



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS PRÉ E PÓS-ENCOLOSTRAMENTO,
EM VITELOS NASCIDOS EM DIFERENTES CONTEXTOS DE VACINAÇÃO MATERNA E
ENCOLOSTRAMENTO**

Rita Maria Rabiço Cerqueira

Coimbra, setembro de 2022



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS PRÉ E PÓS-ENCOLOSTRAMENTO,
EM VITELOS NASCIDOS EM DIFERENTES CONTEXTOS DE VACINAÇÃO MATERNA E
ENCOLOSTRAMENTO**

Coimbra, setembro de 2022

Rita Maria Rabiço Cerqueira

Aluna do Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Professora Doutora Sofia Alexandra

Giestas Cancela Duarte

Arguente: Professor Doutor Gonçalo Daniel dos Santos

Frouco

Orientador: Professora Doutora Anabela Maduro de

Almeida Francisco

Orientador Interno

Professora Doutora Anabela Almeida

Coorientador Interno

Dra. Elisabete Martins

Mestre Ricardo Cabeças

Orientador Externo

Dra. Dulce Filipe – Vetfilipe Lda

AGRADECIMENTOS

Nesta dissertação, momento de vitória e conclusão de um capítulo, não poderia deixar de agradecer a todos os que de alguma forma fizeram com que se tornasse possível.

Por todo o apoio e colaboração no desenvolvimento deste trabalho, quero agradecer aos meus orientadores internos, Professora Doutora Anabela Almeida, Dra. Elisabete Martins e Mestre Ricardo Cabeças.

À minha orientadora externa Dra. Dulce Filipe, quero agradecer toda a partilha de conhecimento e companheirismo que me proporcionou, bem como a colaboração do Dr. Joaquim Azevedo.

Quero agradecer também aos Produtores que participaram neste estudo, pela disponibilidade, sentido de responsabilidade e confiança que em mim depositaram.

Aos meus pais e família, por todo o apoio incondicional pois sem eles nada disto seria possível. Um forte obrigado à minha mãe que me proporcionou todas as oportunidades desta jornada.

Um agradecimento especial ao meu namorado, pela força e carinho nas horas mais difíceis.

Aos meus colegas e amigos de curso, que tornaram o caminho mais prazeroso, não poderia deixar de expressar a minha gratidão.

Índice Geral

Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	v
RESUMO.....	2
PALAVRAS-CHAVE	2
ABSTRACT	3
KEY WORDS.....	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1 Seleção das explorações e animais em estudo	7
2.2 Análise do colostro	10
2.3 Recolha das amostras de sangue e medição das proteínas plasmáticas totais	10
2.4 Determinação da falha de transferência de imunidade passiva	11
2.5 Avaliação da taxa de mortalidade	11
2.6 Análise estatística.....	11
3. RESULTADOS.....	12
3.1 Caracterização da amostra.....	12
3.2 Medição da qualidade do colostro.....	12
3.3 Medição das proteínas plasmáticas totais	13
3.4 Análise comparativa da variação das proteínas plasmáticas totais	14
3.4.1 Avaliação da influência da qualidade do colostro nas proteínas plasmáticas totais	16
3.4.2 Variação das proteínas plasmáticas totais em função do sexo dos vitelos, no tempo 2	17
3.4.3 Avaliação da influência da paridade das vacas mães nas proteínas plasmáticas totais dos vitelos no tempo 2.....	17
3.5 Análise da falha de transferência de imunidade passiva.....	18
3.6 Análise da morbilidade e mortalidade	19
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	20
4.1 Discussão.....	20
4.2 Conclusões.....	22
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	23

Índice de Figuras

Figura 1 - Evolução cronológica da imunidade no vitelo (adaptado de Hulbert & Moisés, 2016) e os dois momentos de colheita de sangue (T1 e T2).....	11
Figura 2 - Variação das proteínas plasmáticas totais em g/dL no soro dos vitelos, no tempo 1 e tempo 2, nas três explorações.	14
Figura 3 - Análise pós hoc dos valores de proteínas plasmáticas totais no tempo 1.....	15
Figura 4 - Análise pós hoc dos valores de proteínas plasmáticas totais no tempo 2.....	15
Figura 5 - Distribuição dos valores de proteínas plasmáticas totais dos vitelos da E1 no tempo 2 em função da qualidade do colostro.....	16

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Caracterização das explorações incluídas no estudo.....	8
Tabela 2 - Informação recolhida nas explorações.....	12
Tabela 3 - Informação recolhida sobre qualidade o colostro.	12
Tabela 4 - Proteínas plasmáticas totais (g/dL) observadas nos vitelos nos dois tempos de colheita...13	
Tabela 5 - Frequência da ocorrência de falha de transferência de imunidade passiva nas explorações em análise.	18
Tabela 6 - Regressão logística da ocorrência de FTIP na E1, com PPT em T1, PPT em T2 e %Brix do colostro como covariáveis.....	18
Tabela 7 - Regressão logística da ocorrência de FTIP nas três explorações, com <i>Exploração</i> , PPT em T1 e PPT em T2 como covariáveis.....	18
Tabela 8 - Mortalidade observada nas explorações em análise.	19

Lista de Siglas e Abreviaturas

DN	Doenças neonatais
FTIP	Falha de transferência de imunidade passiva
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
PPT	Proteínas plasmáticas totais
T1	Primeira colheita de sangue (após o nascimento e antes da primeira toma de colostro)
T2	Segunda colheita de sangue (3º dia de vida)
VM	Vacina materna

AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS PRÉ E PÓS-ENCOLOSTRAMENTO, EM VITELOS NASCIDOS EM DIFERENTES CONTEXTOS DE VACINAÇÃO MATERNA E ENCOLOSTRAMENTO

Rita Rabiço¹, Elisabete Martins¹, Ricardo Cabeças¹, Dulce Filipe², Anabela Almeida^{1,3}

¹Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG)/ Departamento de Medicina Veterinária. Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário - Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal; (ritacerqueira@live.com.pt; elisabete.martins@euvg.pt; ricardo.cabecas@euvg.pt)

²Vetfilipe, Lda., Avenida Arcebispo Dom Gaspar de Bragança 79, 4740-674, Barqueiros, Barcelos, Braga; (dulcef@live.com.pt)

³Coimbra Institute for Biomedical Imaging and Translational Research (CIBIT), University of 10 Coimbra, Edifício do ICNAS, Polo 3 Azinhaga de Santa Comba 3000-548 Coimbra, Portugal 11 (anabela.almeida@euvg.pt)

RESUMO

A diarreia é a causa de morte mais comum em vitelos durante o primeiro mês de idade. Esta tem um elevado impacto tanto no bem-estar animal como a nível económico, uma vez que incrementa os custos de tratamento, as perdas de potencial genético, provoca atrasos no crescimento e consequente aumento da idade ao primeiro parto. Os agentes etiológicos responsáveis por esta patologia são principalmente *Escherichia coli*, rotavírus, coronavírus e *Cryptosporidium parvum*.

O vitelo depende totalmente da ingestão de colostro para a transferência de imunoglobulinas da mãe, sendo por isso essencial promover um encolostramento de qualidade.

A vacinação materna com Rotavec® corona, uma vacina inativada para o controlo de diarreias neonatais, é uma das medidas utilizadas para melhorar a qualidade do colostro, uma vez que, quando administrada em dose única induz níveis significativos de imunidade lactogénica nas vacas, podendo esta ser posteriormente transmitida aos vitelos pelo colostro.

Este estudo pretendeu avaliar as potenciais diferenças na imunidade neonatal, pré e pós-colostrar, dos vitelos nascidos em três explorações, no mesmo período temporal, através da quantificação das proteínas plasmáticas totais (PPT). As três explorações diferiram entre si na utilização da vacina materna e controlo e seleção do colostro utilizado em primeira toma.

Numa das explorações, para além das proteínas plasmáticas totais, efetuaram-se medições de qualidade do colostro, através de um refratómetro de Brix manual. Os níveis de PPT foram avaliados em dois momentos (antes da toma do colostro e no terceiro dia de vida), usando um refratómetro ótico manual. Foi avaliada a falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) e a influência dos seguintes fatores: processo de encolostramento; data de nascimento do vitelo; morbilidade, mortalidade e tratamentos dos vitelos no período do estudo; manejo da vaca seca; tipo de parto e paridade.

Apesar de não ter sido possível provar a influência do fator Exploração na FTIP, o nível de proteínas plasmáticas totais nos vitelos foi influenciado pelo fator Exploração, em ambos os momentos de colheita. O género dos vitelos e a paridade das vacas mães não se revelaram fatores significativos na variação das PPT. A qualidade do colostro não foi influenciada pela paridade das vacas. Neste estudo foi possível observar que a incidência da FTIP foi muito inferior na Exploração 1 (10%), cujas vacas foram vacinadas com a vacina Rotavec Corona®, MSD, com medição da qualidade do colostro, frente à Exploração 3 (65,5%), cujas vacas não foram submetidas a esta vacina, nem se procedeu à avaliação do colostro. Este trabalho evidencia a importância de um bom protocolo vacinal e controlo da qualidade do colostro para uma boa transferência de imunidade passiva.

