARTELS et al., 2010; GEURDEN et al., 2012; MUHID et al., 2012) e estudos sobre fatores de risco para infecções por protozoários que apontam a diarreia como uma consequência destas (MOHAMMED et al., 1999; MALDONADO-CAMARGO et al., 1998; GARBER et al., 1994).

Os estudos transversais, por suas características permitem avaliar a magnitude do problema por meio da análise da prevalência pontual, que é uma medida estática, porém não permitem avaliar a força da morbidade. Por outro lado, os estudos longitudinais são os que melhor possibilitam o conhecimento dos fatores envolvidos na determinação de eventos em saúde, sendo sua abordagem adequada para observação da dinâmica do evento por se basear em mais de uma amostra da mesma população (MARTIN et al., 1997; MEDRONHO et al., 2008). Além disso, dentre os observacionais, os estudos longitudinais prospectivos são os mais indicados para aferição de risco e inferência causal, não apresentando o problema da temporalidade dos estudos transversais, já que o acompanhamento dos indivíduos possibilita conhecer a antecedência da exposição em relação a doença (PEREIRA, 2002).

No Brasil, algumas fazendas leiteiras utilizam, para criação de bezerros, o sistema de criação em abrigos individuais a campo ou “casinhas”, que foi desenvolvido para minimizar os problemas sanitários das criações em bezerreiros e têm diversas vantagens como, por exemplo, proteção contra excesso de chuva e sol, facilidade de limpeza e deslocamento evitando acúmulo de umidade (OLIVEIRA et al., 2005). No entanto, apesar

de sua utilização, não existem estudos sobre a incidência e os fatores de risco para diarreia em bezerras criadas neste tipo de sistema.

Este trabalho teve como objetivo estudar a associação entre a diarreia e possíveis fatores de risco para sua incidência, tais como: presença de protozoários e helmintos, idade, absorção de colostro, tipo de fertilização, mãe e peso ao nascer em bezerras criadas em sistema de casinhas em uma propriedade de produção leiteira de Pirai, Estado do Rio de Janeiro.



## 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.4.1 Origem dos Dados

Os dados analisados neste estudo referem-se ao acompanhamento de uma coorte de 118 bezerras do nascimento aos cem dias de idade até o término do período do estudo, morreu ou soltura, totalizando 94 semanas, conforme descrito no capítulo 1.

Os dados sobre diarreia, imunoglobulinas no soro e infecção por *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Eimeria* e nematóides foram obtidos conforme descrito no capítulo 1. A data de nascimento, o tipo de fertilização e a mãe (novilha ou vaca) foram obtidos dos registros da fazenda. O peso ao nascer foi mensurado com a utilização de fita de pesagem, considerando raça holandesa como referência da relação perímetro torácico peso.

### 3.4.2 Análise Estatística

A presença/ausência de diarreia na população foi definida como a variável de desfecho utilizada para ser ajustada em função das seguintes variáveis explicativas: tipo de fertilização (inseminação artificial (IA), produção *in vitro* de embriões (PIVE) ou monta controlada), mãe (novilha ou vaca), absorção de colostro obtida pelo teste de coagulação pelo gultaraldeído (positivo, incompleto e negativo), peso ao nascimento (kg), infecção por *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Eimeria* e nematóides (positivo e negativo).

Modelo logístico aditivo generalizado (GAM) (HIN et al, 1999; WOOD, 2006) foi ajustado para avaliar a relação funcional entre o risco do animal ser acometido por diarreia e as variáveis contínuas peso ao nascer e idade. Tais modelos são úteis para simplificar os cálculos e as tomadas de decisões na categorização de alguma variável, quando necessário. Quando a análise mostrou uma relação não linear e/ou tal relação sugeriu alguma transformação na covariável estudada, as variáveis foram categorizadas para uma melhor interpretabilidade e controle dos efeitos de possíveis vieses.

As variáveis infecções por *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Eimeria* e nematóides foram re-categorizadas a partir dos resultados semi-quantitativos e de OPG/OoPG obtidos e descritos no capítulo 1, passando a ser consideradas amostras positivas ou negativas.

Análises bivariadas e multivariadas foram realizadas para estudar a relação entre o risco de ser acometido por diarreia e os possíveis fatores envolvidos em sua determinação, utilizando os modelos de regressão logística via equações estimadas generalizadas (*Generalized Estimating Equations - GEE*). A escolha destes modelos se deveu ao fato deste estudo tratar-se de um estudo longitudinal e, conseqüentemente, pressupõe-se a existência de alguma estrutura de autocorrelação entre as medidas dos mesmos animais aferidas ao longo das coletas. Tal estrutura pode variar de acordo com fontes naturais ou predisposições genéticas entre os animais em estudo. O GEE foi proposto inicialmente por Liang e Zeger (1986) e pode ser pensado como uma extensão dos Modelos Lineares Generalizados (MLG) (NELDER; WEDDERBURN, 1972), incluindo uma estrutura de correlação de “trabalho” (“*working*” *correlation matrix*).

Uma matriz de estrutura de correlação de trabalho mostra como as observações dentro de cada grupo estão correlacionadas. Assim, a estrutura (autorregressiva - pressupõe que a correlação dentro de um cluster diminui a medida que a distância entre as observações aumenta. A uniforme - assume que quaisquer duas observações dentro de um cluster têm a mesma correlação. A independente assume que as repetidas observações dentro de um cluster não estão correlacionadas e a não estruturada não faz suposição sobre a correlação de observações dentro de um cluster (KATZ, 2006). Neste estudo, os modelos foram ajustados com as estruturas de correlação de trabalho: autoregressiva, uniforme,

independente e não estruturada e a escolha foi realizada mediante a utilização do critério de informação de correlação (*Correlation Information Criterion – CIC*), proposto por Hin e Wang (2009), considerando que a estrutura de correlação com menor valor de CIC é a mais adequada.

Todas as variáveis foram incluídas no modelo que se denomina modelo completo e, a partir deste, foram sendo retiradas as variáveis, uma a uma, segundo a estatística de Wald (HARREL, 2001), observando-se também a plausibilidade biológica de cada um dos efeitos das variáveis com relação ao desfecho conforme sugerido por Katz (2006). A partir dos coeficientes de regressão, foram estimados os riscos relativos (RR) e seus respectivos intervalos com 90% de confiança.

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo, foi utilizado o critério baseado na quase-verossimilhança em relação ao modelo que pressupõe uma estrutura de correlação de trabalho independente (*Quasi-likelihood under the Independence Model Criterion - QIC*) proposto por Pan (2001) e Cui (2007), segundo o qual o modelo com menor valor de QIC é o melhor ajustado.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) e para ajustar os modelos GEE foram utilizados os pacotes gee (CAREY, 2012) e geepack (YAN et al., 2012).

### 3.5 RESULTADOS

A análise do modelo aditivo generalizado mostra relação linear crescente entre diarreia e peso ao nascer (Figura 1). Assim, a variável peso ao nascer foi dicotomizada em menor de 40 kg e maior ou igual a 40 kg.

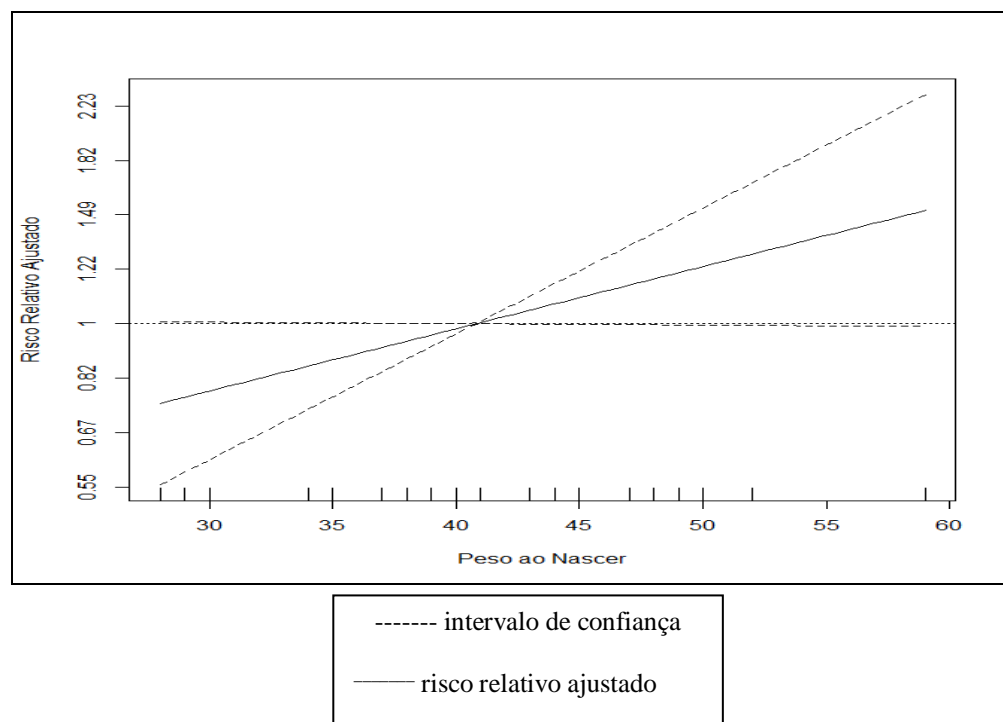


Figura 1 - Modelo logístico aditivo generalizado para o estudo da relação funcional do risco do animal ser acometido pela diarreia e o peso ao nascimento em bezerras criadas no sistema de casinhas em uma produção leiteira do Município de Piraí, no estado do Rio de Janeiro.

A relação entre diarreia e a idade está demonstrada graficamente no Capítulo 1 e é não-linear. Apesar da análise do gráfico mostrar que o maior risco relativo ajustado tenha sido nas primeiras semanas e em torno do 80º dia de vida, de acordo com a literatura os animais mais susceptíveis são os com idade até 30 dias. Assim, optou-se por estratificar o banco de dados em bezerras até 30 e de 31 a 100 dias, para fins de análise estatística.

