

Cláudia Isabel Canoa Pereira

Diarreias Neonatais em Vitelos

***Estudo de agentes prevalentes de diarreias neonatais e
medidas preventivas na região Sul do Tejo***

Orientador: Professor Doutor João Cannas da Silva

Universidade Lusófona de Humanidades e tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2014

Cláudia Isabel Canoa Pereira

Diarreias Neonatais em Vitelos
Estudo de agentes prevalentes de diarreias neonatais e
medidas preventivas na região sul do Tejo

Dissertação Tese defendida em provas públicas para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias com o Despacho 241/2015 , 25/05/2015 com a seguinte composição de Júri:

Presidente Professora Doutora Sofia Van Harten

Arguente: Professora Doutora Ludovina Padre

Orientador: Professor Doutor João Cannas da Silva

Universidade Lusófona de Humanidades e tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa 2014

À minha mãe...

Agradecimentos

Em primeiro lugar o meu agradecimento vai para o meu pai por todo o apoio, amor e carinho que me deu ao longo destes 6 anos de faculdade, sempre acreditando que um dia o meu sonho fosse concretizado

Ao meu irmão, pelos conselhos transmitidos e sobretudo por todo o carinho que sempre teve para comigo e que me ajudaram a enfrentar esta etapa da minha vida

Ao meu sobrinho por todas as horas de descontração, felicidade e sobretudo de amor que me proporcionou

Ao meu Avô Manel, Avó Catarina e Avô Augusto por todos os valores transmitidos e apoio incondicional, um muito obrigado por existirem na minha vida.

Ao João por toda a paciência e dedicação que teve, tanto ao longo do estágio como da tese, obrigado por seres como és.

À Esperança e Cláudia por todo o apoio e ajuda dada ao longo destes anos.

Aos meus amigos de curso que me acompanharam ao longo desta etapa, principalmente à Rita, Ana, Dário, Mariana, Francisco, Manuel Maria, Luis, Diogo, Inácio e Nuno por toda a amizade e companheirismo.

A toda a equipa da Vet + , serviços veterinários de Montemor-o-Novo, principalmente ao meu orientador de estágio Dr. Jaime Ribeiro, por toda a amizade, por toda a paciência e principalmente por tudo o que me ensinou, um muito obrigado por tudo.

À minha co-orientadora Dra. Maria do Carmo Feliciano por toda a ajuda, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

Ao meu orientador Dr. João Cannas da Silva por ter aceitado ser meu orientador.

Ao Dr. Mauro Bragança pela preciosa ajuda estatística e conselhos transmitidos

Ao Dr. João Ribeiro Lima pela ajuda estatística.

Por fim, e não menos importante, a todos os meus professores, que ao longo destes anos me tornaram no que sou hoje, Médica Veterinária.

Resumo

As diarreias neonatais são infecções intestinais que afectam vitelos recém-nascidos comprometendo deste modo o seu crescimento e desenvolvimento, podendo por vezes apresentar um carácter fatal. Existem várias etiologias possíveis para esta síndrome, nomeadamente bacterianas (*Escherichia Coli*), virais (rotavírus e coronavírus) e parasitárias (*Cryptosporidium*).

Neste sentido foram analisadas no presente estudo 37 explorações de bovinos de carne em alguns distritos do Alto Alentejo, procedendo-se à colheita de múltiplas amostras de fezes. Posteriormente determinaram-se as prevalências dos agentes que originaram as diarreias neonatais nos vitelos. Também foram realizados 60 inquéritos sobre a prevenção efectuada por parte dos produtores.

Conclui-se que a maior prevalência avaliada nestes concelhos estudados foi de *Cryptosporidium*, e que existem falhas na prevenção instituída por parte dos produtores.

Palavras-chave: *Diarreia, vitelo, Escherichia coli, Rotavírus, Coronavírus, Cryptosporidium, Alto Alentejo*

Abstract

The neonatal diarrheas are intestinal infections that affect neonate calves, compromising their growth and development and in some cases it can even be fatal . We can relate numerous etiologies with this syndrome, some bacterial ones like *Escherichia Coli*, viral like Rotavirus or Coronavirus and parasitic just as *Cryptosporidium*.

In order to know more about this diseases and what causes them, it was made a analyze to 37th bovine explorations of meat in some district in Alto Alentejo, through multiples samples of feces. In consequence of that it was possible to determinate the responsible agents who originate the calves neonatal diarrhea's. In order to support and diagnose this it was also made a inquire to 60th producers about what they do to prevent this situation.

In conclusion we can say that *Cryptosporidium* prevailed in this area and that are a lot of prevention fails from the producers.

Key-words: Diarrhea, calves, *Escherichia coli*, *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Cryptosporidium*, Alto Alentejo

Lista de abreviaturas e siglas

AMPc – Monofosfato de adenosina cíclico

AINES- Anti-inflamatórios não esteróides

BCoV- Coronavírus Bovino

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EIEC – Escherichia coli enteroinvasiva