PALAVRAS-CHAVE

Vacinação materna, diarreia neonatal, qualidade do colostro, proteínas plasmáticas totais, falha de transferência de imunidade passiva.

ABSTRACT

Diarrhea is the most common cause of death in calves during the first month of age. This has a great impact in both animal welfare and economic level, since it increases treatment costs and genetic potential losses, causes growth delays and consequent increase in age at first calving. The etiological agents responsible for this pathology are mainly *Escherichia coli*, rotavirus, coronavirus and *Cryptosporidium parvum*.

The calf is totally dependent on colostrum intake for the transfer of immunoglobulins from the mother, thus it is essential to promote the quality colostrum protocol.

Maternal vaccination with Rotavec® corona, an inactivated vaccine for the control of neonatal diarrhea, is one of the measures used to improve colostrum quality, since, when administered in a single dose, it induces significant levels of lactogenic immunity in cows, which can be transmitted to calves by colostrum.

This study aimed to evaluate the potential differences in neonatal immunity, pre and post-colostral, of calves born in three farms, in the same time period, through the quantification of total plasma protein (PPT). The three farms differ in the use of maternal vaccine and in the control and selection of colostrum used in the first intake.

In one of the farms, beyond the PPT, colostrum quality measurements were performed using a manual Brix refractometer. Levels of PPT were evaluated at two time points (before colostrum intake and on the third day of life) using a manual optical refractometer. Failure of passive immunity transfer was evaluated, and the influence of the following factors were analyzed: colostrum protocol; calf birth date; morbidity, mortality and treatments of calves during the study period; dry cow management; type of calving and parity.

Although it was not possible to prove the influence of the Exploration factor on FTIP, the total plasmatic protein level in calves was influenced by the Exploration factor, in both moments. The gender of the calves and parity of the dams was not significant in the variation of PPT. Colostrum quality was not influenced by cow parity.

It was possible to observe that the incidence of FTIP was much lower in Exploration 1 (10%), whose cows were vaccinated with the Rotavec Corona ® vaccine, MSD, with measurement of colostrum quality, compared to Exploration 3 (65,5%), whose cows were not subjected to this vaccine, nor was the colostrum quality measured. This study highlights the importance of a good vaccination protocol and colostrum quality control to a good transfer of passive immunity.

KEY WORDS

Maternal vaccination, neonatal diarrhea, colostrum quality, total plasma proteins, failure of passive immunity transfer.

1. INTRODUÇÃO

A mortalidade nos primeiros três meses de idade em vitelos representa 25% da mortalidade total (Hyde et al., 2020). As doenças neonatais (DN) são a principal causa de perdas económicas, resultando no aumento dos custos de tratamento, na perda de potencial genético, atrasos no crescimento e consequente aumento da idade ao primeiro parto, com grande impacto não só económico, mas também no bem-estar animal (Bazeley, 2003; Hyde et al., 2020; Mourits et al., 1997; Yimer et al., 2015).

As principais doenças que se manifestam nos vitelos antes do desmame são diarreia e pneumonia (Virtala et al., 1996; Radostits et al., 2014), sendo a diarreia neonatal a causa de morte mais comum durante o primeiro mês de idade (Grunberg, 2021), responsável por 57% da mortalidade nos vitelos desta faixa etária (USDA, 2008). Os agentes etiológicos mais frequentemente identificados nesta patologia são os seguintes: *Escherichia coli*, rotavírus, coronavírus e *Cryptosporidium parvum* (Grunberg, 2021).

Por se tratar de doenças que ocorrem muito precocemente na vida do animal, a sua prevenção e controlo baseia-se essencialmente numa boa imunização passiva, vacinação e otimização do manejo e ambiente (Uetake, 2013).

A transferência de imunoglobulinas (Ig) da mãe para o neonato está totalmente dependente da ingestão do colostro (Baumrucker et al., 2010) em consequência do tipo de placenta epiteliocorial característica dos ruminantes (Furukawa et al., 2014). Os animais que não ingerem colostro têm uma probabilidade 74 vezes maior de morrer nas primeiras três semanas de vida (Jenny et al., 1981; Wells et al., 1996).

O colostro é o primeiro leite produzido pela vaca depois do período seco e o primeiro alimento do neonato (Jones & Heinrichs, 2021), rico em Ig, das quais 85% pertencem à classe IgG (Barrington & Parish, 2001; Butler, 1974). Possui também leucócitos maternos, citoquinas e fatores de crescimento, lactoferrina, lisozima e lactoperoxidase, nucleótidos e nutrientes (lípidos, carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais) (Godden et al., 2019; McGrath et al., 2016). O colostro tem funções muito relevantes, estimulando mecanismos de defesa, com atividade bactericida local, atividade fagocítica com ação no sistema digestivo, sendo responsável pela sua integridade, atividade linfocitária e imunidade mediada por células (Cortese, 2009; Rathe et al., 2014).

Apesar da complexidade da composição do colostro, a sua qualidade tem sido avaliada por vários métodos que visam quantificar de forma direta ou indireta a concentração de Igs e em particular de IgG (McGuirk & Collins, 2004). Os métodos diretos incluem a imunodifusão radial e o imuno ensaio turbidimétrico. A imunodifusão radial é considerada a técnica de referência, com *cut-off* estabelecido em 50g de IgG/L, contudo, este método não é exequível em contexto de exploração, sendo dispendioso e moroso (Bartens et al., 2016); o imuno ensaio turbidimétrico, é um método mais rápido e barato, embora haja pouca informação do seu uso em amostras de colostro (J. D. Quigley et al., 2013). Existem ainda métodos indiretos, destacando-se o hidrómetro (colostrómetro) e o refratómetro de Brix (ótico ou digital). O primeiro mede a densidade do colostro, é um método rápido e pouco dispendioso, mas que encontra a sua principal limitação no facto de só funcionar num pequeno intervalo de temperatura (Bartens et al., 2016). O refratómetro de Brix é um instrumento capaz de estimar a concentração de

IgG no colostro, através da medição da percentagem de sólidos totais (J. D. Quigley et al., 2013). O colostro é considerado de boa qualidade se apresenta %Brix igual ou superior a 22 (Bielmann et al., 2010). Este é um método prático, de fácil compreensão pelos produtores e com sensibilidade e especificidade aceitáveis quando comparadas com a imunodifusão radial (Bielmann et al., 2010; Quigley et al., 2013).

A qualidade do colostro é influenciada por diversos fatores, dos quais se destacam a raça do animal, o número de lactações, a vacinação materna pré parto, a duração do período seco e a dieta do animal. O colostro das vacas Holstein apresenta concentração mais baixa de IgG em relação às restantes raças leiteiras (Pritchett et al., 1991). Animais com três ou mais lactações apresentam geralmente colostro de melhor qualidade (Zentrich et al., 2019). Adicionalmente, a vacinação das vacas antes do parto aumenta a concentração de anticorpos específicos no colostro (Cortese, 2009; Godden et al., 2019). A duração do período seco deve ser de pelo menos três a quatro semanas para que haja adequada concentração de anticorpos no colostro (Jones & Heinrichs, 2021). A nutrição materna pré parto, deve ser balanceada e responder às necessidades nutricionais de uma vaca leiteira (Jones & Heinrichs, 2021).

Os procedimentos de recolha de colostro e encolostramento dos neonatos devem ser realizados de forma a possibilitar a correta absorção passiva dos elementos bioativos do colostro pela mucosa intestinal do vitelo. Ao nascimento o epitélio intestinal permite a absorção não seletiva das proteínas do colostro, incluindo as Ig, através de pinocitose, as quais passam à circulação sanguínea (Broughton & Lecce, 1970; Cortese, 2009). À medida que o trato digestivo é estimulado pela ingestão de qualquer material, o epitélio sofre alterações, deixando de permitir os processos que medeiam a absorção das proteínas do colostro (Cortese, 2009). Seis horas após o nascimento, apenas se verifica 50% de absorção, deixando de se observar 24 horas após o nascimento (Rischen, 1981).

Atualmente considera-se que a imunidade passiva foi corretamente transmitida quando após a ingestão do colostro é possível alcançar no vitelo concentrações séricas de 10g de IgG/L (Denholm et al., 2021). A falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) é, por definição, uma baixa concentração de IgG no soro do vitelo entre as 24 e 48 horas de vida.