A estrutura de correlação de “trabalho” mais adequada foi a não estruturada (Tabela 1), tanto para o estrato do banco com os dados das bezerras até 30 quanto para de 31 a 100 dias de idade, que passou a ser adotada em todas as análises seguintes.

À análise bivariada para animais até 30 dias de idade, somente as variáveis tipo de fertilização, a infecção por *Cryptosporidium* e absorção de colostro (resultado do teste de coagulação pelo glutaraldeído) foram significativos, ou seja, tiveram seus p-valores < 0,10. Já para as bezerras com idade variando de 31 a 100 dias, apenas o peso ao nascer maior ou igual a 40 quilos demonstrou-se estatisticamente significativo (Tabela 2).

Os modelos ajustados a partir do modelo completo para a faixa etária até 30 dias de idade podem ser observados na tabela 3. Observa-se que as variáveis: tipo de fertilização, na categoria produção *in vitro* de embriões e infecção por *Cryptosporidium* foram estatisticamente significativos para a ocorrência de diarreia (modelo 7). Mesmo sendo este o modelo com melhor ajuste ao comparar os valores de QIC obtidos, optou-se pelo modelo

6 devido à plausibilidade biológica da variável teste de coagulação pelo glutaraldeído, principalmente nesta faixa etária, mesmo não sendo estatisticamente significativa ( $p=0,12$ ).

**Tabela 1.** Escolha da estrutura de correlação de “trabalho” mais adequada pela comparação dos valores do critério de informação de correlação (CIC), estimados pelos modelos de regressão logística completos via equações estimadas generalizadas para bezerras de até 30 e de 31 a 100 dias de idade.

Idade (dias)	Estruturas de Correlação			
	Autoregressiva	Uniforme	Independente	Não estruturada
	Valores do CIC			
Até 30	10,05	10,03	10,00	9,61
31 a 100	16,64	16,43	16,37	15,90

**Tabela 2.** Análise bivariada do risco relativo (RR) de incidência de diarreia em bezerras do nascimento até 100 dias de idade, criadas em sistema de casinhas, no Município de Piraí, estado do Rio de Janeiro, no período de setembro de 2009 a junho de 2011.

Variável	Categoria	Idade (dias)			
		Até 30		31-100	
		RR[IC 90%]	p-valor	RR[IC 90%]	p-valor
Mãe	vaca (ref.)	1,00 [1,00-1,00]			
	novilha	0,86 [0,59-1,20]	0,51	0,88 [0,63-1,22]	0,52
Fertilização	monta controlada (ref.)	1,00 [1,00-1,00]			
	PIVE**	0,37 [0,14-0,94]	0,07*	0,75 [0,43-1,29]	0,38
	IA***	0,85 [0,53-1,37]	0,57	1,40 [0,87-2,29]	0,26
<i>Cryptosporidium</i>	negativo (ref.)	1,00 [1,00-1,00]			
	positivo	1,80 [1,13-2,87]	0,03*	1,22 [0,93-1,60]	0,22
<i>Giardia</i>	negativo (ref.)	1,00 [1,00-1,00]			
	positivo	0,77 [0,48-1,23]	0,36	0,80 [0,58-1,11]	0,27
<i>Eimeria</i>	negativo (ref.)	1,00 [1,00-1,00]			
	positivo	0,96 [0,65-1,43]	0,89	0,90 [0,72-1,12]	0,43
Teste de coagulação pelo glutaraldeído	positivo (ref.)	1,00 [1,00-1,00]			
	incompleto	1,31 [0,71-2,42]	0,46	0,89 [0,55-1,46]	0,71
	negativo	1,48 [1,00-2,19]	0,09*	1,21 [0,78-1,88]	0,47
Nematóides	negativo (ref.)	1,00 [1,00-1,00]			
	positivo	0,49 [0,13-1,81]	0,37	0,76 [0,55-1,05]	0,17
Peso ao nascer (Kg)	< 40 (ref.)	1,00 [1,00-1,00]			
	≥40	1,05 [0,72-1,53]	0,83	0,69 [0,51-0,94]	0,05*

\* variável significativa ( $p<0,10$ ), \*\*produção *in vitro* de embriões, \*\*\* inseminação artificial, IC=intervalo de confiança

**Tabela 3.** Modelos de regressão logística via equações estimadas generalizadas do risco de incidência de diarreia em bezerras do nascimento até 30 dias de idade, para a verificação dos critérios baseados na quase-verossimilhança sob o modelo de independência (QIC), com os respectivos valores de  $p$  ( $\alpha < 0,10$ )

Variável	Categoria	Modelo/p-valor						
		1	2	3	4	5	6	7
Mãe	vaca (ref.)							
	novilha	0,25	0,25	0,25	0,26	0,28	—	—
Fertilização	monta controlada (ref.)							
	PIVE**	0,02*	0,02*	0,02*	0,01*	0,01*	0,02*	0,03*
	IA***	0,46	0,46	0,56	0,56	0,52	0,61	0,59
<i>Cryptosporidium</i>	negativo (ref.)							
	positivo	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*
<i>Giardia</i>	negativo (ref.)							
	positivo	0,48	0,47	0,47	—	—	—	—
<i>Eimeria</i>	negativo (ref.)							
	positivo	0,90	—	—	—	—	—	—
Nematóides	negativo (ref.)							
	positivo	0,45	0,45	0,44	0,45	—	—	—
Peso ao nascer	< 40 (ref.)							
	≥ 40 kg	0,53	0,52	—	—	—	—	—
Teste de coagulação pelo glutaraldeído	positivo (ref.)							
	incompleto	0,64	0,64	0,65	0,66	0,65	0,54	—
	negativo	0,12	0,12	0,15	0,15	0,13	0,12	—
QIC		432,4	430,48	429,48	427,94	426,71	425,99	424,21

\* variável significativa ( $p < 0,10$ ), \*\*produção *in vitro* de embriões, \*\*\* inseminação artificial

No modelo final (Tabela 4), há evidências estatísticas de que a produção *in vitro* de embrião é um fator de proteção e a infecção por *Cryptosporidium* é um fator de risco e o resultado do teste de coagulação pelo glutaraldeído negativo sugere ser um fator de risco para ocorrência de diarreia.

Os modelos ajustados a partir do modelo completo, para bezerras de 31 a 100 dias de idade encontram-se na Tabela 5, na qual se observa que apenas as variáveis: tipo de fertilização - produção *in vitro* de embriões, e peso ao nascer maior ou igual a 40 kg tiveram seus p-valores  $< 0,10$ , até o sétimo modelo ajustado. No entanto, o valor da quase-verossimilhança sob o modelo de independência aumentou, demonstrando assim que o modelo anterior (modelo 6) que além destas variáveis contem a variável eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* produz um melhor ajuste. Diante do exposto, optou-se pelo modelo 6 como final.

**Tabela 4.** Modelo final de regressão logística via equações estimadas generalizadas para risco relativo (RR) de incidência de diarreia em bezerras do nascimento até 30 dias de idade criadas em sistema de casinhas em uma produção leiteira, no Município de Pirai, estado do Rio de Janeiro no período de setembro de 2009 a junho de 2011.

Variável	Categoria	RR [IC 90%]	p-valor
Tipo de fertilização	PIVE**	0,33 [0,14 – 0,75]	0,03*
Teste de coagulação pelo glutaraldeído	Negativo	1,46 [0,98 – 2,18]	0,12
<i>Cryptosporidium</i>	Positivo	1,95 [1,22 – 3,12]	0,02*

\* variável significativa ( $p < 0,10$ ), \*\*produção *in vitro* de embriões, IC=intervalo de confiança

**Tabela 5.** Modelos de regressão logística via equações estimadas generalizadas do risco de incidência de diarreia em bezerras de 31 a 100 dias de idade, para a verificação dos critérios baseados na quase-verossimilhança sob o modelo de independência (QIC), com os respectivos valores de  $p$  ( $\alpha < 0,10$ ).

Variável	Categoria	Modelo/p-valor						
		1	2	3	4	5	6	7
Mãe	vaca (ref.)							
	novilha	0,40	0,40	—	—	—	—	—
Fertilização	monta controlada (ref.)							
	PIVE**	0,02*	0,02*	0,05*	0,04*	0,06*	0,05*	0,06*
	IA***	0,59	0,60	0,53	0,53	0,54	0,56	0,55
<i>Cryptosporidium</i>	negativo (ref.)							
	positivo	0,17	0,15	0,16	0,18	0,18	0,18	—
<i>Giardia</i>	negativo (ref.)							
	positivo	0,35	0,31	0,30	—	—	—	—
<i>Eimeria</i>	negativo (ref.)							
	positivo	0,47	—	—	—	—	—	—
Nematóides	negativo (ref.)							
	positivo	0,22	0,21	0,22	0,23	0,19	—	—
Peso ao nascer	< 40 (ref.)							
	≥ 40 kg	0,03*	0,03*	0,02*	0,02*	0,04*	0,03*	0,03*
Teste de coagulação pelo glutaraldeído	positivo (ref.)							
	incompleto	0,55	0,50	0,56	0,58	—	—	—
	negativo	0,21	0,23	0,22	0,23	—	—	—
QIC		1277,5	1277,8	1274,3	1273,2	1264,1	1261,6	1262,2

\* variável significativa ( $p < 0,10$ ), \*\*produção *in vitro* de embriões, \*\*\*inseminação artificial

No modelo final (Tabela 6) observa-se que há evidências estatísticas de que a produção *in vitro* de embriões e peso ao nascer maior ou igual a 40 kg são fatores de proteção, enquanto que a infecção por *Cryptosporidium*, nesta faixa etária, deixa de ser um fator de risco estatisticamente significativo (p-valor = 0,18), porém a variável foi mantida por melhorar o ajuste do modelo e sugerir um aumento no risco de diarreia.