EPEC – Escherichia coli enteropatogénica

EHEC – Escherichia coli enterohemorrágica

ETEC – Escherichia coli enterotoxigénica

ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay

IgG – Imunoglobulina G₂

IgM – Imunoglobulina M

IgA – Imunoglobulina A

IFI – Imunofluorescência indirecta

Kb- Kilobases

LT – Enterotoxina termolábel

mRNA – RNA mensageiro

NSP1 a NSP6 – Proteínas virais não estruturais

OC43- Coronavírus Humano

OMS- Organização Mundial de Saúde

PCR – Polymerase chain reaction

RT –PCR – Reverse transcription polymerase chain reaction

RNA – Ácido Ribonucleico

ST – Enterotoxina termoestável

ssRNA – Cadeia simples de ácido ribonucleico

SNC- Sistema Nervoso Central

VP1 a VP7 - Proteínas virais estruturais

Índice

I. Introdução.....	12
II. Revisão Bibliográfica.....	12
1. Anatomia e Fisiologia do Intestino	12
1.1. Digestão e absorção intestinal	13
1.2. Fisiopatologia da diarreia neonatal em vitelos	14
1.3. Transferência da imunidade passiva	16
1.4. Etiologia das diarreias neonatais	17
2. Agentes Enteropatogénicos.....	18
2.1. <i>Escherichia Coli</i>	18
2.2. <i>Cryptosporidium</i> spp.....	23
2.3. Rotavírus	26
2.4. Coronavírus	29
2.5. Outras Coccidioses.....	32
3. Tratamento das diarreias neonatais.....	34
3.1. Desequilíbrio hidro-eléctrolítico e acido-base	35
3.2. Fluidoterapia.....	36
3.3. Outros tratamentos utilizados nas diarreias neonatais.....	38
4. Prevenção das diarreias neonatais.....	39
III. ESTUDO DOS AGENTES PREVALENTES E MEDIDAS PREVENTIVAS DAS DIARREIAS NEONATAIS EM VITELOS NA REGIÃO A SUL DO TEJO	40
1. Objectivos:	40
2. Materiais e Métodos.....	40
2.1. Caracterização da amostra.....	40
2.2. Análise Estatística	42
3. Discussão dos Resultados	42
3.1. Número de colheitas.....	42
3.2. Distribuição geográfica	43
3.3. Avaliação das amostras	44
3.4. Relação da Estação do ano e diarreias nos vitelos	45
3.5. Percepção dos produtores – Avaliação preliminar	45
4. Conclusão.....	50
5. Bibliografia	52

Anexo I	60
---------------	----

Índice de Gráficos

GRÁFICO 1: FREQUÊNCIA DE COLHEITAS RELACIONADAS COM O NÚMERO DE AMOSTRAS INERENTES ÀS COLHEITAS	42
GRÁFICO 2: RELAÇÃO DA PREVENÇÃO EFECTUADA PARA DIARREIAS NEONATAIS COM AS MORTES DE VITELOS POR ANO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

Índice de Tabelas

TABELA 1: IDADE DE OCORRÊNCIA DOS AGENTES ENTROPATOGÉNICOS MAIS COMUNS DE DIARREIAS NEONATAIS (RADOSTITIS ET AL 2007).	18
TABELA 2: COLHEITAS EFECTUADAS POR ANO, RELACIONADAS COM A ESTAÇÃO DO ANO.	43
TABELA 3: RELAÇÃO DOS RESULTADOS POSITIVOS COM A LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DAS EXPLORAÇÕES.	44
TABELA 4: RELAÇÃO ENTRE OS MESES COM MAIOR OU MENOR PRECIPITAÇÃO E OS AGENTES QUE CAUSAM AS DIARREIAS.	45
TABELA 5: LOCALIZAÇÃO DOS INQUÉRITOS EFECTUADOS AOS PRODUTORES, NÚMERO DE VACAS POR CADA EFECTIVO.	46
TABELA 6: RELAÇÃO ENTRE AS MORTES DE VITELOS POR ANO E A RAÇA.	47
TABELA 7: RELAÇÃO ENTRE O LOCAL DE PARTO COM AS MORTES DE VITELOS POR ANO .	47
TABELA 8: RELAÇÃO DA ÁREA DE PARTO COM AS MORTES DE VITELOS POR ANO	47
TABELA 9: RELAÇÃO COM A TOMA DE COLOSTRO E AS MORTES DE VITELOS POR DIARREIA/ANO.....	47
TABELA 10: RELAÇÃO ENTRE OS CUIDADOS A TER NAS ÉPOCAS DE CHUVA COM AS MORTES DE VITELOS POR ANO COM DIARREIA.	47
TABELA 11: RELAÇÃO DO TAMANHO DO EFECTIVO COM A MORTALIDADE	48
TABELA 12: RELAÇÃO ENTRE A PROFILAXIA INSTITUÍDA E AS MORTES DE VITELOS POR ANO.	48

Índice de Figuras

FIGURA 1: VITELOS DIARREICOS COM BAIXA CONDIÇÃO CORPORAL.....	15
FIGURA 2: FEZES DIARREICAS DE UM VITELO.....	15
FIGURA 3: FEZES ESBRANQUIÇADAS DE UM VITELO DIARREICO.....	18
FIGURA 4: DIARREIA AMARELADA DE VITELO.	18
FIGURA 5: ESQUEMA REPRESENTATIVO DE ETEC ¹	20
FIGURA 6: MECANISMO DE ACÇÃO DA ETEC ²	22
FIGURA 7: CICLO DE VIDA DO CRYPTOSPORIDIUM ³	25
FIGURA 8: VIRIÃO DE ROTAVÍRUS ⁴	27
FIGURA 9: VIRIÃO DE CORONAVÍRUS ⁵	30
FIGURA 10: FLUIDOTERAPIA INTRAVENOSA EM VITELO DIARREICO.....	37
FIGURA 11: FLUIDOTERAPIA INTRAVENOSA EM VITELO DIARREICO NO CAMPO.	38

Índice de Mapas

MAPA 1: LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA AMOSTRA.....	41
MAPA 2: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS CASOS DE DIARREIAS NEONATAIS, POR CONCELHO, E AGENTES PREVALENTES NOS MESMOS.	44
MAPA 3: LOCALIZAÇÃO DA AMOSTRA (INQUÉRITOS EFECTUADOS AOS PRODUTORES)	46

I. Introdução

O vitelo é a principal fonte de rendimento e o factor económico primordial numa exploração de bovinos de carne. No entanto, existem determinadas patologias neonatais a ter em conta, sendo a mais comum a diarreia neonatal, constituindo um grave problema de bem-estar animal, contribuindo assim para grandes perdas económicas devido à elevada taxa de mortalidade e diminuição da taxa de crescimento. Desta forma é de extrema importância a detecção precoce das diarreias e determinar a sua etiologia com posterior implementação de um tratamento eficaz e de um protocolo de prevenção que seja seguido por parte dos produtores, com o objectivo de evitar novas infecções.

Define-se diarreia neonatal como uma infecção intestinal, originando o aumento na frequência de defecação ou no volume fecal, consequentemente a um desequilíbrio entre a secreção e a absorção, em animais recém-nascidos, até cerca de um mês de idade. Desta forma o tratamento dirigido à etiologia presente e as medidas preventivas instituídas são de extrema importância para o sucesso do controlo desta patologia.

Este trabalho vai abordar o tema da diarreia neonatal, o cálculo da prevalência da mesma em várias explorações na região a Sul do Tejo, assim como a determinação da sua etiologia e as medidas preventivas implementadas por parte dos produtores da mesma região.