Para atingir 10g de IgG/L no soro, o neonato deve ingerir cerca de 100g de IgG na primeira ingestão de colostro (Davis & Drackley, 1998), ou seja, dois a quatro litros dependendo da concentração do mesmo, o mais cedo possível após o nascimento (Godden et al., 2019; Tizard, 2018).

Como forma de avaliar a transferência de imunidade passiva, podem ser utilizados métodos diretos, já anteriormente referidos, como a imunodifusão radial, técnica de referência; ou imuno ensaio turbidimétrico, com *cut-off* de FTIP estabelecido em 10g IgG/L, estes não são práticos na exploração, são dispendiosos e morosos (Buczinski et al., 2018); os indiretos recorrem à refratometria de Brix, com *cut-off* de 8.4%Brix e refratometria de soro (Buczinski et al., 2018), em que a FTIP é definida quando os valores de proteínas plasmática totais (PPT) são inferiores a 5,2 – 5,5 g/dL (Bielmann et al., 2010; Naylor & Kronfeld, 1977); são métodos rápidos, convenientes e facilmente compreendidos pelos produtores (Tizard, 2018; Buczinski et al., 2018). A utilização das PPT como forma de avaliar a

imunidade passiva pode ser justificada uma vez que nos primeiros dias após encolostramento a IgG representa a maior proporção destas (Calloway et al., 2002).

O presente estudo teve como objetivo a investigação e caracterização das potenciais diferenças na imunidade neonatal, pré e pós-colostral, dos vitelos nascidos em três explorações, compreendido entre 29 de novembro e 18 de fevereiro. Foram consideradas as diferenças na realização ou não de vacinação materna frente a diarreias neonatais, e realização ou não de controle e seleção de qualidade de colostro utilizado em primeira toma, como forma de avaliar a influência destes fatores na ocorrência de FTIP. Efetuaram-se medições de qualidade do colostro, quantificação de proteínas plasmáticas totais nos vitelos e recolheram-se informações relativas aos vitelos (processo de encolostramento, data de nascimento, mortalidade e tratamentos no período do estudo) e às respectivas mães (maneio da vaca seca, tipo de parto, paridade).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo obteve a aprovação da Comissão de Ética da Escola Universitária Vasco da Gama – EUVG.

2.1 Seleção das explorações e animais em estudo

O estudo foi realizado em três explorações da zona norte de Portugal. Estas foram seleccionadas com base na sua proximidade geográfica, semelhança estrutural e de manejo geral. Foram escolhidas para o estudo, as três que cumpriam com as diferenças específicas pretendidas, relativamente à vacinação das vacas frente a diarreia neonatal e à seleção ou não de colostro, em função de parâmetros de qualidade previamente definidos, designadas por exploração 1 (E1), exploração 2 (E2) e exploração 3 (E3).

Foram incluídos no estudo todos os vitelos de raça Holstein-Frísia, nascidos no período compreendido entre 29 de novembro de 2021 e 18 de fevereiro de 2022, 30 animais por exploração, de ambos os sexos e nascidos consecutivamente, perfazendo um total de 90 vitelos.

Para cada vitelo foi registada a paridade da mãe, o tipo de parto eutócico (ocorrido de forma espontânea e sem dificuldade) ou distócico (com assistência médico veterinária), a data de parto e a identificação materna. Para além disso, na E1 foi ainda registado o valor da densidade de colostro ingerido na primeira toma. Os vitelos em estudo foram identificados com o número de ordem de nascimento, para cada exploração.

Duas das três explorações em questão, a E1 e a E2 realizam a vacinação das vacas frente às diarreias neonatais, com a mesma vacina comercial, há pelo menos três anos. A vacina é administrada a todas novilhas e vacas gestantes entre as seis e sete semanas pré parto, 2ml por via IM (Rotavec Corona®, MSD). A seleção dos animais a vacinar e respetiva vacinação é realizada semanalmente pelo médico veterinário responsável. A E3, não realizou nos últimos 3 anos, qualquer profilaxia vacinal de diarreias neonatais mediante vacinação materna.

A avaliação da qualidade do colostro destinado à primeira toma dos vitelos, foi realizada apenas na E1. Na primeira toma em todos os vitelos desta exploração, apenas foram administrados os colostros com níveis superiores a 22% na escala de Brix. Os colostros da E1 foram avaliados com refratómetro de Brix, imediatamente após a sua recolha. Todos os vitelos ingeriram o colostro de primeira ordenha, da respetiva progenitora, nas 3 explorações.

As três explorações possuíam manejo reprodutivo com partos dispersos ao longo do ano. Os animais apresentavam-se em estabulação livre, divididos em lote único de vacas em lactação, lote de vacas secas e grupos de recria. A caracterização das 3 explorações está sumariada na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização das explorações incluídas no estudo.

		Exploração 1	Exploração 2	Exploração 3
Vacina materna (Rotavec Corona®, MSD)		✓ ¹	✓	✗ ²
Avaliação da qualidade de colostro (% Brix)		✓	✗	✗
Número total de vitelos no estudo		30	30	30
Número total de vacas adultas do efetivo		380	880	125
% de vacas de raça HF ³		99	98	99
Novilhas	Alimentação	silagem de erva, palha, milho e ração de novilhas		
	Idade ao primeiro parto (meses)	24		
Vacas secas	Momento de secagem	sete meses de gestação		
	Alojamento em cama individual de:	colchão de borracha	serrim	casca de pinheiro
	Alimentação (<i>Total Mixed Ration</i>)	(15 dias antes do parto, ou três semanas se novilha, alteração para ração de vaca lactante) 1,5kg ração (corretor mineral e vitamínico incluído na ração) 5kg palha 10kg silagem milho (utilização de bólus de monensina em animais com condição corporal ≤ a 2,75 ou ≥ a 4)	(15 dias antes do parto, ou três semanas se novilha, alteração para ração de vaca lactante) 2,5kg ração (corretor mineral e vitamínico incluído na ração) 3kg palha 5kg silagem milho 13kg silagem erva (utilização de bólus de monensina em animais com condição corporal ≤ a 2,75 ou ≥ a 4)	(15 dias antes do parto, ou três semanas se novilha, alteração para ração de vaca lactante) 1,5kg ração (corretor mineral e vitamínico incluído na ração) 6kg palha 9kg silagem erva (utilização de bólus de monensina em animais com condição corporal ≤ a 2,75 ou ≥ a 4)

	Total matéria seca/vaca/dia	9,5kg	12,6kg	9,1kg
	Vigilância de partos	24 horas / 7 dias por semana		
	Recolha do colostro	Até 2 horas após o parto		
Vitelos	Alojamento	viteiro individual no solo nos primeiros cinco dias; viteiro coletivo a partir do sexto dia, ambos com cama de palha		viteiro individual elevado em pavimento contínuo de cimento durante três semanas; posteriormente viteiro coletivo; ambos com cama de serrim de pinheiro
	Primeira toma de colostro	4 litros até 6 horas após o parto, administrado com sonda orogástrica		
	Alimentação até aos 5 dias	leite materno aquecido 40-42°C em carrinho de distribuição de leite, dois litros por toma, perfazendo quatro litros diários em balde com tetina	leite materno, dois litros por toma, perfazendo quatro litros diários em balde com tetina	
	Alimentação após 5 dias e até aos 2 meses	leite de vaca a 40-42°C, 2-4 litros por toma (aumento progressivo com a idade), perfazendo 4-8 litros diários em balde com tetina	alimentador automático com leite em pó (150g) até ao 7d e posteriormente leite de vaca (fêmeas: 4 litros até aos 20 dias, aumento gradual 20-40 dias até aos 6,4 litros, onde permanece até aos 60 dias; machos: 4 litros até	leite em pó a 40-42°C, 2-4 litros por toma (aumento progressivo com a idade), perfazendo 4-8 litros diários em balde com tetina

			aos 20 dias, aumento gradual dos 20-35 dias até aos 8,8 litros, onde permanece até aos 60 dias)	
	Utilização de leite de descarte na alimentação dos vitelos	$\times^2$		
	Livre acesso a água do primeiro ao último dia de amamentação	$\checkmark^3$		
	Recria dos vitelos na exploração	sim, machos e fêmeas	apenas fêmeas, os machos são vendidos ao desmame	apenas fêmeas, os machos são vendidos às três semanas de vida

¹ $\checkmark$ - verificou-se; ² $\times$ – não se verificou; ³HF – Holstein-Frisia

2.2 Análise do colostro

A medição do colostro foi realizada pelo Produtor com recurso a refratômetro de Brix manual (ColoQuick RHB-32), de acordo com as indicações do fabricante. O refratômetro foi devidamente limpo e higienizado com água destilada entre cada medição. Os resultados foram registados para cada vitelo e a informação recolhida aquando da visita. Este procedimento foi apenas executado na E1.