**Tabela 6.** Modelo final de regressão logística via equações estimadas generalizadas para risco relativo (RR) de incidência de diarreia em bezerras de 31 a 100 dias de idade, criadas em sistema de casinhas em uma produção leiteira, no Município de Piraí, estado do Rio de Janeiro no período de setembro de 2009 a junho de 2011.

Variável	Categoria	RR [IC 90%]	p-valor
Tipo de fertilização			
	PIVE**	0,50 [0,28 – 0,89]	0,05*
Peso ao nascer			
	≥ 40 kg	0,65 [0,47 – 0,89]	0,03*
<i>Cryptosporidium</i>			
	Positivo	1,25 [0,95 – 1,64]	0,18

\* variável significativa (p<0,10), \*\* produção *in vitro* de embriões, IC= intervalo de confiança.

### 3.6 DISCUSSÃO

A consistência das fezes não tem correlação com eliminação de oocistos de *Cryptosporidium*, segundo Brook et al. (2008). Já em estudo realizado na Índia por Singh et al. (2006) aproximadamente 83% das amostras fecais com oocistos de *Cryptosporidium* eram diarreicas, o mesmo aconteceu na Argentina (DEL COCO et al., 2008), onde 68% das bezerras que liberaram oocistos nas fezes tiveram diarreia. No presente estudo, os animais de zero a trinta dias apresentaram como fator de risco para a ocorrência de diarreia a presença de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes nas primeiras semanas de vida o que é coerente com o ciclo de vida do protozoário que acomete animais nesta faixa etária. Embora a liberação de oocistos do protozoário tenha sido observada em diferentes grupos etários, a população com maior risco de infecção é a de bovinos até 30 dias de idade (O'HANDLEY et al., 1999; WADE et al., 2000).

No presente estudo, o risco de diarreia foi significativo para bezerras até 30 dias de vida que eliminaram oocistos de *Cryptosporidium* spp. mantendo coerência com os relatos de Mohammed et al. (1999) que, ao realizarem um estudo para estabelecer os fatores de risco para a infecção por *Cryptosporidium* spp. em bovinos, observaram associação significativa entre idade e risco de infecção, apenas para bezerras com menos de 30 dias de vida.

A ingestão e absorção de colostro de maneira eficiente é um fator de proteção contra diarreia (RIBEIRO et al., 1983). Embora, Sivula et al. (1996) relatarem não haver diferença na mortalidade e morbidade entre os animais que tiveram adequada ou inadequada transferência de imunidade passiva, Svensson et al. (2003) ao estudarem as variáveis - local de nascimento, período de nascimento, se o parto foi supervisionado, o tempo em horas após o nascimento foi observada a ingestão de colostro, o método de fornecimento do colostro, e a fonte do colostro que os bezerras mamaram - e após análise demonstraram que bezerras que mamaram colostro de vacas de segunda lactação e nasceram à noite apresentaram maiores chances de ter diarreia e doenças respiratórias. Mais recentemente, Furman-Fratczak et al. (2011) observaram que a incidência de doenças em bezerras com falha na absorção de colostro foi de 81,8% enquanto que no grupo com ótima absorção de imunoglobulinas foi de 26,7%. No presente estudo, não obstante a ausência de significância estatística, pode-se considerar que a absorção insuficiente de colostro aumenta o risco de quadros diarreicos, dado que bezerras com ausência de imunoglobulinas no soro e aqueles com reação incompleta apresentaram risco maior RR= 1,460 [IC 90% 0,977;2,182] e RR= 1,246 [IC 90% 0,685; 2,265], respectivamente. Na espécie bovina, a imunidade passiva depende exclusivamente da absorção intestinal de imunoglobulinas durante as primeiras horas após o nascimento (BRIGNOLE; STOTT, 1980). No rebanho estudado, era utilizado colostro oriundo de um banco com colostro de qualidade, portanto a insuficiência de imunoglobulinas observada pode em parte ser decorrente da influência de maior liberação de adrenalina em algum momento no fornecimento deste colostro, seja pela temperatura ambiente, umidade, presença de dor, medo ou apreensão, que segundo Stott et al. (1976) pode influenciar na quantidade de imunoglobulinas absorvidas. Adicionalmente, Pimenta-Oliveira et al. (2011) observaram que o tipo de fertilização não influencia na ocorrência de falha na transferência de imunidade passiva e no estado de saúde do animal.

Em bezerras na faixa etária entre 31 e 100 dias de idade, o risco de diarreia não esteve significativamente associado à infecção por *Cryptosporidium*, fato que corrobora a importância deste protozoário em animais mais jovens (GARBER et al., 1994; QUILEZ et



al., 1996). Para esta faixa etária, o peso ao nascer é significativo fator de proteção, maior peso ao nascimento, menor taxa de mortalidade no período da criação (RAY, 1972). Em bezerras, o peso ao nascer é a primeira informação que indica o vigor e o desenvolvimento pré-natal do animal. Baixos pesos ao nascer são indesejados por estarem relacionados ao aumento na taxa de mortalidade na fase pré-desmame. Em contrapartida, elevados pesos ao nascer tendem a aumentar a ocorrência de distocias nos rebanhos (SCARPATI; LÔBO, 1999), que, por sua vez, interfere na transferência passiva da imunidade. Nenhuma bezerra incluída no estudo nasceu de parto distócico e apenas um caso de bezerras gêmeas ocorreu, sendo que ambas sobreviveram durante todo o período do estudo, não apresentando quaisquer sinais clínicos. Segundo Wells et al. (1996), bezerras que nasceram em parto distócico tiveram 4,2 mais chances de morrer nos primeiros 21 dias de vida quando comparado com os que nasceram em parto normal e bezerras gêmeas tiveram 1,9 mais chances de morrer nos primeiros 21 dias de vida que filhos únicos.

Os animais nascidos de produção *in vitro* de embriões foram mais resistentes a ocorrência de diarreia, para ambas as faixas etárias, possivelmente este fato se deva à rigorosa seleção dos pais e dos embriões gerados, pois apenas os mais viáveis são utilizados.

Apesar de as bezerras serem criadas separadas por faixas etárias, como preconizado por Heath (1992) e, até 100 dias, permanecerem no sistema de casinhas, no qual não têm contato umas com as outras, na fazenda, a infecção por *Cryptosporidium* é um fator de risco para diarreia em bezerras de até 30 dias de idade. Este fato, provavelmente, deve-se à má higienização do local com relação à retirada do material fecal e à lavagem dos comedouros e bebedouros de cada animal, além das condições insatisfatórias de bem estar animal como a exposição prolongada ao sol e ao calor, assim como ao frio, que pode ser uma das causas dos problemas respiratórios, que foram observados durante o período do estudo. A higiene e desinfecção de baldes e instalações são fatores fundamentais para o sucesso da criação e desenvolvimento das bezerras (OLIVEIRA et al., 2005). Em sistemas de criação sob confinamento em estábulos, a limpeza e desinfecção dos alojamentos dos animais e a troca de alojamentos são os pilares para o controle da coccidiose em bezerras (BANGOURA et al., 2012). Na propriedade estudada apesar de haver um manejo estratégico de rotação das casinhas, não havia um manejo tático, importante para sanar problemas decorrentes de situações de emergência como excesso de chuva ou acúmulo de umidade que pode facilitar a manutenção de ovos e oocistos nas pastagens. Outro aspecto observado, nas visitas semanais, foi presença eventual de animais adultos no local das casinhas e consequente eliminação de fezes que se constituem em fonte de contaminação da pastagem. Adicionalmente, moscas comumente presentes no ambiente das casinhas são vetores mecânicos de *Cryptosporidium* e *Giardia* (CONN et al., 2007).

Considerando-se as limitações deste estudo, dado que foram pesquisados todos os possíveis fatores e agentes biológicos que podem ser identificados como causadores de diarreia em bezerras os resultados obtidos indicam que parte da diarreia observada na população estudada, na faixa etária até 30 dias, pode ser explicada pela infecção por *Cryptosporidium*, recomendando-se melhor acompanhamento dos animais desse grupo. Maior cuidado deve também ser dispensado à administração do colostro, visto que animais com hipoglobulinemia são mais sensíveis à ocorrência de diarreia. Uma boa prática pode ser o emprego de um teste rápido para a detecção de imunoglobulinas no soro 24 horas após a ingestão do colostro a fim de identificar tais animais, aos quais poderão ser dispensados maiores cuidados.

Embora deva ser dispensada atenção a todos os animais, os nascidos com menos de 40 kg devem receber especial cuidado na faixa etária de 31 a 100 dias.