II. Revisão Bibliográfica

1. Anatomia e Fisiologia do Intestino

Anatomicamente o intestino inicia-se caudalmente ao piloro e termina no ânus. Divide-se em dois segmentos intestinais, o intestino delgado e o intestino grosso. O intestino delgado tem na sua constituição três partes: o duodeno, definido como a porção inicial do órgão em continuação com a parte pilórica do estômago, o jejuno e o íleo posicionados na parte ventral da cavidade abdominal, sustentados pelo mesentério que conduz vasos e nervos. O intestino grosso define-se como um tubo relativamente mais curto que o intestino delgado, apresentando também três partes, o ceco que é caracterizado como um divertículo cego existente na origem da junção do íleo com o

cólon, o cólon que se diferencia em cólon ascendente, cólon transversal e cólon descendente e por fim o recto (Konig, 2004; Dyce, 2002). O tecido linfóide intestinal encontra-se na lâmina própria e serosa, ao longo do intestino delgado, composto por linfonodos solitários e linfonodos agregados, as Placas de Peyer. Apresentando um papel muito importante na defesa imunológica, pois tem grande importância na protecção e combate das bactérias (Konig, 2004).

1.1. Digestão e absorção intestinal

A digestão e a absorção são processos necessários para que ocorra uma correcta assimilação de nutrientes no interior do tracto digestivo. Distúrbios nesta assimilação são relativamente comuns em Medicina Veterinária sendo que uns afectam a componente da digestão e outros a absorção. A digestão é o processo de redução de nutrientes complexos em moléculas simples e a absorção por sua vez é um processo de transporte dessas moléculas simples resultantes da digestão através do epitélio intestinal para o sistema vascular em resposta a gradientes eléctricos e químicos. De salientar a extrema importância da absorção de água e electrólitos (principalmente sódio, potássio, cloreto e bicarbonato) para a manutenção da vida, desequilíbrios neste processo pode originar diarreias, sendo as vilosidades intestinais as principais estruturas envolvidas nesse processo, pois elas contribuem para o aumento da área de absorção (Cunningham, 2004). Nas vilosidades existem muitas células que desempenham diversas funções que contribuem para o bom funcionamento do trânsito intestinal, sendo as células de Paneth componentes importantes no Sistema imunológico, pois possui a enzima Lisozima no seu interior que apresenta propriedades antibacterianas (Junqueira & Carneiro, 2004).

O tracto digestivo dos animais recém-nascidos difere do tracto digestivo do animal adulto pois tem a capacidade de absorção de proteínas intactas, o que não acontece em animais adultos. Essa capacidade perde-se ao fim de 24 horas após o seu nascimento. Este fenómeno está relacionado com o desaparecimento do epitélio fetal especial que possui vilosidades cobertas com enterócitos especiais capazes de absorver proteínas intactas (Cunningham, 2004).

1.2. Fisiopatologia da diarreia neonatal em vitelos

A diarreia é definida como um aumento na frequência de defecação ou no volume fecal, e esta ocorre quando há um desequilíbrio entre a secreção e a absorção de água. Vários mecanismos podem levar à ocorrência de diarreia, entre eles a má absorção, com ou sem fermentação bacteriana provocando uma diarreia osmótica, esta geralmente está associada ao intestino delgado. A hipersecreção através da mucosa estruturalmente intacta vai resultar num efluxo de fluidos e electrólitos independente de mudanças de permeabilidade, da capacidade de absorção ou de gradientes osmóticos exogenamente gerados. A exsudação causada pelo aumento da permeabilidade capilar ou epitelial e a hipermotilidade que geralmente está envolvida na diarreia, é definida como um aumento da taxa, da intensidade ou da frequência dos movimentos peristálticos, apesar de não ser considerada um mecanismo primário em animais domésticos (Cunningham, 2004; Cunningham 2007).

As diarreias neonatais de vitelos constituem uma das afecções mais comuns em vitelos, causando um grave problema de bem-estar, contribuindo para elevados prejuízos económicos devido à elevada mortalidade, baixa taxa de crescimentos e custos nos tratamentos efectuados (Smith, 2012; Andrews et al, 2008). As infecções intestinais têm como consequência a diminuição do comprimento das vilosidades o que vai dificultar e afectar o processo de absorção, pois há diminuição da área de superfície e consequentemente de absorção. Com a presença de infecções as células maduras das regiões mais altas das vilosidades são perdidas, o que vai afectar negativamente a digestão e absorção de nutrientes, e sabendo-se que a absorção de nutrientes e de água estão relacionadas, uma vez que a absorção de nutrientes está afectada a absorção osmótica também vai estar diminuída (Cunningham, 2004).

Existe vários tipos de diarreia, entre elas a diarreia por má absorção que vai ocorrer quando a absorção é inadequada para recuperar uma quantidade suficiente de água secretada. Este tipo de diarreia ocorre devido à perda do epitélio gastrointestinal (principalmente epitélio das vilosidades e consequentemente perda dos enterócitos), processo que está relacionado com a presença de infecções virais, bacterianas ou infecções causadas por protozoários (Cunningham, 2004; Foster & Smith, 2009).

Outro tipo de diarreia é a secretora que vai ocorrer quando a capacidade absorptiva é superada pelo aumento do volume de secreção intestinal ou pela secreção inadequada das criptas do intestino delgado resultante de uma anormal estimulação do mecanismo secretor do epitélio da cripta. As enterotoxinas (toxinas produzidas por alguns tipos de bactérias, nomeadamente pela *Escherichia coli* enterotoxigénica - ETEC) têm um papel importante neste tipo de diarreias, pois ligam-se aos enterócitos e com a estimulação da actividade da adenilciclase e produção de AMPc dentro das células, vão causar aberturas com saída de cloreto e secreção de água e electrólitos do epitélio das criptas, causando assim graves efeitos nos estados hídrico electrolítico e ácido-base dos animais, em especial dos neonatos (Cunningham, 2004; Foster & Smith, 2009).