2.3 Recolha das amostras de sangue e medição das proteínas plasmáticas totais

Nas três explorações, por animal, foram colhidas duas amostras de sangue na veia jugular, para medição das proteínas plasmáticas totais (PPT), num total de 180 amostras de sangue. A primeira colheita (T1) foi realizada após o nascimento e antes da primeira toma de colostro; a segunda colheita (T2) foi realizada ao 3º dia de vida (Figura 1).

A colheita foi realizada com uma agulha descartável de 18G e tubo de vácuo sem anticoagulante, permitida a sedimentação por 24 horas à temperatura ambiente.

Após a sedimentação, como o auxílio de uma pipeta, colocou-se uma gota do sobrenadante sobre a campânula do refratômetro ótico manual (Optika HR-160), e com o aparelho direcionado para uma fonte luminosa foi efetuada a medição das PPT, numa escala de 0 a 12g de proteína total / 100mL, conforme descrito por Morril et al. (2012).

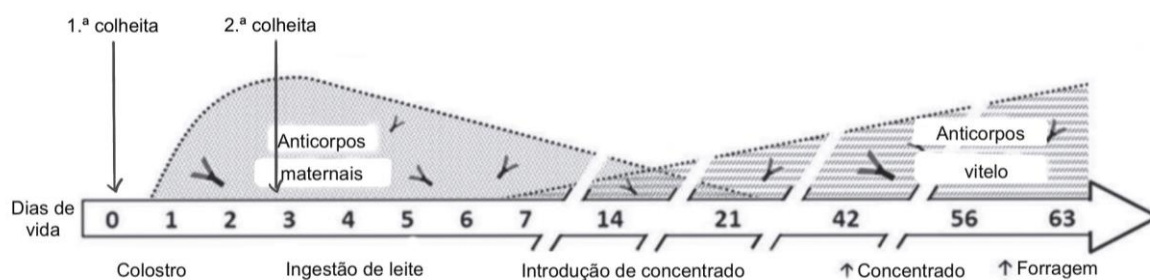


Figura 1 - Evolução cronológica da imunidade no vitelo (adaptado de Hulbert & Moisés, 2016) e os dois momentos de colheita de sangue (T1 e T2).

2.4 Determinação da falha de transferência de imunidade passiva

No presente estudo, considerou-se a ocorrência de falha de transferência de imunidade passiva (FTIP), sempre que um vitelo apresentou um valor de PPT inferior a 5,5 g/dL (Bielmann et al., 2010).

2.5 Avaliação da taxa de mortalidade

A mortalidade na amostra de vitelos em estudo foi analisada nos dois primeiros meses de idade, tendo sido registada, desde o nascimento até ao momento do desmame. Os dados de mortalidade foram recolhidos a partir dos registos internos da exploração e, quando necessário, por consulta no Sistema Nacional de Identificação e Registo de Bovinos (SNIRB), em particular para os vitelos do sexo masculino, nas E2 e E3, que saíram das explorações ao desmame ou às 3 semanas de vida, respetivamente.

2.6 Análise estatística

A estatística descritiva foi apresentada como média $\pm$ desvio padrão e coeficiente de variação para as variáveis contínuas e em contagem de frequências absolutas e percentagens para as variáveis categóricas. A correlação de Pearson foi usada para analisar associações entre as variáveis. As diferenças entre grupos foram testadas através do *t-test* e da análise de variância (ANOVA). Para as variáveis categóricas foram usados os testes de Fisher e do Qui-quadrado. Foi utilizado o modelo de regressão logística para a análise preditiva. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi realizada com recurso ao software R®.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização da amostra

Foram registados 90 animais na amostra. O número de animais observados em cada exploração e a sua distribuição em função do sexo nas três explorações resume-se na Tabela 2. A proporção de nascimentos do sexo masculino foi mais elevada na E1 e mais baixa na E3 respetivamente, quando comparada com os nascimentos de fêmeas, embora não sendo estas diferenças significativas ($p=0,44$). Todos os animais nascidos na E1 e na E2 são filhos de mães vacinadas com a vacina comercial Rotavec Corona® (MSD); todos os vitelos nascidos na E3 são filhos de mães não vacinadas com a referida vacina ou outra semelhante. Apesar do valor médio de paridade ser inferior na E3, não se observaram diferenças significativas ($p=0,125$). De salientar que apenas na E3 se verificaram 2 partos distócicos (Tabela 2).

Tabela 2 - Informação recolhida nas explorações.

	Exploração 1	Exploração 2	Exploração 3
Vacina materna (Rotavec Corona®, MSD)	✓ ¹	✓	✗ ²
Número total de animais em estudo	30	30	30
Número de fêmeas/machos	11/19	15/15	20/10
Paridade média das vacas mães	2,1 ± 0,94	2,6 ± 1,61	1,8 ± 0,72
Partos distócicos observados	0	0	2

¹✓ - Verificou-se; ²✗ - Não se verificou

3.2 Medição da qualidade do colostro

Tal como referido na secção de Material e Métodos, a avaliação do colostro só foi realizada na E1, o valor médio ($\pm$ desvio padrão) de %Brix dos colostros foi de 29,13 ($\pm 3,63$). Os valores máximo e mínimo registados foram de 34% e 22% respetivamente (Tabela 3). A paridade média das vacas não afetou significativamente o valor da %Brix dos seus colostros (teste ANOVA; $p=0,23$).

Tabela 3 - Informação recolhida sobre qualidade o colostro.

	Exploração 1
Número de animais considerados para os resultados	30
Média da %Brix dos colostros	29,13 ± 3,63
Valores de %Brix mínimo e máximo observados	22 - 34
Coeficiente de variação (%)	12,45

3.3 Medição das proteínas plasmáticas totais

Os dados relativos às PPT no T1 e T2 em todas as explorações encontram-se sumariados na Tabela 4.

No T1, os valores de PPT apresentam uma distribuição normal que variou entre 3,2 g/dL e 5,4 g/dL, à exceção de dois vitelos (um da E1 e outro da E3), que apresentaram resultados de 6,4 g/dL e 6 g/dL respetivamente, e foram desconsiderados na análise posterior das PPT.

Tabela 4 - Proteínas plasmáticas totais (g/dL) observadas nos vitelos nos dois tempos de colheita.

		Exploração 1	Exploração 2	Exploração 3
Número de vitelos		29	30	29
Média PPT ¹	T1 ²	4,5 ± 0,37	4,2 ± 0,42	4,4 ± 0,36
	T2 ³	6,2 ± 0,68	5,75 ± 0,54	5,3 ± 0,47
Valores de PPT mínimo e máximo observados	T1	3,8 - 5,4	3,2 - 5,2	4,0 - 5,2
	T2	5,0 – 8,2	4,8 – 6,9	4,2 – 6,0
Coeficiente de variação (%)	T1	8,43	9,84	8,01
	T2	10,99	9,34	8,90

¹PPT – Proteínas plasmáticas totais dos vitelos, em g/dL de soro; ²T1 – primeira colheita (após o nascimento e antes da primeira toma de colostro); ³T2 – segunda colheita (3º dia de vida)

3.4 Análise comparativa da variação das proteínas plasmáticas totais

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) comparando os valores médios das PPT (g/dL) entre todas as explorações, em ambos os momentos. Verificou-se que, no presente estudo, existiram diferenças significativas entre os valores médios das PPT tanto em T1 ($p < 0,05$) como em T2 ($p < 0,001$) (Figura 2).

Analizou-se também o intervalo entre a média das PPT (g/dL) no T1 e a média no T2, em cada exploração. Os valores obtidos de todas as explorações foram comparadas e encontraram-se diferenças significativas entre estes (ANOVA, $p < 0,001$).