### 3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANGOURA, B.; MUNDT, H-C.; SCHMÄSCHKL, R.; WESTPHAL, B.; DAUGSECHIES, A. Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing oocyst excretion. *Parasitology Research*, v.110, n.2, p.875-881, 2012.
- BARTELS, C.J.M.; HOLZHAUER, M.; JORRITSMA, R.; SWART, W.A.J.M.; LAM, T.J.G.M. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, v.93, n.2-3, p.162-169, 2010.
- BARWICK, R.S.; MOHAMMED, H.O.; WHITE, M.E.; BRYANT, R.B. Prevalence of *Giardia* spp. And *Cryptosporidium* spp. on dairy farms in southeastern New York state. *Preventive Veterinary Medicine*, v.59, n.1, p.1-11, 2003.
- BRIGNOLE, T.J.; STOTT, G.H. Effect of suckling followed by bottle feeding colostrums on immunoglobulin absorption and calf survival. *Journal of Dairy Science*, v.63, n.3, p.451-456, 1980.
- BROOK, E.; HART, C.A.; FRENCH, N.; CHRISTLEY, R. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. *Veterinary Parasitology*, v.152, n.1-2, p.46-52, 2008.
- CAREY, V. J. Gee: Generalized Estimation Equation solver. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/gee/index.html>>. Acesso em: 03 abr 2012.
- CONN, D.B.; WEAVER, J.; TAMANG, L.; GRACZYK, T.K. Synanthropic flies as vectors of *Cryptosporidium* and *Giardia* among livestock and wildlife in a multispecies agricultural complex. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v.7, n.4, p.643-651, 2007.
- CUI, J. QIC program and model selection in GEE analyses. *The Stata Journal*, v.7, n.2, p.209-220, 2007.
- De GRAAF, D.C.; VANOPDENBOSCH, E.; ORTEGA-MORA, L.M.; ABBASSI, H.; PEETERS, J.E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*, v.29, n.8, p.1269-1287, 1999.
- DEL COCO, V.F.; CÓRDOBA, M.A.; BASUALDO, J.A. *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, v.158, n.1-2, p.31-35, 2008.
- FRANK, N.A.; KANEENE, J.B. Management risk factors associated with calf diarrhea in Michigan dairy herds. *Journal of Dairy Science*, v.76, n.5, p.1313-1323, 1993.
- FURMAN-FRATCZAK, K.; RZASA, A.; STEFANIAK, T. The influence of colostrum immunoglobulin concentration in heifer calves serum on their health and growth. *Journal of Dairy Science*, v.94, n.11, p.5536-5543, 2011.

- GARBER, L.P.; SALMAN, M.D.; HURD, H.S.; KEEFE, T.; SCHLATER, J.L. Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.205, n.1, p.86-91, 1994.
- GEURDEN, T.; VANDERSTICHELE, R.; POHLE, H.; EHSAN, A.; von SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; MORGAN, E.R.; CAMUSET, P.; CAPELLI, G.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUW, E. A multicentre prevalence study in Europe on *Giardia duodenalis* in calves, with molecular identification and risk factor analysis. *Veterinary Parasitology*, v.190, n.3-4, p.383-390, 2012.
- HARRELL JUNIOR, F. E. *Regression modeling strategies*. Nova-Iorque: Springer-Verlag, 2001. 570p.
- HASCHEK, B.; KLEIN, D.; BENETKA, V.; HERRERA, C.; SOMMERFELD-STUR, I.; VILCEK, S.; MOESTL, K.; BAUMGARTNER, W. Detection of bovine torovirus in neonatal calf diarrhoea in lower Austria and Styria (Austria). *Journal of Veterinary Medicine*, v.53, n.4, p.160-165, 2006.
- HEATH, S.E. Neonatal diarrhea in calves: investigation of herd management practices. *The Compendium Food Animal*, v.14, n.3, p.385-393, 1992.
- HIN, L.Y.; LAU, T.K.; ROGERS, M.S.; CHANG, A.M. Dichotomization of continuous measurements using generalized additive modelling—application in predicting intrapartum caesarean delivery. *Statistics in Medicine*, v.18, n.9, p.1101-1110, 1999.
- HIN, L.Y.; WANG, Y.G. Working-correlation-structure identification in generalized estimating equations. *Statistics in medicine*, v.28, n.4, p. 642-658, 2009.
- KATZ, M.H. *Multivariable Analysis. A practical Guide for clinicians*. Cambridge: Cambridge University, 2006. 203p.
- KANEENE, J.B.; HURD, S. The national animal health monitoring system in Michigan. I. Design, data and frequencies of selected dairy cattle diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, v.8, n.2-3, p.103-114, 1990.
- JIMÉNEZ, A.E.; FERNANDÉZ, A.; ALFARRO, R.; DOLZ, G.; VARGAS, B.; EPE, C.; SCHNIEDER, T. A cross-sectional survey of gastrointestinal parasites with dispersal stages in feces from Costa Rican dairy calves. *Veterinary Parasitology*, v.173, n.1-4, p.236-246, 2010.
- LIANG, K. Y.; ZEGER, S. L. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika*, v.73, n.1, p.13-22, 1986.
- MALDONADO-CAMARGO, S.; ATWILL, R.E.; SALTIJERAL-OAXACA, J.A.; HERRERA-ALONSO, L.C. Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Friesian dairy calves in central México. *Preventive Veterinary Medicine*, v.36, n.2, p.95-107, 1998.

MARTIN, S.W.; MEEK, A.H.; WILLEBERG, P. *Epidemiología veterinaria: principios y metodos*. Zaragoza: Acribia, 1997. 384 p.

MEDRONHO, R.A.; BLOCH, K.V.; RAGGIO LUIZ, R.; WERNECK, G. L. *Epidemiologia*. São Paulo: Atheneu, 2008. 676 p.

MOHAMMED, H.O.; WADE, S.E.; SCHAAF, S. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection on dairy cattle in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, v.83, n.1, p.1-13, 1999.

MUHID, A.; ROBERTSON, I.; NG, J.; YANG, R.; RYAN, U. Prevalence of *Giardia* spp. infection in pre-weaned and weaned calves in relation to management factors. *The Veterinary Journal*, v.191, n.1, p.135-137, 2012.

NELDER, J.; WEDDERBURN, R. Generalized Linear Models. *Journal of the Royal Statistical Society. Series A*, v.135, n.3, p. 370–384, 1972.

NUMABE, T.; OIKAWA, T.; KIKUCHI, T.; HORIUCHI, T. Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of in vitro or in vivo produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, v. 64, n.1-2, p.13–20, 2000.

OLIVEIRA, A. A. de.; AZEVEDO, H. C. ; MELO, C. B. de.; Criação de bezerras em sistemas de produção de leite. Circular Técnica – EMBRAPA, 2005. Disponível em: [http://www.cpatc.embrapa.br/publicações\\_2005/ct-38.pdf](http://www.cpatc.embrapa.br/publicações_2005/ct-38.pdf). Acesso em: 24 abr 2012.

O'HANDLEY, R.M.; COCKWILL, C; McALLISTER, T.A.; JELINSKI, M.; MORCK, D.W.; OLSON, M.E. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v.214, n.3, p.391-396, 1999.

PAN, W. Akaike's information criterion in generalized estimating equations. *Biometrics*, v.57, n.1, p.120-125, 2001.

PEREIRA, M. G. *Epidemiologia: teoria e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 596 p.

PEREZ, E.; KUMMELING, A.; JANSSEN, M.M.H.; JIMÉNEZ, C.; ALVARADO, R.; CABALLERO, M.; DONADO, P.; DWINGER, R.H. Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of Tilarán, Costa Rica. *Preventive Veterinary Medicine*, v.33, n.1-4, p.195-205, 1998.

PIMENTA-OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA-FILHO, J.P.; DIAS, A.; GONÇALVES, R.C. Morbidity-mortality and performance evaluation of Brahman calves from in vitro embryo production. *BMC Veterinary Research*, v.7, p.79-85, 2011.

QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; Del CACHO, E.; CLAVEL, A.; CAUSAPÉ, A.C. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, v.66, n.3-4, p.139-146, 1996.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.R-project.org>> Acesso em: 15 set 2011.

RIBEIRO, M.F.B.; BELÉM, P.A.D.; SALCEDO, J.H.P.; FARIA, J.E. de. Hipogamaglobulinemia em bezerros. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.35, n.4, p.537-546, 1983.

RAY, J.H.B. *El ternero- Volumen II Nutrición y Patología*. Zaragoza: Acribia, 1972. 199p.

SCARPATI, M.T.; LÔBO, R.B. Modelos animais alternativos para estimação de componentes de (co)variância e de parâmetros genéticos e fenotípicos do peso ao nascer na raça Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.28, n.3, p. 512-518, 1999.

SINGH, B.B.; SHARMA, R.; KUMAR, H.; BANGA, H.S.; AULAKH, R.S.; GILL, J.P.S.; SHARMA, J.K. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Veterinary Parasitology*, v.40, n.1-2, p.162-165, 2006.

SIVULA, N.J.; AMES, T.R.; MARSH, W.E.; WERDIN, R.E. Descriptive epidemiology of morbidity and mortality in Minnesota dairy heifer calves. *Preventive Veterinary Medicine*, v.27, n.3-4, p.155-171, 1996.

SVENSSON, C.; LUNDBORG, K.; EMANUELSON, U.; OLSSON, S.-O. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, v.58, n.3-4. p.179-197, 2003.

STOTT, G.H.; WIERSMA, F.; MENEFEE, B.E.; RADWANSKI, F.R. Influence of environment on passive immunity in calves. *Journal of Dairy Science*, v.59, n.7, p.1306-1310, 1976.

TZIPORI, S. The aetiology and diagnosis of calf diarrhoea. *Veterinary Record*, v.108, n.24, p.510-514, 1981.

WALTNER-TOEWS, D.; MARTIN, S.W.; MEEK, A.H. An epidemiological study of selected calf pathogens on Holstein dairy farms in Southwestern Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.50, n.3, p.307-313, 1986.

WADE, S.E.; MOHAMMED, H.O.; SCHAAF, S.L. Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five countries of southeastern New York. *Veterinary Parasitology*, v.93, n.1, p.1-11, 2000.

WELLS, S.J.; DARGATZ, D.A.; OTT, S.L. Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, v.29, n.1, p.9-19, 1996.

WOOD, S.N. *Generalized Additive Models: An Introduction with R*. Londres: Chapman and Hall/CRC, 2006. 410 p.

YAN, J.; HØJSGAARD, S.. HALEKOH, U. Geepack: Generalized Estimating Equation Package. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/geepack/index.html>>. Acesso em: 03 abr 2012.