Numa abordagem a casos de diarreias neonatais, o veterinário tem que ter em conta vários factores, como por exemplo avaliar o estado de imunoglobulinas do bezerro, a alimentação, manejo sanitário do ambiente em que o vitelo se encontra, em animais estabulados analisar o alojamento, estado vacinal e de saúde das mães e no caso de animais em extensivo, deve-se fazer uma correcta avaliação da pastagem, ou seja, analisar a área disponível para pastagem e fazer uma correcta limpeza das áreas de parição assim como a presença de abrigos de chuva e frio também devem ser avaliados, e desta forma tentar minimizar esses casos de diarreia, propondo aos produtores soluções e medidas preventivas com o objectivo de diminuir a ocorrência de novos casos (Smith, 1996).



Figura 1: Vitelos diarreicos com baixa condição corporal



Figura 2: Fezes diarreicas de um vitelo

1.3. Transferência da imunidade passiva

O sistema imunitário é de grande importância para a sobrevivência das várias espécies animais, pois intervém na protecção e combate a afecções que possam por em risco a vida dos animais. O sistema imunitário dos recém-nascidos está pouco desenvolvido à nascença, e por essa razão a imunidade passiva adquirida nas primeiras horas de vida destes animais é de grande importância. Os bovinos dependem da ingestão de colostro (primeira secreção láctea mamária constituída por elementos que constituem o soro sanguíneo materno, entre eles, imunoglobulinas, leucócitos, proteínas séricas, factores de crescimento, hormonas, citocinas, nutrientes e factores antimicrobianos não específicos) para obtenção da imunidade passiva, considerada como a primeira linha de defesa às agressões infecciosas que o organismo está sujeito, uma vez que nesta espécie, à semelhança de outros ruminantes, não ocorre a transferência placentária de imunoglobulinas durante a gestação, os vitelos nascem assim em estados hipo ou agamaglobulinémicos (Ussman, 2011).

A absorção dos anticorpos pelos recém-nascidos vai ser afectado por vários factores o que faz com que o nível de imunoglobulinas séricas encontradas em vitelos varie de animal para animal (Baracat et al, 1997). Essa variação tem em conta a quantidade de imunoglobulinas na secreção láctea materna, a ingestão do colostro por parte dos vitelos e também a própria absorção das imunoglobulinas através do lúmen intestinal do vitelo (Feitosa, 1999).

Como acontece em humanos, as principais classes de imunoglobulinas dos animais domésticos incluem a IgG, IgM e IgA. Nos bovinos estas imunoglobulinas estão presentes no colostro e assim transmitidas para o vitelo recém-nascido, sendo a imunoglobulina IgG encontrada em maior quantidade, em segundo lugar a IgM e em último a IgA (Holland, 1990).

Os valores de imunoglobulinas dos vitelos após a ingestão de colostro, diminuem com o avançar da idade, sendo a IgG a mais persistente, ou seja, a sua concentração permanece até cerca dos 60 dias de idade, diminuindo lentamente, por outro lado a IgM e IgA diminuem rapidamente até cerca dos 21 dias de idade. Vários factores vão afectar o sucesso na transferência da imunidade passiva, sendo eles a idade

da mãe, o manejo sanitário, a temperatura do ambiente, a ingestão e a absorção insuficiente de colostro (Feitosa, 1999).

A falha na transferência passiva de imunoglobulinas está associada à presença de várias doenças que atacam o sistema imunitário dos animais, sendo a diarreia a afecção mais comum, entre elas as diarreias por *E. Coli* e as diarreias virais, nomeadamente as causadas por rotavírus. Sendo por isso aconselhável que o vitelo tome colostro de boa qualidade e em suficiente quantidade nas primeiras 24 horas de vida, considerando que a concentração sérica de imunoglobulinas atinge o pico máximo entre as 12 e as 24 horas de idade, decrescendo até às 3-4 semanas (Holland,1990; Ussman, 2011).

1.4. Etiologia das diarreias neonatais

A etiologia das diarreias neonatais é complexa, pois envolve uma grande variedade de agentes assim como uma interação com vários factores, entre os quais, factores nutricionais, ou seja a qualidade da dieta, vitelos alimentados com leites de substituição têm mais probabilidade de desenvolver diarreias quando comparado com vitelos que foram alimentados com leite materno; os factores ambientais também interferem, na medida em que mudanças climáticas como chuva, frio e vento predis põem ao aparecimento de diarreias; factores imunológicos, no que diz respeito à imunidade colostrar, pois, está provado que um baixo nível de imunoglobulinas séricas vai predispor os animais ao aparecimento de varias afecções entre elas as diarreias; factores relacionados com a mãe, ou seja, vitelos nascidos de novilhas têm mais tendência a desenvolver esta patologia uma vez que não adquirem os níveis suficientes de imunoglobulinas via colostrar e vacinação das mães; a elevada densidade populacional também é um factor a ter em conta no que diz respeito ao aparecimento das diarreias aumentando o grau de infecção entre animais, contribuindo para um aumento da morbilidade e mortalidade, e por fim, e não menos importante, os agentes infecciosos, tendo estes um papel crucial na etiologia desta doença (Radostitis et al,2007; Gamez et al, 2006; Martins, 2011).

Vários agentes entropatogénicos estão envolvidos nas diarreias neonatais, entre eles agentes bacterianos, virais e protozoários (Santos, 2011; Kahn, 2007).

O agente patogénico bacteriano mais comum é a *Escherichia Coli*, seguindo-se os virais como o Rotavírus e o Coronavírus, e por fim o *Criptosporidium* classificado como o protozoário mais comum envolvido nesta patologia, possuindo um importante papel a nível zoonótico. Por vezes pode-se observar também uma associação entre agentes, o que agrava o quadro clínico apresentado por esta patologia (Smith,2012; Kahn, 2007).

Tabela 1: Idade de ocorrência dos agentes entropatogénicos mais comuns de diarreias neonatais (Radostitis et al 2007).

Agentes Enteropatogénicos	Idade dos vitelos (dias)
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	<3
Rotavírus	5-15
Coronavírus	5-21
<i>Criptosporidium</i> spp.	5-35



Figura 3: Fezes esbranquiçadas de um vitelo diarreico



Figura 4: Diarreia amarelada de vitelo.

2. Agentes Enteropatogénicos

2.1. *Escherichia Coli*

A *Escherichia coli* é considerada a causa bacteriana mais frequente de diarreia neonatal em vitelos, com distribuição mundial apresenta uma grande importância a nível de perdas económicas (Coetzer & Tustin, 2004; Kahn, 2007). É caracterizada como uma

bactéria anaeróbia facultativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*, Gram negativa e urease negativa, tem a forma de bastonetes e relativamente à sua mobilidade geralmente são móveis, apesar de existirem estirpes imóveis (Holland, 1990; Reck, 2009; Coetzer & Tustin, 2004).