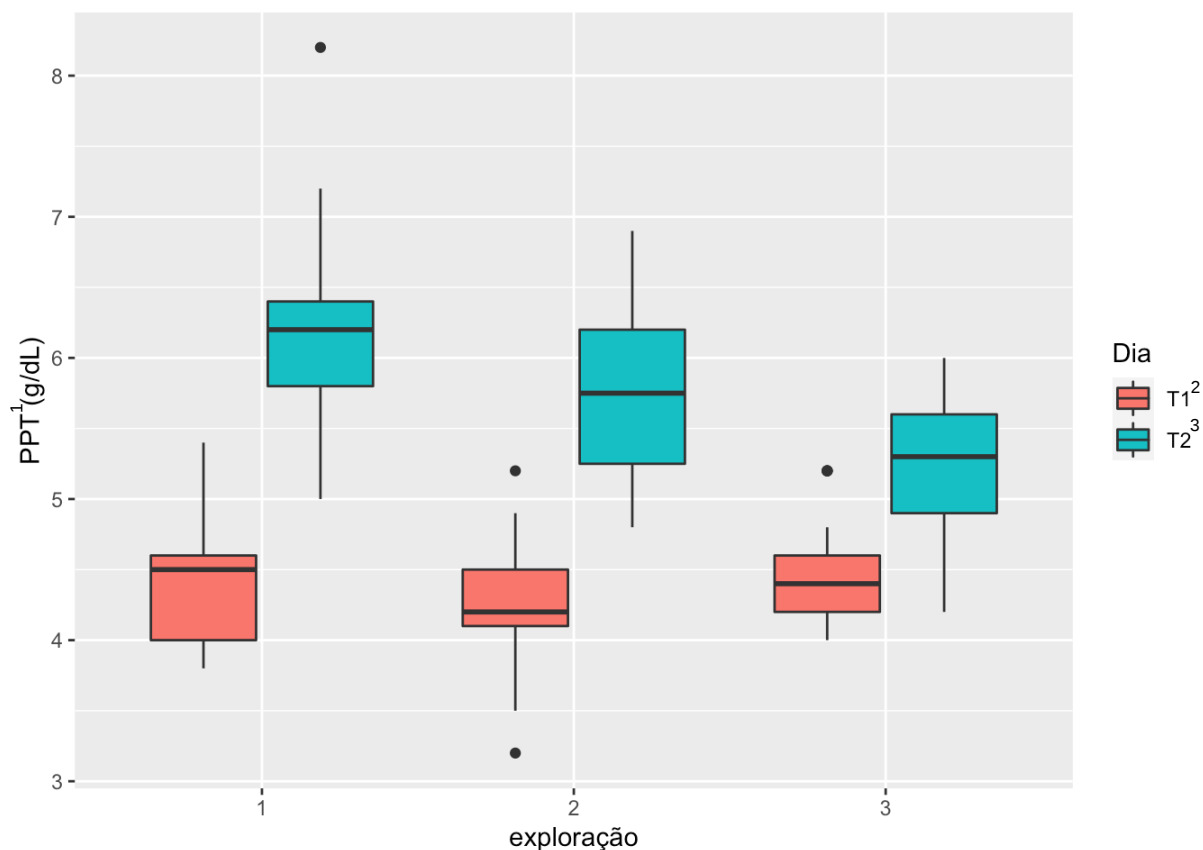


Figura 2 - Variação das proteínas plasmáticas totais em g/dL no soro dos vitelos, no tempo 1 e tempo 2, nas três explorações.

¹PPT – Proteínas plasmáticas totais; ²T1 – primeira colheita (após o nascimento e antes da primeira toma de colostro); ³T2 – segunda colheita (3º dia de vida)

Verificou-se através da análise *pós hoc* que no T1, a E2 e a E3 são as que apresentam uma maior diferença no valor médio das PPT; já no T2, a maior discrepância foi encontrada entre as PPT da E3 e a E1 (Figura 3 e 4).

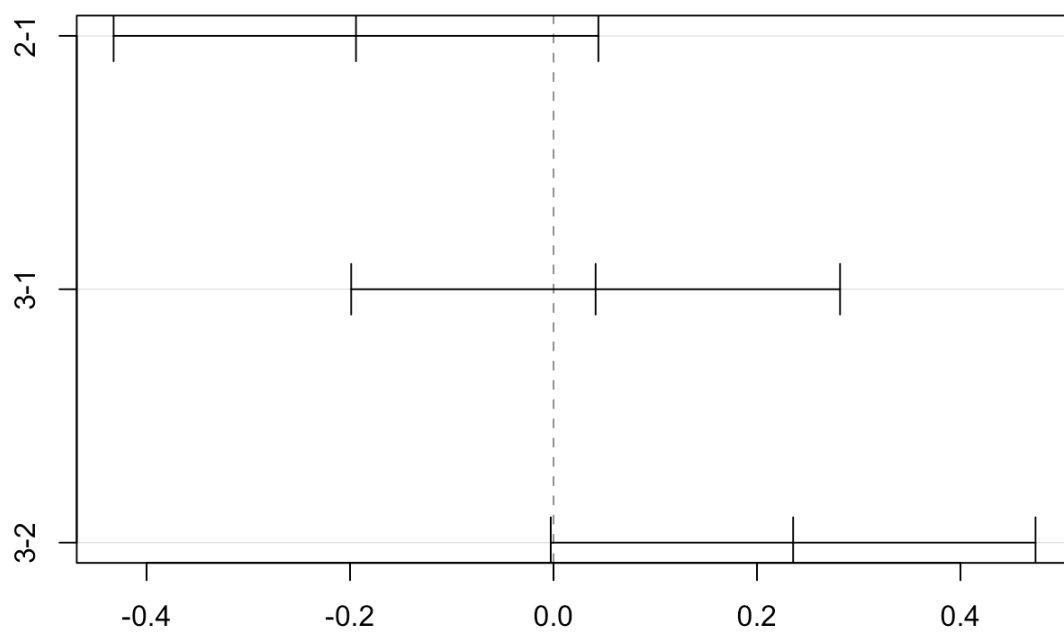


Figura 3 - Análise *pós hoc* dos valores de proteínas plasmáticas totais no tempo 1.

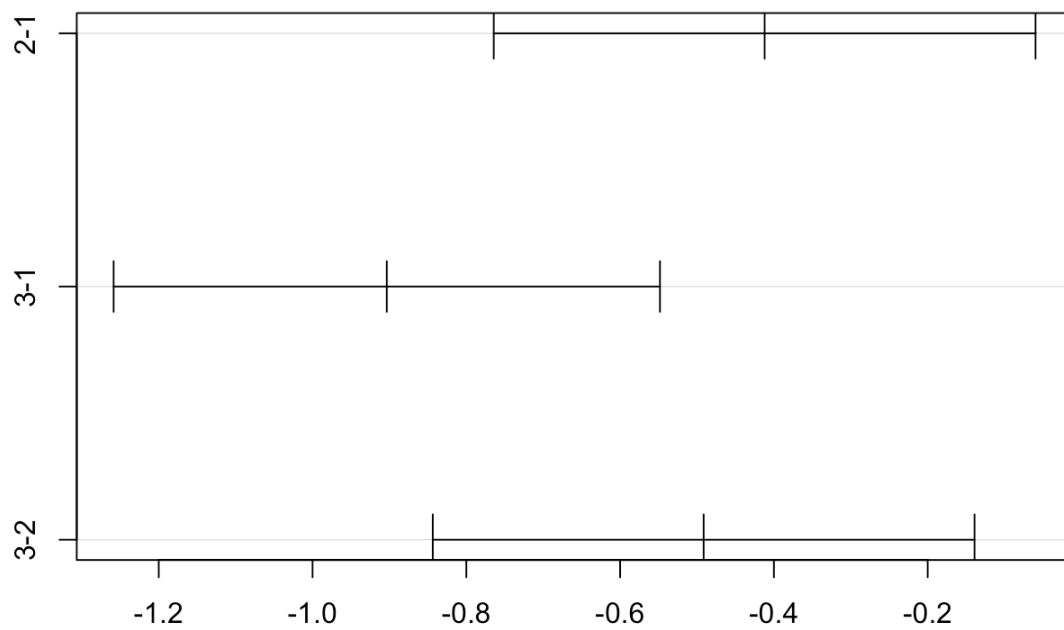


Figura 4 - Análise *pós hoc* dos valores de proteínas plasmáticas totais no tempo 2.

3.4.1 Avaliação da influência da qualidade do colostro nas proteínas plasmáticas totais

Na Figura 5 é apresentada a distribuição das PPT (g/dL) no soro de cada vitelo da E1, no T2 (pontos azuis no gráfico), em função dos respectivos valores de %Brix. A linha vermelha representa o *cut-off* definido para a adequada transferência de imunidade passiva (5,5 g/dL PPT determina FTIP). Existem valores de PPT sobrepostos (dois animais com 6 g PPT (g/dL) e 32%Brix, dois animais com 6,2 g PPT (g/dL) e 28%Brix, dois animais com 6,2 g PPT (g/dL) e 30%Brix e dois animais com 6,6 g PPT (g/dL) e 34%Brix).