## **4 CAPÍTULO III**

# **INFLUÊNCIA DA DIARREIA SOBRE O GANHO DE PESO EM BEZERRAS LEITEIRAS**

## 4.1 RESUMO

Este estudo teve como objetivos avaliar a influência da diarreia no ganho de peso semanal de bezerras leiteiras criadas no sistema de casinhas tropicais, controlando para as variáveis: peso ao nascer, idade, mãe novilha ou vaca, tipo de fertilização (inseminação artificial – IA, produção in vitro de embriões – PIVE ou monta controlada) e falha na transferência de imunidade passiva mensurada pelo teste de coagulação pelo gultaraldeído. Os dados analisados neste estudo referem-se ao acompanhamento de uma coorte de 118 bezerras do nascimento aos cem dias de vida até o término do período do estudo/ou morte/ou soltura, totalizando 94 semanas e 1457 pesagens. O ganho de peso foi obtido a partir do peso do bezerro mensurado a cada semana, subtraído do peso observado na semana anterior. Para estudar a relação do ganho de peso semanal e os possíveis fatores envolvidos em sua determinação, foram realizadas análises bivariadas e multivariadas utilizando os modelos de regressão gaussiano via equações estimadas generalizadas. O ajuste do modelo foi avaliado pelo critério baseado na quase-verossimilhança em relação ao modelo que pressupõe uma estrutura de correlação de trabalho independente (*Quasi-likelihood under the Independence Model Criterion - QIC*). Na análise bivariada, apenas a idade tem efeito, estatisticamente significativo, sobre o ganho de peso. Já na análise multivariada há evidências estatísticas de que quanto maior idade e o peso ao nascer, maior o ganho de peso. As variáveis, diarreia, tipo de fertilização e falha na transferência de imunidade passiva, sem significância estatística, permaneceram no modelo por melhorar o ajuste avaliado pelo valor do QIC. Para cada quilograma de peso ao nascer da bezerra, o ganho médio de peso semanal foi de 35,9g, conseqüentemente, os animais mais pesados ao nascimento tiveram um maior ganho de peso. As variáveis que influenciaram no ganho de peso das bezerras da propriedade, em geral, diferem das citadas na literatura, uma vez que a mãe e a absorção de imunoglobulinas a partir do colostro não tiveram efeito sobre o ganho de peso. Apesar do efeito da diarreia não ter se mostrado estatisticamente significativo sua relevância clínica deve ser considerada.

**Palavras chave:** modelo de regressão gaussiano, estudo longitudinal, sistema de casinhas tropicais.



## 4.2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of diarrhea in the weekly weight gain of dairy calves reared in individual calf pens under paddock, controlling the following variables: birth weight, age, dam (heifer or cow), the type of fertilization (*in vitro* embryo production - IVP, artificial insemination - AI and natural mount) and failure of passive immunity transference measured by glutaraldehyde coagulation test. The data analyzed in this study refers to the following up a cohort of 118 heifer calves from birth to one hundred days of life until the end of the study period / or death / or release, in a total of 94 weeks and 1457 weighings. The weight gain was obtained from calf weight measured every week subtracted from the observed weight in the previous week. To study the relationship of weekly weight gain and the possible factors involved in their determination were performed using bivariate and multivariate Gaussian regression models via generalized estimated equations. The model fit was assessed based on quasi-likelihood, that assumes a structure correlation independent work (Quasi-likelihood under the Independence Criterion Model - QIC). In bivariate analysis, only age has effect on weight gain statistically significant. In multivariate there is statistical evidence that in calves older and heavier at the birth greater is the weight gain. The other variables, although not significant, remained in the model for better fit evaluated by the value of QIC. For each kilogram of calf birth weight, the mean weight gain was 35.9 g hence the heavier calves at birth had a greater weight gain. The variables that influence the weight gain of calves in the farm in general differ from the cited literature since dam and absorption of immunoglobulins from the colostrum had no effect on weight gain. Although the effect of diarrhea has not been shown statistically significant, clinical relevance must be considered.

**Key-words:** Gaussian regression models, longitudinal study, tropical houses under individual paddocks

### 4.3 INTRODUÇÃO

O efetivo de bovinos no Brasil foi de 212,798 milhões de cabeças no ano de 2011, estando disperso por todo o território nacional. Embora seja encontrado em maior proporção na região Centro- Oeste do País (34,1%), a região Sudeste detém 18,5%. Dentre os produtos de origem animal, o leite apresentou um aumento de 3,6% em produção e 10,9% de aumento no preço (IBGE, 2011). A quantidade de vacas em lactação no Brasil alcançou a terceira posição, atrás da Índia e da União Europeia, porém, devido à menor produtividade de leite do nosso rebanho, a produção é bastante variável em nível nacional, desde 309 litros/vaca/ano, em Roraima, a 2.536 litros/vaca/ano no Rio Grande do Sul. Assim, o Brasil ocupa a sexta posição mundial na produção de leite (DAIRY, 2011).

Desempenho ruim, morbidade e mortalidade entre bezerros leiteiros resultam em maior custo de produção e reduzem a rentabilidade da indústria leiteira, assim como das criações (TROTZ-WILLIAMS et al., 2008).

As características de ganho de peso do nascimento ao desmame têm grande importância econômica e servem para avaliar o potencial genético de crescimento do bezerro, além da produção leiteira da vaca. Estas características são influenciadas por diversos efeitos ambientais, destacando-se sexo, mês e ano de nascimento, idade da vaca e idade do bezerro. Efeitos significativos de idade da vaca e idade do bezerro sobre os pesos e ganhos de peso no período pré-desmame têm sido descritos em diversos trabalhos realizados no Brasil e em outros países (AHUNU; MAKARECHIAN, 1986, 1987; CARDELINO; CASTRO, 1987; ELZO et al., 1987; EUCLIDES FILHO et al., 1991; SOUZA et al., 1994). A idade da vaca é fator de grande importância que deve ser levado em consideração nos programas de seleção e manejo dos rebanhos. Vacas mais velhas deram à luz a bezerros mais pesados que ganharam peso mais rápido até o desmame do que aquelas mais jovens (AHUNU; MAKARECHIAN, 1986). Em geral, as vacas de primeira cria desmamam bezerros de 10 a 15% mais leves que as vacas mais velhas. A presença de interações com raça, sexo e nível nutricional dos bezerros dificulta as estimativas deste efeito (PAZ et al., 1999). A absorção de imunoglobulinas pelos bezerros influencia não só na saúde e peso nas primeiras semanas de vida, mas também no futuro uso das vacas e quando quantidade inadequada de colostro é ingerida, resulta em maiores taxas de mortalidade, diarreia mais grave e menor ganho de peso (NOCEK et al., 1984; DeNISE et al., 1989; ROBISON et al., 1988; QUIGLEY et al., 1995; DONOVAN et al., 1998). Não obstante, Sivula et al. (1996) em uma análise bivariada, não encontraram diferenças significativas em relação a mortalidade, morbidade e a taxa de ganho de peso médio diário entre bezerros holandeses do nascimento até 16 semanas de idade com adequada e inadequada transferência de imunidade passiva. No entanto, em análise multivariada, bezerros que mamaram colostro de vacas de segunda lactação e nasceram à noite apresentaram maiores chances de terem diarreia e doenças respiratórias (SVENSSON et al., 2003).

Os tipos de fertilização, produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a inseminação artificial (IA), foram comparadas por Pimenta-Oliveira et al. (2011), que concluíram que a PIVE não afetou o estado de saúde, o desenvolvimento ou a transferência de imunidade passiva em bezerros Brahman. Além disso, os autores também observaram que a duração da gestação e o peso ao nascer foram significativamente maiores em bezerros derivados de PIVE, mas não foi observada diferenças no ganho de peso dos grupos comparados.

No entanto, ainda não se conhece o efeito da ocorrência de diarreia sobre o ganho de peso de bezerras do nascimento ao desmame. Este estudo teve como objetivos avaliar a influência da diarreia sobre o ganho de peso semanal de bezerras leiteiras criadas no

sistema de casinhas tropicais, controlando para as variáveis: peso ao nascer, idade, mãe, tipo de fertilização e absorção de colostro.

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1 Origem dos Dados

Os dados analisados neste estudo referem-se ao acompanhamento de uma coorte de 118 bezerras do nascimento aos cem dias de vida até o término do período do estudo/ou morte/ou soltura, totalizando 94 semanas. O material biológico e a metodologia para a realização do diagnóstico utilizado na análise do ganho de peso foram previamente descritos no Capítulo 1 desta tese, bem como a localização da propriedade, a coleta de dados e os animais utilizados no estudo. A data de nascimento; o tipo de fertilização (inseminação artificial-IA, produção *in vitro* de embriões-PIVE ou monta controlada) e a mãe (novilha ou vaca) foram obtidos dos registros da fazenda. O peso ao nascer foi mensurado com a utilização de fita de pesagem, considerando raça holandesa como referência da relação perímetro torácico – peso. O ganho de peso foi obtido a partir do peso da bezerra mensurado a cada semana, subtraindo o peso observado na semana anterior.

### 4.4.2 Análise Estatística

O ganho de peso semanal foi definido como variável desfecho, utilizada para ser ajustada em função das seguintes variáveis independentes: presença/ausência de diarreia, idade, tipo de fertilização, mãe, absorção de colostro verificada pelo resultado do teste de coagulação pelo gultaraldeído (positivo, incompleto e negativo) e peso ao nascimento.

Por se tratar de um estudo longitudinal, pressupõe-se a existência de alguma estrutura de auto-correlação entre as medidas dos mesmos animais aferidas ao longo das coletas, tal estrutura pode variar de acordo com fontes naturais ou predisposições genéticas entre os animais em estudo. Para lidar com este fenômeno, utilizando os modelos de regressão gaussiano via equações estimadas generalizadas (*Generalized Estimating Equations - GEE*), para estudar a relação entre ganho de peso e os possíveis fatores envolvidos na sua determinação. Este modelo foi proposto inicialmente por Liang e Zeger (1986) e pode ser pensado como uma extensão dos Modelos Lineares Generalizados (MLG) (NELDER; WEDDERBURN, 1972), incluindo uma estrutura de correlação de “trabalho” (“*working*” *correlation matrix*).