Apesar da maioria das estirpes de *E.coli* fazerem parte da flora comensal do tracto gastrointestinal de várias espécies animais, uma pequena parte possui uma virulência predispondo ao aparecimento de uma ampla variedade de infecções, tanto intestinais (diarreicas) como extra-intestinais que incluem por exemplo mastites, septicemia e infecções reprodutivas (Coetzer & Tustin, 2004; Holland, 1990).

A patogénese desta bactéria está relacionada com padrões antigénicos, sendo a classificação dada com base na função exercida por cada antígeno. O antígeno somático “O” está relacionado com a porção do polissacarídeo da parede celular, sendo responsável pela produção de endotoxinas, o antígeno capsular “K” com funções importantes a nível dos enterócitos e o antígeno da proteína flagelar “H” está relacionado com a mobilidade devido à presença de um flagelo (Reck, 2009; Coetzer & Tustin, 2004).

Um quarto tipo de antígeno frequentemente associado à patogénese da *E.coli* é o fimbrial “F”, estas fimbrias ou também chamadas de pili são apêndices proteicos que irão permitir à *E.coli* a ligação aos receptores específicos do hospedeiro, nomeadamente às vilosidades intestinais do intestino delgado (Kahn, 2007; Coetzer & Tustin, 2004).

Existem vários tipos de *E.coli* com acção a nível intestinal, são eles a *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), a *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), a *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC) e a *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) sendo esta última, a causa mais frequente de colibacilose entérica em bovinos (Coetzer & tustin, 2004; Smith, 1996; Martins, 2011).

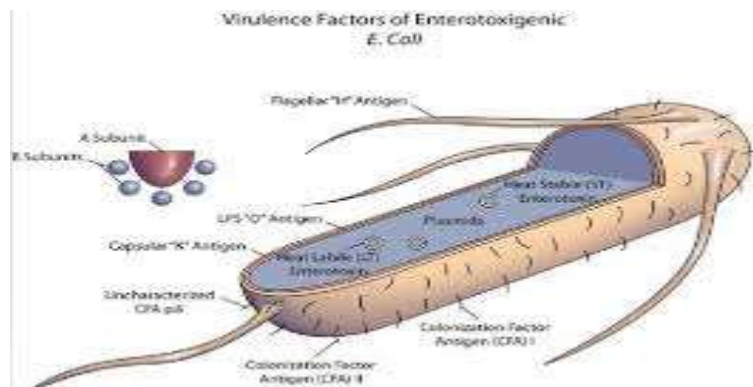


Figura 5: Esquema representativo de ETEC¹

¹ Adaptado de :<http://lacucala.blogspot.pt/>

2.1.1. Epidemiologia

A prevalência de vitelos com diarreia causada pela ETEC varia geograficamente e vai depender da idade dos vitelos afectados. A doença não ocorre imediatamente após a exposição do organismo à *E.coli*, pois vai depender de uma complexa interacção entre vários factores, entre eles a patogenicidade da estirpe infectante, os factores inerentes ao ambiente e a susceptibilidade do hospedeiro (Coetzer & Tustin, 2004; Radostitis et al, 2007).

Os animais mais jovens com mais de 3 dias de idade são os mais frequentemente afectados, cerca de 50-60% comparando com os 5-10% de prevalência de animais com 8 dias de idade. Podemos então concluir que a colibacilose entérica é mais comum em vitelos com menos de 3 dias de idade, sendo que, em animais com mais de 3 dias a causa mais viável de diarreia pensa-se ser viral. Relativamente às taxas de morbilidade e mortalidade em vitelos de carne ronda os 10-50% e 5-25% respectivamente (Radostitis et al, 2007).

2.1.2. Patogénese e factores de virulência

A ETEC é a forma mais comum de *E.coli* implicada nas diarreias neonatais, afectando na sua maioria vitelos susceptíveis, actuando a nível intestinal, multiplicando-se, aderindo-se através das suas fimbrias, colonizando-o e por fim produzindo

enterotoxinas causando uma diarreia profusa e aquosa (Smith, 1996; Radostitis et al, 2007).

A virulência da ETEC deve-se a duas características, ao mecanismo de fixação da bactéria aos receptores específicos presentes na membrana dos enterócitos, sendo essa fixação mediada através de filamentos proteicos localizados na superfície das bactérias, chamados de fimbrias, pili ou adesinas de superfície e à capacidade de produção de enterotoxinas após a colonização intestinal, causando posteriormente uma diarreia hipersecretora. Os dois tipos de enterotoxinas produzidas são designadas de termoestáveis (ST) caracterizadas como toxinas de baixo peso molecular e resistentes a temperaturas elevadas, e termolábeis (LT), toxinas com alto peso molecular e inativada a 60°C durante 30 minutos. (Andrews et al, 2008; Holland, 1990).

O Antígeno fimbrial K99 ou F5 é o mais frequentemente envolvido nas estirpes que afectam os vitelos, sendo mais comum em animais jovens que em animais mais velhos, isto deve-se ao facto do epitélio intestinal envelhecer com o aumento da idade perdendo-se assim a capacidade de ligação dos seus receptores a antígenos (Kahn, 2007; Coetzer & Tustin, 2004).

O antígeno K99 está associado a estirpes bovinas dos grupos “O”. De salientar que a ETEC K99 produz unicamente as enterotoxinas termoestáveis, que se subdividem em duas outras enterotoxinas (a STa e STb) ambas envolvidas na doença pois vão provocar alterações nas células epiteliais intestinais resultando assim numa hipersecreção de fluídos e electrolíticos para o lúmen intestinal, estas características contribuem assim para a virulência desta bactéria (Radostitis et al, 2007; Coetzer & Tustin, 2004).