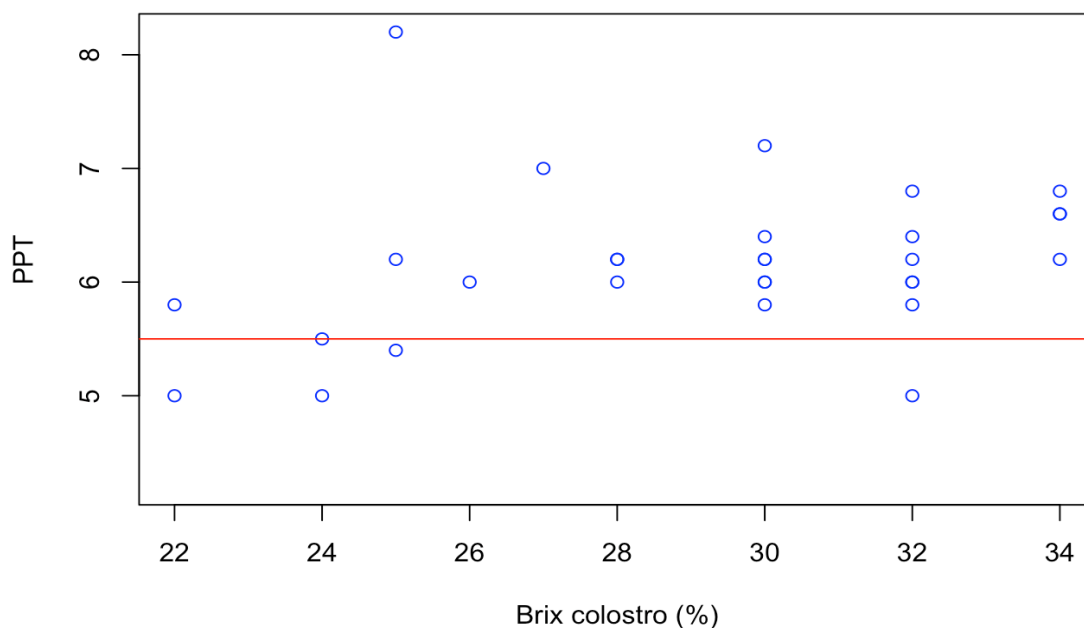


Figura 5 - Distribuição dos valores de proteínas plasmáticas totais (PPT) dos vitelos da exploração 1 no tempo 2 em função da qualidade do colostro, avaliada pelo Produtor.

Foi realizada a análise de correlação entre a %Brix do colostro e os valores de PPT dos vitelos da E1, observados em T2 não se tendo verificado uma correlação significativa ($r=0,27$; $p=0,14$).

3.4.2 Variação das proteínas plasmáticas totais em função do sexo dos vitelos, no tempo 2

Procedeu-se à comparação das PPT (g/dL) no soro dos vitelos no T2 em função do género dos mesmos (Figura 6).

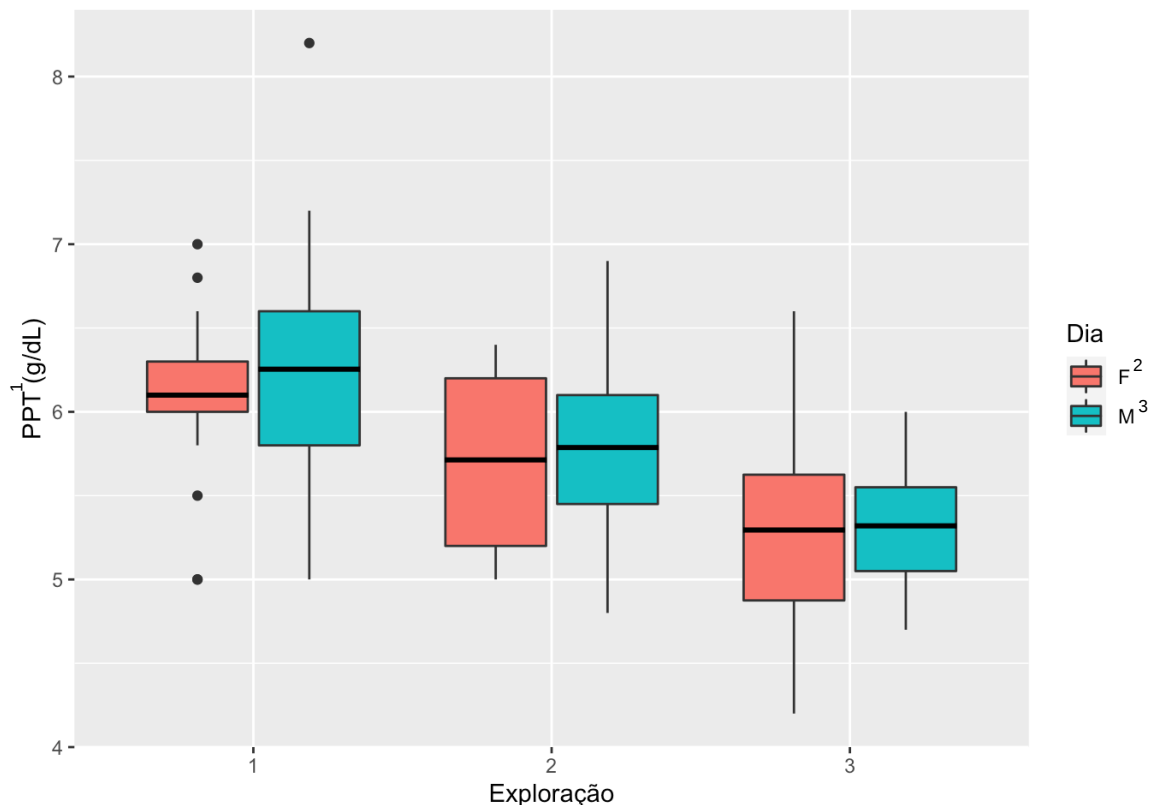


Figura 6 - Valor das proteínas plasmáticas totais em g/dL médio no soro dos vitelos no tempo 2 em função do género dos mesmos.

¹PPT – Proteínas plasmáticas totais; ²F – Fêmeas; ³M – Machos

Da leitura da Figura 6 podemos observar que a média das PPT (g/dL) dos machos foi superior à das fêmeas em todas as explorações, mas a diferença não foi significativa (*t-test*, $p=0,39$).

3.4.3 Avaliação da influência da paridade das vacas mães nas proteínas plasmáticas totais dos vitelos no tempo 2

Comparando as PPT (g/dL) no soro dos vitelos no T2 em função da paridade das vacas mães, concluiu-se que não houve relação significativa, quer intra-exploração (teste ANOVA; E1 $p=0,64$, E2 $p=0,59$, E3 $p=0,22$), como inter-exploração (teste ANOVA; $p=0,55$), confirmando-se que o valor das PPT não esteve dependente do número de partos.

3.5 Análise da falha de transferência de imunidade passiva

Dos animais em estudo, 32 foram diagnosticados com FTIP e assim considerados na análise. Os restantes vitelos não apresentaram FTIP (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequência da ocorrência de falha de transferência de imunidade passiva nas explorações em análise.

	Exploração 1	Exploração 2	Exploração 3
Animais com FTIP ¹ (n)	3	10	19
Animais sem FTIP (n)	26	20	10
Taxa de FTIP (%)	10,0	33,3	65,5

¹FTIP – Falha de transferência de imunidade passiva

Analisando a Tabela 5, verifica-se que o número de animais com FTIP apresentou o valor mais elevado na E3, seguido pela E2; na E1 observou-se a menor incidência de FTIP. A incidência de FTIP foi significativamente diferente nas 3 explorações (teste de Qui-quadrado, $p < 0,001$).

A ocorrência de FTIP na E1 foi investigada através de regressão logística (Tabela 6) considerando as PPT em T1, as PPT em T2 e a %Brix do colostro como covariáveis. A incidência de FTIP não foi significativamente afetada pela %Brix do colostro ($p = 0,18$) ou pelas PPT no T1 ($p = 0,9$), mas apenas, pelas PPT em T2 ($p = 0,001$). Num segundo modelo, foi investigada a ocorrência de FTIP nas 3 explorações (Tabela 7), considerou-se a *Exploração*, as PPT em T1 e as PPT em T2 como covariáveis. De acordo com os resultados, a ocorrência de FTIP não foi significativamente afetada pelo fator *Exploração* ($p > 0,05$), nem pelas PPT no T1 ($p = 0,64$), apenas as PPT no T2 afetaram significativamente ($p < 0,001$) a sua correlação.

Tabela 6 - Regressão logística da ocorrência de FTIP na E1, com PPT em T1, PPT em T2 e %Brix do colostro como covariáveis.

	Estimativa	Erro padrão	Valor de t	Valor de p
%Brix do colostro	0,02026	0,01471	1,378	0,18007
PPT no T1	-0,01349	0,10633	-0,127	0,90003
PPT no T2	0,30188	0,08511	3,547	0,00151

Tabela 7 - Regressão logística da ocorrência de FTIP nas três explorações, com *Exploração*, PPT em T1 e PPT em T2 como covariáveis.

	Estimativa	Erro padrão	Valor de t	Valor de p
Exploração 2	0,01885	0,08307	0,227	0,821
Exploração 3	-0,05339	0,09576	-0,558	0,579
PPT no T1	-0,03622	0,07780	-0,466	0,643
PPT no T2	0,56131	0,06212	9,036	4.58e-14

3.6 Análise da morbidade e mortalidade

Durante o período em análise, foram diagnosticados na E3 quatro animais com doença respiratória, e a morte de um deles (Tabela 8). Nas três explorações não se observam diferenças significativas na mortalidade (teste Fisher, $p=1$).