Para a escolha da estrutura de correlação de “trabalho” mais adequada foi utilizado o critério de informação de correlação (*Correlation Information Criterion – CIC*), proposto por Hin e Wang (2009). Os modelos foram ajustados com as seguintes estruturas de correlação de trabalho: autoregressiva, uniforme, independente, e não estruturada (KATZ, 2006).

Todas as variáveis foram incluídas no modelo, que denomina-se modelo completo e, a partir deste, foram sendo retiradas as variáveis, uma a uma, segundo a estatística de Wald (HARREL, 2001), observando-se também a plausibilidade biológica de cada um dos efeitos das variáveis com relação ao desfecho conforme sugerido por Katz (2006). A partir dos coeficientes de regressão, foram estimados os intervalos com 90% de confiança.

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo, foi utilizado o critério baseado na quase-verossimilhança em relação ao modelo que pressupõe uma estrutura de correlação de trabalho independente (*Quasi-likelihood under the Independence Model Criterion - QIC*) proposto por Pan (2001) e Cui (2007).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) e para ajustar os modelos GEE foram utilizados os pacotes gee (CAREY, 2012) e geepack (YAN et al., 2012).

## 4.5 RESULTADOS

O peso médio ao nascer dos bezerros foi de 40,8 kg e a distribuição do ganho de peso ao longo do estudo está demonstrado na figura 1.

As bezerras cuja quantidade de imunoglobulinas no sangue foi satisfatória, apresentaram ganho médio diário de 768g/animal/dia, enquanto que os animais com quantidade insuficiente, 778g/animal/dia. Considerando os animais nascidos de novilhas e vacas, o ganho de peso médio diário foi de 773g/animal/dia e 767g/animal/dia, respectivamente.

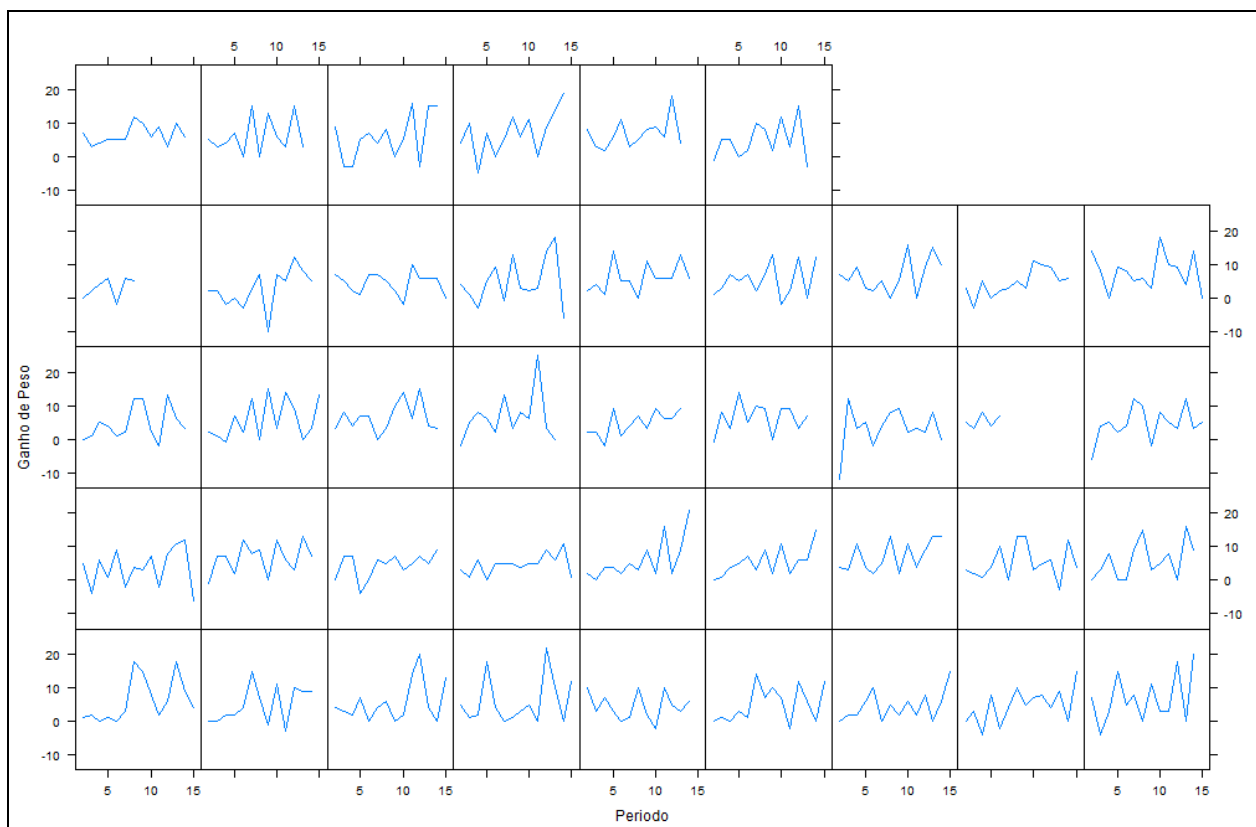


Figura 1. Distribuição do ganho de peso (kg) semanal de 42 bezerras até 100 dias, criadas no sistema de casinhas, no Município de Piraí, Rio de Janeiro de setembro de 2009 a junho de 2011.

A estrutura de correlação de “trabalho” mais adequada foi a independente (Tabela 1), que passou a ser adotada em todas as análises seguintes.

Tabela 1. Escolha da estrutura de correlação de “trabalho” de acordo com os valores do critério de informação de correlação (CIC), estimados a partir dos modelos de regressão gaussianos ajustado via equações estimadas generalizadas cheio para bezerras até 100 dias de idade.

	Estrutura de Correlação (Valores do CIC)			
	Não estruturada	Uniforme	Autoregressiva	Independente
	8,66	7,67	6,95	5,27

À análise bivariada apenas a idade teve efeito estatisticamente significativo sobre o ganho de peso ( $p < 0,10$ ) (Tabela 2).

Tabela 2. Análise bivariada de fatores determinantes do ganho de peso (kg) em bezerras do nascimento até 100 dias de idade, criadas em sistema de casinhas em uma produção leiteira, no Município de Piraí, estado do Rio de Janeiro no período de setembro de 2009 a junho de 2011.

Variável	Coefficiente de Regressão ( $\beta_i$ )	IC[90%]	p-valor
Diarreia	-0,15	[-0,59; 0,29]	0,59
Idade	0,06	[0,05; 0,06]	<0,001*
Mãe			
vaca (ref.)			
novilha	0,04	[-0,28; 0,35]	0,84
Tipo de fertilização			
monta controlada (ref.)			
PIVE**	-0,16	[-0,89; 0,57]	0,72
IA***	0,17	[-0,21; 0,56]	0,45
Teste de coagulação pelo glutaraldeído			
positivo (ref.)			
incompleto	0,13	[-0,26-0,53]	0,57
negativo	0,06	[-0,26-0,38]	0,76
Peso ao nascer	0,02	[-0,01-0,04]	0,39

\* variável significativa ( $p < 0,10$ ), \*\*produção *in vitro* de embriões, \*\*\* inseminação artificial, IC= intervalo de confiança

Os modelos ajustados a partir do modelo completo, com todas as variáveis do estudo, encontram-se na tabela 3. No modelo final (tabela 4), há evidências estatísticas de que quanto maior idade e o peso ao nascer, maior o ganho de peso. As variáveis diarreia, tipo de fertilização e teste de coagulação pelo glutaraldeído mesmo não-significativas, permaneceram no modelo (modelo 2) por melhorar o ajuste, avaliado pelo valor do QIC.

Tabela 3. Análise multivariada de fatores determinantes do ganho de peso em bezerras para a verificação dos critérios baseados na quase-verossimilhança sob o modelo de independência, estimados a partir dos modelos de regressão gaussianos ajustado via equações estimadas generalizadas.

Variável	Modelo (p-valor)			
	1	2	3	4
Diarreia	0.126	0.12	0.14	0.16
Idade	<0.001	<0.001*	<0.001	<0.001
Mãe				
vaca (ref.)				
Novilha	0.960	-----	-----	-----
Tipo de fertilização				
monta controlada (ref.)				
PIVE**	0.292	0.27	0.28	-----
IA***	0.802	0.79	0.73	-----
Teste de coagulação pelo glutaraldeído				
positivo (ref.)				
incompleto	0.210	0.19	-----	0.16
Negativo	0.304	0.30	-----	0.34
Peso ao nascer	0.098	0.10*	0.17	0.17
QIC	31968.5	31967.29	31987.4	31991.16

\* variável significativa ( $p < 0,10$ ) \*\*produção *in vitro* de embriões \*\*\* inseminação artificial

Tabela 4. Análise multivariada de fatores determinantes do ganho de peso (kg) em bezerras do nascimento até 100 dias de idade criadas em sistema de casinhas em uma produção leiteira, no Município de Piraí, estado do Rio de Janeiro no período de setembro de 2009 a junho de 2011.

Variável	Coefficiente de Regressão( $\beta_i$ ) [IC90%]	IC [90%]	p-valor
Diarreia	-0,39	[-0,80; 0,03]	0,12
Idade	0,06	[0,05; 0,07]	<0,001*
Tipo de fertilização			
monta controlada (ref.)			
PIVE**	-0,52	[-1,29; 0,25]	0,27
IA***	0,06	[-0,32; 0,44]	0,79
Teste de coagulação pelo glutaraldeído			
lutaraldeído			
positivo			
incompleto	0,31	[-0,08; 0,70]	0,19
negativo	0,23	[-0,13; 0,59]	0,30
Peso ao Nascer	0,03	[-0,0002; 0,07]	0,10*

\* variável significativa ( $p < 0,10$ ), \*\*produção *in vitro* de embriões, \*\*\* inseminação artificial, IC= intervalo de confiança.