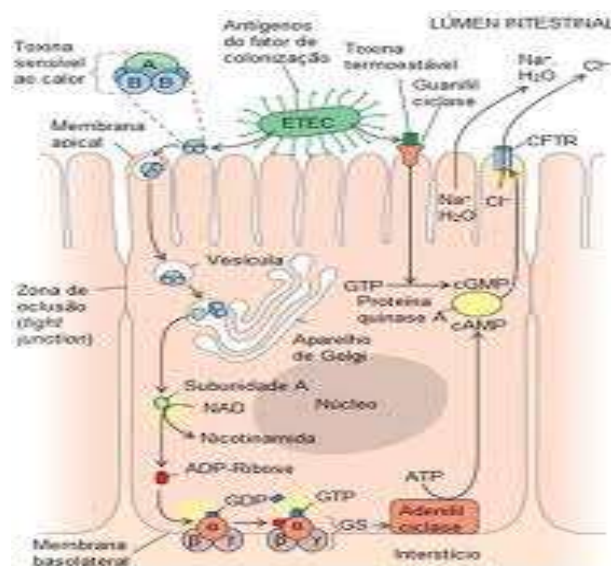


Figura 6: Mecanismo de acção da ETEC²

² Adaptado de : <http://www.medicinanet.com.br/>

2.1.3. Sinais clínicos

Os animais afectados pela ETEC além de apresentarem uma diarreia aquosa profusa, apresentam desidratação, fraqueza, e se a doença progredir rapidamente podem apresentar decúbito e nos casos mais severos morte em poucas horas (entre 6 e as 12 horas), estes sinais são mais frequentes em vitelos recém-nascidos com poucos dias de vida, até aos 4 dias, podendo aparecer ocasionalmente em animais mais velhos (Smith, 1996).

2.1.4. Diagnóstico

Para se estabelecer um diagnóstico de diarreia por ETEC, pode-se efectuar exames bacteriológicos recorrendo à recolha de amostras biológicas do animal infectado, nomeadamente pedaços de secções intestinais, assim como linfonodos mesentéricos, de preferência antes de uma antibioterapia ser instituída. A recolha deve ser feita o mais próximo possível à morte do animal e posteriormente cultivadas em meios de cultura adequados, entre eles o Agar MacConkey, pois só assim será possível a distinção da E.coli de outras bactérias (Coetzer & Tustin, 2004).

A serotipagem não é considerada um diagnóstico preciso, pois dá-nos informação de serótipos presentes na microflora do animal, não sendo possível fazer uma distinção de agentes patogénicos dos não patogénicos, o que não vai ser suficiente para um diagnóstico definitivo ser estabelecido (Martins, 2011).

Por fim, só a detecção dos factores de virulência, ou seja, a presença de fimbrias e das enterotoxinas LT e ST, através de uma análise genotípica e fenotípica nos vai fornecer um diagnóstico definitivo das infecções por ETEC (Nagy et Fekete, 1999; Martins, 2011). Enquanto que a avaliação fenotípica está relacionada com a produção de fimbrias e pode ser efectuada através do método Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ou IFI (Imunofluorescência Indirecta) a avaliação genotípica pode ser efectuada através de PCR ou através de sondas de DNA, identificando os genes de virulência de E.coli de animais infectados, que codificam as fimbrias (F5) e as enterotoxinas (geralmente a STa) (Francis, 2002; Martins, 2011).

2.2. *Cryptosporidium* spp.

Em protozoologia o *Cryptosporidium* é o género pertencente ao Reino Protista, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccídea e por fim à família *Cryptosporidiidae* (Fortes, 2004).

Foi Tyzzer que em 1907 descreveu pela primeira vez a existência de uma coccídea nas células das glândulas gástricas de um camundongo, foi designado de *Cryptosporidium muris* e em 1911 observou também no Intestino delgado do mesmo animal, de dimensão menor que a encontrada nas glândulas gástricas, atribuindo o nome de *Cryptosporidium parvum* (Fortes, 2004). Foi a partir da década de 70 que o *Cryptosporidium* começou a ter um maior impacto como agente etiológico de diversas infecções, e mais tarde em 1982 foi descrito por Sanford & Josephson o envolvimento de *Cryptosporidium* em casos de diarreias neonatais em vitelos (Feitosa et al, 2008).

Os géneros pertencentes à família *Cryptosporidiidae* são caracterizados como parasitas obrigatórios e oportunistas apesar de não mostrarem uma especificidade de hospedeiro, o seu desenvolvimento não ocorre no interior da célula do hospedeiro, mas sim na periferia, os oocistos e esquizontes possuem uma saliência com função de

adesão, os oocistos não possuem esporocistos e os microgametas não se movem pois não possuem flagelos (Fortes, 2004).

2.2.1. Epidemiologia

Os protozoários do género *Cryptosporidium* apresentam distribuição mundial, afectando uma enorme variedade de espécies de vertebrados, entre eles aves, peixes, reptéis, mamíferos e humanos (Ederli et al, 2004; Coetzer & Tustin, 2004).

A Criptosporidiose é considerada a maior causa de diarreia neonatal em vitelos, afectando também outros animais imunocomprometidos, sendo frequente que os animais exibam a patologia da 1ª à 4ª semana de vida (Coetzer & Tustin, 2004; Smith, 1996). Esta patologia apresenta uma grande importância no que diz respeito à criação de animais de produção, pois é uma importante causa de elevadas perdas económicas e apresenta um elevado potencial zoonótico (Bresciani et al, 2013). A transmissão dá-se através da via fecal-oral, e o período de incubação é cerca de 4 dias (Kahn, 2007).

2.2.2. Ciclo de Vida

O ciclo de vida do *Cryptosporidium* é um ciclo monoxeno, ou seja, as suas fases (assexuada e sexuada) ocorrem no mesmo hospedeiro (Martins, 2011).

Relativamente ao ciclo propriamente dito, este pode ser dividido em várias fases, a merogonia que corresponde à fase assexuada, a gametogonia que irá corresponder à fase sexuada e posteriormente a fertilização e a esporogonia, sendo esta endógena (Martins-Vieira et al, 2009).