Tabela 8 - Mortalidade observada nas explorações em análise.

	Exploração 1	Exploração 2	Exploração 3
Animais mortos	0	0	1
Taxa de mortalidade (%)	0	0	3,3

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.1 Discussão

A presença de elevados títulos de IgG no soro do vitelo é um excelente preditor de baixa morbidade e mortalidade (Lombard et al., 2020). É necessário assegurar que o neonato ingere colostro com quantidade adequada de IgG, sendo essencial para que este adquira imunidade adequada, crucial para a saúde do animal e produtividade futura (Conneely et al., 2013). Os vitelos com títulos baixos de IgG no soro, 24h a 48h após o nascimento, apresentam uma elevada taxa de mortalidade nos primeiros 180 dias e sofrem um aumento de perdas em cada período de crescimento. Os vitelos com elevada quantidade de IgG no soro nas 24h a 48h após o nascimento têm uma maior capacidade de ultrapassar efeitos adversos do ambiente (Robison et al., 1988).

O fator *Exploração* encerra em si um leque diversificado de diferentes características que conferem a cada exploração a sua identidade e potencial de efeito específico nos animais que nele habitam. A seleção das explorações foi realizada a partir de um conjunto de explorações da região, com acompanhamento veterinário nos últimos 5 anos. Com base no conhecimento prévio foram selecionadas as três explorações com base no maior grau de semelhanças. Não é possível encontrar 3 explorações comerciais totalmente idênticas. Mas, garantindo que as diferenças são as mínimas possíveis, pretendeu-se que a variância explicada pelo fator *Exploração*, pudesse ser principalmente devida às diferenças impostas pelo desenho do estudo: a utilização de vacina materna e a seleção de colostros para primeira toma. No entanto, apesar da proporção de FTIP observada ser significativamente diferente ($p < 0,001$) nas 3 explorações (10% em E1, 33,3% em E2 e 63,3% em E3), não foi possível evidenciar estatisticamente que essa diferença poderia resultar da variação do fator *Exploração* ($p > 0,05$). Tal poderá dever-se ao baixo número de observações em cada uma das explorações e ao facto de apenas na E1 se ter realizado a seleção de colostros. Idealmente seria conveniente proceder a uma análise semelhante considerando os colostros de animais vacinados e não vacinados, e as PPT de vitelos provenientes da mesma exploração, com e sem avaliação prévia da qualidade do colostro, filhos ou não de mães vacinadas. Contudo, o desenho experimental deste estudo foi um fator limitante.

Foram removidos do estudo das PPT dois animais, no T1, com valores de PPT (g/dL), anormalmente elevados, como forma de não enviesar os resultados; estes valores poderão ser devidos à ingestão pelo vitelo de algum colostro, diretamente da mãe, previamente à recolha de sangue no T1.

A vacinação das vacas antes do parto para agentes patogénicos *Pasteurella haemolytica*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, rotavírus e coronavírus aumenta a concentração de anticorpos específicos no colostro (Cortese, 2009; Godden et al., 2019). A vacina Rotavec® corona (MSD) demonstrou ser benéfica na redução da incidência de diarreia neonatal, quando administrada a vacas e novilhas em gestação (Gelfert et al., 2017). Esta vacina materna contém rotavírus e coronavírus bovino inativado e antígenos de *E.coli* F5 purificados; uma dose da mesma induz imunidade lactogénica nas vacas (Crouch et al., 2000). Como documentado por Crouch et al. (2001), depois da vacinação, o colostro das vacas apresenta títulos significativamente mais elevados de anticorpos específicos contra *E. coli* F5, coronavírus e rotavírus (Crouch et al., 2001).

Os resultados do presente estudo são concordantes com estudos anteriores, nas explorações vacinadas, E1 e E2, os vitelos submetidos ao colostro materno respetivo, apresentaram em T2, uma média de PPT (g/dL) no soro mais elevada que os vitelos da E3, não vacinada ($p < 0,001$); o que indicia um título de anticorpos séricos mais elevado; paralelamente, o aumento da média das PPT (g/dL) de T1 para T2 é maior na E1 e na E2 relativamente à E3 (ANOVA, $p < 0,001$), o que parece ser concordante com a indução vacinal de uma maior imunidade materna, nas vacas de E1 e E2.

No que diz respeito ao género do vitelo, a opinião entre autores não é unânime, segundo Quigley (2002) poderíamos supor que as fêmeas teriam valores de PPT superiores aos machos, não sendo claro se este fator é influenciado pelo volume sanguíneo do que à eficiência de absorção de Ig; ou se o tamanho superior dos machos pode influenciar o seu estado metabólico, afetando assim a absorção de Ig. No entanto, segundo Trotz-Williams (2008) não existe uma variação significativa das PPT dependente do sexo do neonato. No contexto deste estudo, seria espectável que as fêmeas pudessem apresentar valores mais elevados de PPT, uma vez que, devido ao seu maior potencial económico, os produtores demonstram um maior cuidado no manejo. Contudo, podemos inferir em concordância com Trotz-Williams (2008) que o género do animal não foi determinante no valor das PPT ($p > 0,05$).

Animais com três ou mais lactações apresentam colostro de melhor qualidade, tendo como possível justificação o facto de indivíduos mais velhos terem sido expostos a maior número de agentes patogénicos e consequentemente terem produzido mais IgG, ou ainda, o transporte de IgG para a glândula mamária poder estar associado ao maior desenvolvimento da mesma (Devery-Pocius & Larson, 1983; Zentrich et al., 2019). Porém, na E1 (onde foi analisada a qualidade do colostro), não houve relação significativa ($p = 0,14$) entre o número de lactações da vaca e a qualidade do seu colostro.

Seria provável que vitelos filhos de vacas com maior número de lactações tivessem valores de PPT mais elevados, o que não aconteceu ($p > 0,05$). A ausência de significância estatística pode dever-se ao facto de nas explorações em estudo, existir um maior número de animais de primeira e segunda lactações, em detrimento de animais com três ou mais.

Em relação à FTIP (PPT $< 5,5$ g/dL) verificou-se maior incidência da mesma na E3, com 63,3% de FTIP, e a menor incidência na E1, com apenas 10% de FTIP ($p < 0,001$). Na E1, a FTIP não foi afetada pela %Brix do colostro, o que poderia contradizer a ampla produção científica disponível que documenta a relação entre a qualidade do colostro e o risco de ocorrência de FTIP. No entanto, importa recordar que todos os valores de %Brix registados na E2 foram iguais ou superiores a 22%, ou seja, os colostros administrados a todos os vitelos, apresentaram boa qualidade e, adicionalmente, a metodologia de encolostramento foi comum a todos os vitelos. Este facto pode justificar o resultado observado.

Considera-se que existe risco de FTIP na exploração, quando mais de 20% dos animais testados apresentam FTIP (McGuirk & Collins, 2004). No presente estudo, tanto na E2 (33,3% de FTIP) como na E3 (63,3% de FTIP) existe uma incidência preocupante, sendo esta mais evidente na E3. Ainda assim, é de notar que, apesar de todos os colostros serem de qualidade adequada na E1 ($\geq 22\%$ Brix), a prevalência de FTIP é de 10%.

Animais com baixos níveis de FTIP, têm menos probabilidade de desenvolver doenças (Lombard et al., 2020). No presente estudo, observou-se a relação entre a elevada taxa de FTIP da E3 com a sua

maior incidência de doença e mortalidade, embora a relação mortalidade e *Exploração* não seja significativa ($p=1$).

4.2 Conclusões

Apesar de não ter sido possível provar a influência do fator *Exploração* ($p>0,005$) na FTIP, observou-se que o nível de proteínas plasmáticas totais nos vitelos foi influenciado pelo fator *Exploração*, tanto no momento T1 como no momento T2 ($p<0.05$ e <0.001 , respectivamente). O gênero dos vitelos e a paridade das vacas mães não se revelaram fatores significativos ($p=0,14$) na variação das PPT. A qualidade do colostro não foi influenciada nem pela paridade das vacas, nem teve influência significativa sobre os valores de PPT dos respectivos vitelos.