## 4.6 DISCUSSÃO

A variação média do ganho de peso diário (806 g/animal/dia) foi mais alta do que as 640g/animal/dia, encontradas por Furman-Fratczak et al. (2011) na Polônia, também em bezerros da raça holandesa. Porém, outros fatores relacionados ao manejo, bem como o clima devem ser considerados, visto que nas estações de seca e de chuva Catto et al. (2009) encontraram variação de ganho de peso em bezerros de corte de 298g/animal/dia e 572g/animal/dia, respectivamente

Neste estudo, o peso médio ao nascer (40,8 kg), foi semelhante ao observado por Furman-Fratczak et al. (2011), na Polônia (39,4 kg), em animais da mesma raça. Embora, Elzo et al. (1987) relatem peso ao nascer menor em bezerros nascidos de mães novilhas, no presente estudo não há evidências de diferenças no peso de bezerros segundo as mães, uma vez que as médias de bezerras nascidas de vacas foi de 41,4 kg, e de novilhas, 40,1 kg.

No presente estudo, cada quilograma de peso ao nascer da bezerra aumentou em 35,9g o ganho médio de peso, conseqüentemente, os animais mais pesados ao nascimento tiveram um maior ganho de peso. O peso ao nascer tem influência decisiva na sobrevivência do bezerro, por determinar o vigor do animal. Além disso, é uma característica importante, por estar relacionado à ocorrência de partos distócicos (RESTLE et al. (2004), porém, nenhum parto distócico foi observado no rebanho durante o período do estudo. Por outro lado, o peso ao nascer pode ser influenciado pelo tipo de fertilização empregado. Pimenta-Oliveira et al.(2011) observaram diferenças significativas entre o peso ao nascimento de bezerros da raça Brahman oriundos de fertilização por PIVE e IA, sendo maiores em animais nascidos de PIVE. Não obstante, os autores também não observaram diferenças significativas entre os tipos de fertilização e o ganho de peso, o que foi corroborado neste estudo.

A ocorrência de diarreia sugere menor ganho de peso [ $\beta = -0,39$ , IC 90% (-0,80; 0,03)], o que era esperado, porém não estatisticamente significativo (p-valor= 0,12). No entanto, deve-se ressaltar que na fazenda estudada a severidade dos quadros diarreicos foi baixa, dado que a letalidade por diarreia foi de (1/113) conforme descrito no capítulo 1. Além disso, os animais com quadro mais severo foram medicados segundo critério estabelecido pelo médico veterinário da fazenda. Assim, a diarreia deve ser considerada como importante fator de perdas econômicas relacionadas tanto com a diminuição do peso, quanto com o aumento de gastos com medicamentos.

A absorção de quantidade suficiente de imunoglobulinas não foi estatisticamente significativa para ganho de peso. Ressalta-se que o colostro foi selecionado de vacas mediante avaliação da qualidade por colostrometro e administrado via mamadeira, o que garante a ingestão. Resultado semelhante foi encontrado por Furman-Fratczak et al. (2011) que também não observaram diferenças significativas no ganho de peso durante os primeiros 6 meses de vida. Entretanto os autores observaram que novilhas que com níveis de imunoglobulinas acima de 10g/L com 30 e 60 horas de vida apresentam melhor estado de saúde e alcançam peso corporal que permite maior precocidade na primeira inseminação, demonstrando assim que a absorção de imunoglobulinas pelas bezerras é importante para o desempenho das futuras novilhas. Não obstante, Robison et al. (1988) e Moraes et al. (2000) registraram menor ganho de peso em bezerros com falha na transferência passiva de imunidade. Porém, no estudo realizado por Robison et al. (1988) o efeito da imunidade adquirida sobre o ganho de peso apareceu mais fortemente na idade de 70 a 105 dias, que coincidiu com o período do desmame e o agrupamento dos bezerros, aumentando o estresse. O fato de que na fazenda estudada não houve mudança de ambiente

até os 100 dias de idade e o desmame era feito de forma gradativa até os 90 dias de idade, pode ter influenciado nos resultados obtidos, os animais não passaram por situações de estresse. Em estudo realizado por Ribeiro et al. (1983), o grupo com quantidades satisfatórias de imunoglobulinas apresentou maior ganho de peso, mesmo não sendo estatisticamente significativo, o que não foi observado no presente estudo, onde os animais com quantidade suficientes de imunoglobulinas no sangue apresentaram ganho médio diário muito semelhante aos animais com quantidade insuficiente, ou seja, com o resultado do teste do glutaraldeído negativo ou semi-sólido, 768g/animal/dia, 778g/animal/dia, respectivamente. No entanto, quando realizada a análise multivariada onde mantivemos controladas as variáveis de confusão, verificou-se que bezerras com teste do glutaraldeído incompleto ganharam mais peso que os animais negativos, ou seja os que não possuíam quantidade de imunoglobulina no sangue capaz de causar qualquer alteração no aspecto do soro durante a realização do teste. Conclui-se então, que embora não seja significativo, os animais com quantidade suficiente de imunoglobulinas no soro ganharam mais peso, estando de acordo com o observado por Ribeiro et al. (1983).

A mãe não produziu efeitos significativos sobre o ganho de peso, o que pode ser atribuído ao fato do colostro administrado às bezerras deste estudo, ser originário de vacas, que possuem maior concentração de imunoglobulinas no colostro do que novilhas (SHEARER et al., 1992).

As variáveis que influenciaram no ganho de peso das bezerras da propriedade, em geral, diferem das citadas na literatura, uma vez que a mãe e a absorção de imunoglobulinas do colostro não tiveram efeito sobre o ganho de peso. Por outro lado, embora o efeito da diarreia não tenha se mostrado estatisticamente significativo sua relevância clínica deve ser considerada.

#### 4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUNU, B.; MAKARECHIAN, M. Influence of birth date, sexo f calf, breed group and age of dam on preweaning performance of range calves. *Canadian Journal of Animal Science*, v.66, n.2, p.381-388, 1986.

AHUNU, B.; MAKARECHIAN, M. Preweaning patterns of growth in three breed groups of range beef calves. *Canadian Journal of Animal Science*, v.67, n.3, p.653-661, 1987.

CARDELLINO, R. A.; CASTRO, L. F. S. Efeitos ambientais e genéticos e fatores de correção para peso ao nascer, peso à desmama e ganho de peso pré-desmama, em bovinos Nelore. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v.16, n.1, p.14-27, 1987.

CAREY, V. J. Gee: Generalized Estimation Equation solver. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/gee/index.html>>. Acesso em: 03 abr 2012.

CATTO, J.B.; BIANCHIN, I.; SANTURIO, J.M.; FEIJÓ, G.L.D.; KICHELL, A.N.; SILVA, J.M. da. Sistema de pastejo rotenona e controle de parasitos em bovinos cruzados: efeito no ganho de peso e no parasitismo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.18, n.4, p.37-43, 2009.

CUI, J. QIC program and model selection in GEE analyses. *The Stata Journal*, v.7, n.2, p.209-220, 2007.

DAIRY. In: ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. *PSD: production, supply and distribution online*. Reports. Washington, D.C.: United States Department of Agriculture - USDA, 2011. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: set. 2012.

DeNISE, S.K.; ROBISON, J.D.; STOTT, G.H.; ARMSTRONG, D.V. Effects of passive immunity on subsequent production in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, v.72, n.2, p.552-554, 1989.

DONOVAN, G.A.; DOHOO, I.R.; MONTGOMERY, D.M.; BENNET, F.L. Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, v.34, n.1, p.31-46, 1998.

ELZO, M.A.; QUAAS, R.L.; POLLAK, E.J. Effects of age of dam on weight traits in the Simmental population. *Journal of Animal Science*, v. 64, n.4, p.992-1001, 1987.

EUCLIDES FILHO, K.; NOBRE, P.R.C.; ROSA, A.N. Idade da vaca e suas inter-relações com a fazenda, reprodutor e sexo do bezerro. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v.20, n.1, p.40-46, 1991.

FURMAN-FRATCZAK, K.; RZASA, A.; STEFANIAK, T. The influence of colostral immunoglobulin concentration in heifer calves serum on their health and growth. *Journal of Dairy Science*, v.94, n.11, p.5536-5543, 2011.

HARRELL JUNIOR, F. E. *Regression modeling strategies*. Nova Iorque: Springer-Verlag, 2001. 570p.

HIN, L.Y.; WANG, Y.G. Working-correlation-structure identification in generalized estimating equations. *Statistics in medicine*, v.28, n.4, p. 642-658, 2009.

IBGE - Produção da Pecuária Municipal, v.39, p.1-63, 2011. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2011/ppm2011.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf). Acesso em: set. 2012.

KATZ, M.H. *Multivariable Analysis. A practical Guide for clinicians*. Cambridge. Cambridge University, 2006. 203p.

LIANG, K. Y.; ZEGER, S. L. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika*, v.73, n.1, p.13-22, 1986.

MORAES, M.P.; WEBLEN, R.; REBELATTO, M.C.; SILVA, A.M. da. Relationship between passive immunity and morbidity and weight gain in dairy cattle. *Ciência Rural*, v.30, n.2, p.299-304, 2000.

NELDER, J.; WEDDERBURN, R. Generalized Linear Models. *Journal of the Royal Statistical Society. Series A*, v.135, n.3, p. 370–384, 1972.

NOCEK, J.E.; BRAUND, D.G.; WARNER, R.G. Influence of neonatal colostrum administration, immunoglobulin, and continued feeding of colostrums on calf gain, health and serum protein. *Journal of Dairy Science*, v.67, n.2, p.319-333, 1984.