Os oocistos são eliminados nas fezes de animais infectados, cada oocisto possui quatro esporozoítos. Após a ingestão dos mesmos, estes vão invadir o tecido intestinal, nomeadamente as microvilosidades dos enterócitos e vão-se diferenciar em trofozoítos dando posteriormente origem a esquizontes com quatro a oito merozoítos no seu interior, correspondendo esta fase à assexuada, segue-se a fase sexuada ou gametogonia que irá originar novamente os oocistos, fechando assim um ciclo completo (Urquhart et al, 1996). De salientar o facto de estes protozoários produzirem dois tipos de oocistos, uns possuem uma parede espessa e são excretados para o ambiente, podendo assim

contaminar alimentos e água que podem ser ingeridos ou inalados por hospedeiros susceptíveis, e os outros possuem, ao contrário dos primeiros, uma parede fina sendo responsáveis pela ocorrência de uma auto-infecção no hospedeiro, pois vão libertar novamente os esporozoítos no intestino (Urquhart et al, 1996; Martins-Vieira et al, 2009)

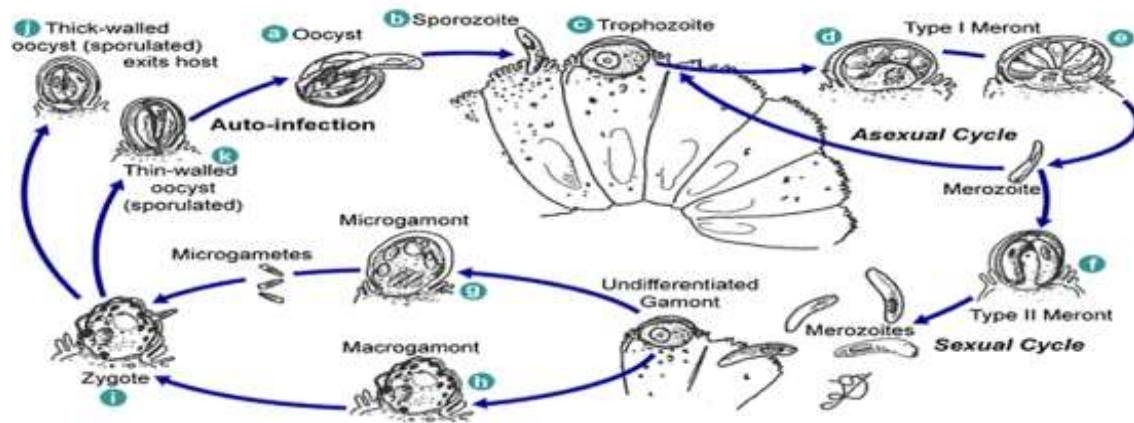


Figura 7: Ciclo de vida do *Cryptosporidium*³

³ Adaptado de: <http://www.cleanstream.co.uk/water-problems/cryptosporidium>

2.2.3. Patogénese e Sinais Clínicos

Este parasita vai invadir os enterócitos do intestino delgado distal e intestino grosso, sendo no intestino delgado onde a patologia apresenta mais severidade. Esta caracteriza-se por atrofia e fusão das vilosidades intestinais resultando na diminuição da área de superfície de absorção, consequentemente diarreia, assim como reacções inflamatórias também podem ser visíveis no decorrer da doença (Bresciani et al, 2013; Smith, 1996).

Relativamente à patogenia e aos sinais clínicos demonstrados pelo *Cryptosporidium*, apresentam-se relacionados com diversos factores, nomeadamente a idade do animal infectado assim como os factores imunológicos inerentes ao animal, a presença de outros agentes enteropatogénicos que possam agravar o quadro clínico, o nível de contaminação ambiental, a virulência e inefectividade da amostra. (Bresciani et al, 2013; Feitosa et al, 2008). Os sinais mais comuns, principalmente em animais jovens (1^a à 3^a semana de vida) são: anorexia, perda de peso, diarreia, tenesmo. Não sendo considerada uma doença grave e fatal, esta pode adquirir esse carácter se estiver

presente em animais imunocomprometidos, assim como se existir uma infecção concomitante com outros agentes enteropatogénicos (Smith, 1996).

Os oocistos de *Cryptosporidium* caracterizam-se pela sua elevada resistência no meio ambiente, permanecendo muito tempo de forma viável com factores meteorológicos adversos e na água, a 4°C podem permanecer viáveis até seis meses. São também de difícil eliminação pois são resistentes a todos os antimicrobianos conhecidos assim como anticoccidianos e também desinfectantes (Smith, 1996; Martins-Vieira et al, 2009).

De salientar o risco de elevado potencial zoonótico que o *Cryptosporidium parvum* apresenta, pois está provado que a excreção de oocistos pelas fezes de animais infectados vai contaminar de forma directa ou indirecta as águas, constituindo uma fonte de infecção para humanos (Martins-Vieira et al, 2009).

2.2.4. Diagnóstico

O diagnóstico nem sempre é fácil pois, por vezes existem outras infecções concomitantes assim como, o tamanho reduzido que estes protozoários apresentam constituem um entrave no diagnóstico. Estes parasitas intestinais podem ser detectados através da sua visualização directa ao microscópio, ou seja, fazendo-se um teste de flutuação fecal, utilizando uma solução de sacarose, e posteriormente utilizando-se a técnica de coloração Ziehl-Neelsen, prosseguindo-se à sua visualização, ou através de raspados da mucosa intestinal fresca (Kahn, 2007; Smith, 1996; Coetzer & Tustin, 2004; Teixeira et al, 2011).

2.3. Rotavírus

Mebus et al. descobriram vírus envolvidos nas diarreias dos vitelos em 1969, denominados de “reovirus-like agentes” pois apresentavam grande semelhança com os reovírus. Foram posteriormente classificados de rotavírus, pertencentes à família Reoviridae (Beer, 1999).

Morfologicamente os rotavírus não se distinguem entre si possuindo ácido ribonucleico (RNA) de cadeia dupla com 11-12 segmentos. Apresentando a forma de

um círculo ou de uma coroa radiada devido à presença de uma cápside icosaédrica de envoltório duplo com uma camada externa e outra interna de capsômeros. É a cápside externa que confere a infecciosidade ao vírus. Estes vírus são também ácido-resistentes (pH=3) e muito estáveis ao éter e clorofórmio (Beer,1999; Andrews et al, 2008; Estes & Cohen, 1989).

Foram descritos seis grupos distintos de vírus, classificados de A a F, sendo os rotavírus dos grupos A, B e C associados a humanos e animais e os do grupo D, E e F a animais apenas. Os rotavírus do grupo A foram encontrados em animais jovens, considerados os mais frequentes e importantes clinicamente no que diz respeito a esta patologia (Estes & Cohen, 1989; Smith, 1996; Kahn, 2007).