Neste estudo foi possível evidenciar que a incidência da FTIP foi muito superior na E3 (65,5%) frente à E1 (10%), corroborando a importância de um bom protocolo vacinal e controle da qualidade do colostro para uma boa transferência de imunidade passiva.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrington, G. M., & Parish, S. M. (2001). Bovine neonatal immunology. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 17(3). [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30001-3](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30001-3)
- Bartens, M. C., Drillich, M., Rychli, K., Iwersen, M., Arnholdt, T., Meyer, L., & Klein-Jöbstl, D. (2016). Assessment of different methods to estimate bovine colostrum quality on farm. *New Zealand Veterinary Journal*, 64(5). <https://doi.org/10.1080/00480169.2016.1184109>
- Baumrucker, C. R., Burkett, A. M., Magliaro-Macrina, A. L., & Dechow, C. D. (2010). Colostrogenesis: Mass transfer of immunoglobulin G1 into colostrum. *Journal of Dairy Science*, 93(7). <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2963>
- Bazeley, K. (2003). Investigation of diarrhoea in the neonatal calf. *In Practice*, 25(3). <https://doi.org/10.1136/inpract.25.3.152>
- Bielmann, V., Gillan, J., Perkins, N. R., Skidmore, A. L., Godden, S., & Leslie, K. E. (2010). An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 93(8). <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2943>
- Broughton, C. W., & Lecce, J. G. (1970). Electron-microscopic studies of the jejunal epithelium from neonatal pigs fed different diets. *The Journal of Nutrition*, 100(4). <https://doi.org/10.1093/jn/100.4.445>
- Buczinski, S., Gicquel, E., Fecteau, G., Takwoingi, Y., Chigerwe, M., & Vandeweerd, J. M. (2018). Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Accuracy of Serum Refractometry and Brix Refractometry for the Diagnosis of Inadequate Transfer of Passive Immunity in Calves. In *Journal of Veterinary Internal Medicine* (Vol. 32, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/jvim.14893>
- Butler, J. E. (1974). Immunoglobulins of the Mammary Secretions. In *Nutrition and Biochemistry of Milk/maintenance*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-436703-6.50011-9>
- Calloway, C. D., Tyler, J. W., Tessman, R. K., Hostetler, D., & Holle, J. (2002). Comparison of refractometers and test endpoints in the measurement of serum protein concentration to assess passive transfer status in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221(11). <https://doi.org/10.2460/javma.2002.221.1605>
- Conneely, M., Berry, D. P., Sayers, R., Murphy, J. P., Lorenz, I., Doherty, M. L., & Kennedy, E. (2013). Factors associated with the concentration of immunoglobulin G in the colostrum of dairy cows. *Animal*, 7(11). <https://doi.org/10.1017/S1751731113001444>
- Cortese, V. S. (2009). Neonatal Immunology. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 25, Issue 1, pp. 221–227). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.003>
- Crouch, C. F., Oliver, S., & Francis, M. J. (2001a). Serological, colostrum and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and *Escherichia coli* F5 (K99). *Veterinary Record*, 149(4). <https://doi.org/10.1136/vr.149.4.105>
- Crouch, C. F., Oliver, S., & Francis, M. J. (2001b). Serological, colostrum and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and *Escherichia coli* F5 (K99). *Veterinary Record*, 149(4). <https://doi.org/10.1136/vr.149.4.105>

- Crouch, C. F., Oliver, S., Hearle, D. C., Buckley, A., Chapman, A. J., & Francis, M. J. (2000). Lactogenic immunity following vaccination of cattle with bovine coronavirus. *Vaccine*, 19(2–3). [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00177-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00177-8)
- Davis, C. L., & Drackley, J. K. (1998). The development, nutrition, and management of the young calf. In *The development, nutrition, and management of the young calf*.
- Denholm, K., Haggerty, A., Mason, C., & Ellis, K. (2021). Comparison of tests for failure of passive transfer in neonatal calf serum using total protein refractometry and the biuret method. *Preventive Veterinary Medicine*, 189. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105290>
- Devery-Pocius, J. E., & Larson, B. L. (1983). Age and Previous Lactations as Factors in the Amount of Bovine Colostral Immunoglobulins. *Journal of Dairy Science*, 66(2). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81780-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81780-9)
- Furukawa, S., Kuroda, Y., & Sugiyama, A. (2014). A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *Journal of Toxicologic Pathology*, 27(1). <https://doi.org/10.1293/tox.2013-0060>
- Gelfert, C.-C., Lange, D., Thesing, E., Stemme, K., & Vertenten, G. (2017). *Changes in incidence of neonatal diarrhea after starting dam vaccination with Rotavec® Corona*.
- Godden, S. M., Lombard, J. E., & Woolums, A. R. (2019). Colostrum Management for Dairy Calves. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 35, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.07.005>
- Grunberg, W. (2021). Diarrhea in Neonatal Ruminants. *MSD Manual Veterinary*.
- Hyde, R. M., Green, M. J., Sherwin, V. E., Hudson, C., Gibbons, J., Forshaw, T., Vickers, M., & Down, P. M. (2020). Quantitative analysis of calf mortality in Great Britain. *Journal of Dairy Science*, 103(3). <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17383>
- Jones, C., & Heinrichs, J. (2021). Feeding the Newborn Dairy Calf. *Penn State College of Agricultural Sciences*, 311.
- Lombard, J., Urie, N., Garry, F., Godden, S., Quigley, J., Earleywine, T., McGuirk, S., Moore, D., Branam, M., Chamorro, M., Smith, G., Shivley, C., Catherman, D., Haines, D., Heinrichs, A. J., James, R., Maas, J., & Sterner, K. (2020). Consensus recommendations on calf- and herd-level passive immunity in dairy calves in the United States. *Journal of Dairy Science*, 103(8). <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17955>
- McGrath, B. A., Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., & Kelly, A. L. (2016). Composition and properties of bovine colostrum: a review. In *Dairy Science and Technology* (Vol. 96, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0258-x>
- McGuirk, S. M., & Collins, M. (2004). Managing the production, storage, and delivery of colostrum. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 20, Issue 3 SPEC. ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.005>
- Morrill, K. M., Conrad, E., Polo, J., Lago, A., Campbell, J., Quigley, J., & Tyler, H. (2012). Estimate of colostrum immunoglobulin G concentration using refractometry without or with caprylic acid fractionation. *Journal of Dairy Science*, 95(7). <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5104>

- Naylor, J. M., & Kronfeld, D. S. (1977). Refractometry as a measure of the immunoglobulin status of the newborn dairy calf: comparison with the zinc sulfate turbidity test and single radial immunodiffusion. *American Journal of Veterinary Research*, 38(9).
- Pritchett, L. C., Gay, C. C., Besser, T. E., & Hancock, D. D. (1991). Management and Production Factors Influencing Immunoglobulin G1 Concentration in Colostrum from Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 74(7). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78406-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78406-3)
- Quigley, J. (2002). Passive immunity in newborn calves. *Advances in Dairy Technology*, 14.
- Quigley, J. D., Lago, A., Chapman, C., Erickson, P., & Polo, J. (2013). Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, 96(2). <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5823>
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2014). A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats, 10th edition Radostits. *Usa*, 51(1).
- Rathe, M., Müller, K., Sangild, P. T., & Husby, S. (2014). Clinical applications of bovine colostrum therapy: A systematic review. *Nutrition Reviews*, 72(4). <https://doi.org/10.1111/nure.12089>
- Rischen CG. (1981). Passive immunity in the newborn calf. *Iowa State Univ Vet*.
- Robison, J. D., Stott, G. H., & DeNise, S. K. (1988). Effects of Passive Immunity on Growth and Survival in the Dairy Heifer. *Journal of Dairy Science*, 71(5). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79684-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79684-8)
- Tizard, I. (2018). Veterinary Immunology, 10th edition. In *Elsevier*.
- Trotz-Williams, L. A., Leslie, K. E., & Peregrine, A. S. (2008). Passive immunity in Ontario dairy calves and investigation of its association with calf management practices. *Journal of Dairy Science*, 91(10). <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0898>
- Uetake, K. (2013). Newborn calf welfare: A review focusing on mortality rates. In *Animal Science Journal* (Vol. 84, Issue 2). <https://doi.org/10.1111/asj.12019>
- USDA. (2008). Dairy 2007 Part II: Changes in the U.S. Dairy Cattle industry 1991-2007. *USDA-APHIS-VS, CEAH, Fort Collins*.
- Virtala, A. M. K., Mechor, G. D., Gröhn, Y. T., & Erb, H. N. (1996). The Effect of CalfhooD Diseases on Growth of Female Dairy Calves during the First 3 Months of Life in New York State. *Journal of Dairy Science*, 79(6). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76457-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76457-3)
- Wells, S. J., Dargatz, D. A., & Ott, S. L. (1996). Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 29(1). [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(96\)01061-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(96)01061-6)
- Yimer, M., Gezhagne, M., Biruk, T., & Dinaol, B. (2015). A review on major bacterial causes of calf diarrhea and its diagnostic method. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 7(5). <https://doi.org/10.5897/jvmah2014.0351>
- Zentrich, E., Iwersen, M., Wiedrich, M. C., Drillich, M., & Klein-Jöbstl, D. (2019). Short communication: Effect of barn climate and management-related factors on bovine colostrum quality. *Journal of Dairy Science*, 102(8). <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15645>