PAN, W. Akaike's information criterion in generalized estimating equations. *Biometrics*, v.57, n.1, p.120-125, 2001.

PAZ, C.C.P. de.; ALBUQUERQUE, L.G. de.; FRIES, L.A. Fatores de correção para ganho de peso médio diário no período do nascimento ao desmame em bovinos da raça Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.28, n.1, p.65-73, 1999.

PIMENTA-OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA-FILHO, J.P.; DIAS, A.; GONÇALVES, R.C. Morbidity-mortality and performance evaluation of Brahman calves from in vitro embryo production. *Veterinary Research*, v.7, n?, p.79-85, 2011.

QUIGLEY, J.D.; MARTIN, K.R.; BEMIR, D.A.; POTGIETER, L.N.D.; REINEMEYER, C.R.; ROHRBACH, B.W.; DOWLEN, H.H.; LAMAR, K.C. Effects of housing and colostrum feeding on serum immunoglobulins, growth, and fecal scores of Jersey calves. *Journal of Dairy Science*, v.78, n.4, p.893-901, 1995.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.R-project.org>> Acesso em: 15 set 2011.

RESTLE, J.; PACHECO, P.S.; PASCOAL, L.L.; PÁDUA, J.T.; MOLETTA, J.L.; FREITAS, A.K. de.; LEITE, D.T. Efeito da pastagem, da produção e da composição do

leite no desempenho de bezerros de diferentes grupos genéticos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.3, p.691-703, 2004.

RIBEIRO, M.F.B.; BELÉM, P.A.D.; SALCEDO, J.H.P.; FARIA, J.E. de. Hipogamaglobulinemia em bezerros. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.35, n.4, p.537-546, 1983.

ROBISON, J. D.; STOTT, G. H.; DENISE, S. K. Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer. *Journal of Dairy Science*, v. 71, n.5, p.1283-1287, 1988.

SIVULA, N.J.; AMES, T.R.; MARSH, W.E.; WERDIN, R.E. Descriptive epidemiology of morbidity and mortality in Minnesota dairy heifer calves. *Preventive Veterinary Medicine*, v.27, n.3-4, p.155-171, 1996.

SHEARER, J.; MOHAMMED, H.O.; BRENNEMAN, J.S.; TRAM, T.Q. Factors associated with concentrations of immunoglobulins in colostrum at the first milking post-calving. *Preventive Veterinary Medicine*, v.14, n.1-2, p-143-154, 1992.

SVENSSON, C.; LUNDBORG, K.; EMANUELSON, U.; OLSSON, S.-O. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, v.58, n.3-4. p.179-197, 2003.

SOUZA, J.C. de; BRULÉ, A.O.; FERRAZFILHO, P.B.; OLIVEIRA, J.A.L.; ALENCAR, M.M de. Repetibilidade dos pesos e ganho de peso, do nascimento à desmama, de bovinos da raça Nelore. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v.23, n.1, p.133-139, 1994.

TROTZ-WILLIAMS, L.A.; LESLIE, K.E.; PEREGRINE, A.S. Passive immunity in Ontario dairy calves and investigation of its association with calf management practices. *Journal of Dairy Science*, v.91, n.10, p.3810-3819, 2008.

YAN, J.; HØJSGAARD, S. HALEKOH, U. Geepack: Generalized Estimating Equation Package. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/geepack/index.html>>. Acesso em: 03 abr 2012.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

Apesar de alta, a incidência de diarreia produziu baixa letalidade possivelmente devido a baixa intensidade das infecções, além da patogenicidade dos bioagentes encontrados e, em parte, ao sistema de criação adotado na propriedade. A semelhança entre a idade média das bezerras com diarreia a idade média daquelas que eliminaram oocistos de *Cryptosporidium* spp., indica que provavelmente este bioagente, dentre os pesquisados, é o principal responsável pelos quadros diarreicos observados.

Os resultados deste estudo indicam que parte da diarreia observada na população estudada, na faixa etária até 30 dias, pode ser explicada pela infecção por *Cryptosporidium*, recomendando-se um melhor acompanhamento dos animais nesta faixa etária. Maior cuidado deve também ser dispensado na administração do colostro, visto que animais com hipoglobulinemia são mais sensíveis à ocorrência de diarreia. Uma boa prática pode ser o emprego de um teste rápido para a detecção de imunoglobulinas no soro 24 horas após a ingestão do colostro a fim de identificar tais animais, aos quais poderá ser dispensado maior cuidado.

Adicionalmente, para a faixa etária de 31 a 100 dias atenção especial deve ser dispensada àqueles que nasceram com baixo peso.

As variáveis que influenciaram no ganho de peso das bezerras da propriedade, em geral, diferem das citadas na literatura, uma vez que a mãe e a absorção de imunoglobulinas do colostro não tiveram efeito sobre o ganho de peso. Por outro lado, embora o efeito da diarreia não tenha se mostrado estatisticamente significativo sua relevância clínica deve ser considerada.

Este é o primeiro estudo longitudinal que estima a incidência de diarreia e parasitos gastrintestinais, além de estudar possíveis fatores que influenciam em um menor desenvolvimento das bezerras até 100 dias criadas em sistema de casinhas tropicais no estado do Rio de Janeiro. No entanto, mais estudos devem ser realizados envolvendo diversas fazendas e em diferentes regiões para obtenção de dados que possam propiciar maior acurácia das informações geradas.

## **ANEXOS**

### **ANEXO A – SINTAXE DA ANÁLISE NO PACOTE ESTATÍSTICO R**

## ANEXO A – SINTAXE DA ANÁLISE NO PACOTE ESTATÍSTICO R

\*Variáveis utilizadas:

MAE2- mãe vaca ou novilha

FERT2- tipo de fertilização monta controlada, inseminação artificial ou produção *in vitro* de embriões

COL2- resultado do teste do glutaraldeído em positivo, incompleto ou negativo

PNASC2- peso ao nascer menor que 40 kg, ou maior ou igual e 40 kg

GIA4- presença de cistos de *Giardia* nas fezes – negativo ou positivo

CRY4- presença de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes – negativo ou positivo

EIM4- presença de oocistos de *Eimeria* nas fezes – negativo ou positivo

STRONG4- presença de ovos de helmintos nas fezes- positivo ou negativo

\*Modelos Aditivos Generalizados

```
modelo=gam(DIAR~s(IDADE),family=binomial,data=artigo,subset=IDADE<100)
```

```
summary(modelo)
```

```
plot(modelo)
```

\* QIC for GEE models using geeglm

```
# Refs:
```

```
# Pan (2001)
```

```
# Liang and Zeger (1986)
```

```
# Zeger and Liang (1986)
```

```
# Hardin and Hilbe (2003)
```

```
# Dornmann et al 2007
```

```
http://www.unc.edu/courses/2010spring/ecol/562/001/docs/lectures/lecture14.htm#choosing
```

```
QIC.binom.geeglm <- function(model.geeglm, model.independence)
```

```
#calculates binomial QAIC of Pan (2001)
```

```
#obtain trace term of QAIC
```

```
AIinverse <- solve(model.independence$geese$vbeta.naiv)
```

```
V.msR <- model.geeglm$geese$vbeta
```

```
trace.term <- sum(diag(AIinverse%*%V.msR))
```

```
#estimated mean and observed values
```

```
mu.R <- model.geeglm$fitted.values
```

```
y <- model.geeglm$y
```

```
px<- length(mu.R)
```

```
#scale for binary data
```

```
scale<- 1
```

```
#quasilikelihood for binomial model
```

```
quasi.R <- sum(y*log(mu.R/(1-mu.R))+log(1-mu.R))/scale
```

```
QIC <- (-2)*quasi.R + 2*trace.term
```

```
QICu <- (-2)*quasi.R + 2*px # Approximation assuming model structured correctly
```

```
output<- c(QIC, QICu, trace.term, quasi.R)
```

```
names(output) <- c('QIC', 'QICu', 'CIC', 'Quasi Lik')
```

```
output
```

```
QIC.binom.geeglm(modeloia, modelo)
```



```
sapply(list(modeloi, modeloia), function(x) QIC.binom.geeglm(x,modeloi))
QIC.binom.geeglm(x,modeloi)
QIC.binom.geeglm(x,modeloi)
names
list
```

\*Cálculo Risco Relativo e Intervalo de Confiança

```
source(epivet)
lreg.or <- function(model)
  lreg.coeffs <- coefficients(summary(model))
  lci<- exp(lreg.coeffs[ ,1] - 1.65 * lreg.coeffs[ ,2])
  or<- exp(lreg.coeffs[ ,1])
  uci<- exp(lreg.coeffs[ ,1] + 1.65 * lreg.coeffs[ ,2])
  lreg.or <- cbind(lci, or, uci)
lreg.or
```

\* Modelo de regressão logística via Equações Estimadas Generalizadas (GEE)

```
library(gee)
library(geepack)
```

\*Análise fatores de risco para diarreia

```
modeloa=geeglm(DIAR~IDADE+MAE2+FERT2+CRY4+GIA4+PNASC2+EIM4+STRO
NG4+COL2,family=binomial,data=artigo,subset=IDADE<30,id=ANIMAL,
corstr="unstructured")
summary(modeloa)
lreg.or(modeloa)
```

\*Análise da influência da diarreia sobre o ganho de peso

```
modeloa2=geeglm(GANHO~DIAR+IDADE+MAE2+FERT2+PNASC+COL2,family=gau
ssian,data=ganho,id=ANIMAL,corstr="independence")
summary(modeloa2)
```

# Comparando o modelo não estruturado com o independente

```
QIC.binom.geeglm(modeloa, modeloa1)
sapply(list(modeloa, modeloa1), function(x) QIC.binom.geeglm(x,modeloa))
```