Dentro de cada grupo os rotavírus são ainda classificados em serótipos com base na reactividade das proteínas virais (Holland, 1990; Knipe & Howley, 2007). O virião é composto por seis proteínas virais estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) e seis proteínas não estruturais (NSP1-NSP6) (Matthijssens et al, 2008). A VP4 e VP7 são proteínas estruturais que vão induzir a produção de anticorpos específicos para o rotavírus, elas estão presentes na cápside externa do rotavírus e é através da análise serotípica ou genotípica destas proteínas que se baseia a classificação feita a este vírus. A VP4 pertence ao serotipo P e a VP7 pertence ao serotipo G (Freitas et al, 2011). De acordo com as diferenças que estas proteínas apresentam consegue-se fazer a distinção em serótipos ou genótipos, dependendo se se utilizam métodos serológicos ou moleculares (Boto, 2008).

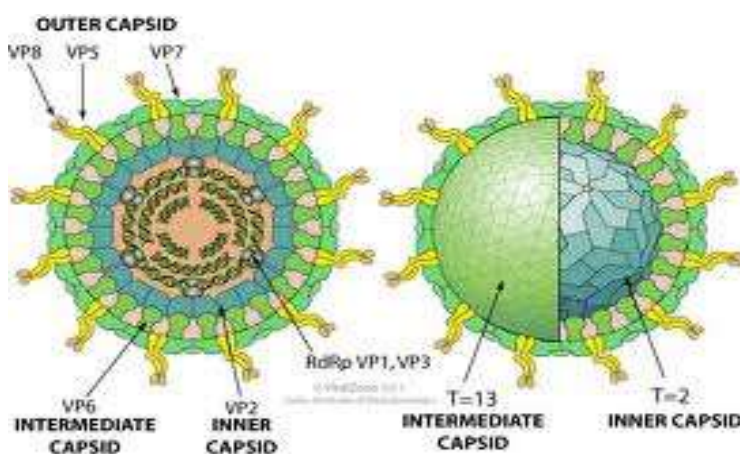


Figura 8: Virião de Rotavírus⁴

⁴ Adaptado de: Viralzone

2.3.1. Epidemiologia

Os rotavírus são considerados os agentes mais comuns de diarreias neonatais em vitelos, principalmente, como referido anteriormente, os pertencentes ao serogrupo A causando diarreia em vitelos entre os 4 e os 14 dias de idade, podendo também afectar animais mais velhos, apesar de menos frequente. Muitas vacas possuem anticorpos anti-rotavirus no seu colostro o que vai ser uma fonte de protecção nas primeiras horas de vida do vitelo, após o declínio dessa imunidade passiva é então a altura crítica do aparecimento destas diarreias (Smith, 1996). São agentes com distribuição mundial e podem afectar uma grande variedade de espécies, entre elas animais e humanos, o que sugere a possibilidade da ocorrência de infecções interespecies, apesar de pouco estudado ainda, podem ser responsáveis por elevados prejuízos económicos (Jerez et al, 2002; Holland, 1990).

Os rotavírus são muito resistentes, sobrevivem a condições ambientais adversas, principalmente no inverno, por esse facto é muito difícil quebrar a transmissão entre animais, a transmissão é portanto fecal-oral, sendo na mucosa oral onde ocorre a penetração do vírus, sendo necessário pouca quantidade de partículas virais para que ocorra a infecção (Beer, 1999). Os animais adultos têm um papel importante na transmissão da infecção, pois apesar de não exibirem os sinais clínicos da doença, podem excretar o vírus para o ambiente e assim contaminarem os animais mais jovens, são portanto considerados uma grande fonte de contaminação. O seu período de incubação pode ir de 1 a 3 dias (Smith,1996; Holland, 1990; Andrews et al, 2008).

As infecções mistas com outros agentes enteropatogénicos, nomeadamente com o *Cryptosporidium* são comuns, agravando o quadro clínico, pensa-se ser devido à faixa etária que predominam ser idêntica e à sua patogenia ser semelhante (Barbosa et al, 1998).

2.3.2. Patogénese e sinais clínicos

O vírus vai infectar o tecido intestinal, multiplicando-se nos enterócitos, causando a destruição das células epiteliais e atrofia das vilosidades intestinais, diminuindo assim a superfície de absorção (Smith,1996; Kahn, 2007).

Com a degeneração das células epiteliais, as enzimas que existem nas suas membranas, principalmente a lactase não conseguem fazer a digestão do conteúdo intestinal, fazendo com que a fermentação bacteriana da lactose provoque a diminuição do pH, esta alteração provocada pelo conteúdo ácido do conteúdo digestivo no cólon vai provocar uma reabsorção insuficiente de água dando origem ao aparecimento de diarreia (Beer, 1999).

As rotavíroses são geralmente auto-limitantes, apesar de apresentarem elevada morbidade, a mortalidade não é geralmente muito elevada, no entanto os sinais associados a rotavírus são semelhantes aos causados por outros agentes entropatogénicos, ou seja, anorexia, desidratação, depressão do SNC, diarreia profusa aquosa, e morte nos casos mais severos. Se existirem outras infecções concomitantes o caso agrava-se. Caso contrário em 2 ou 4 dias os sinais clínicos diminuem, apesar da excreção fecal persistir por mais tempo (Holland, 1990; Freitas et al, 2011).

A severidade e o curso da doença vão ser determinadas por diversos factores, como a virulência das estirpes infectantes, assim como a idade, o estado imunitário e a nutrição do hospedeiro, a quantidade de partículas virais excretadas para o meio ambiente e a sua resistência no mesmo, manejo sanitário dos rebanhos e a presença de outros agentes enteropatogénicos (Freitas et al, 2011; Holland, 1990).

2.3.3. Diagnóstico

Relativamente ao diagnóstico definitivo, este pode ser obtido através de análise das fezes, pois a presença de antígenos virais ou de ácidos nucleicos virais é essencial. Para isso pode-se recorrer a técnicas como: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), electroforese em gel de poliacrilamina, hibridação de ácidos nucleicos, microscopia electrónica e o polymerase chain reaction (PCR), este último demonstra uma elevada sensibilidade na detecção de vírus RNA (Andrews et al, 2008; Chinsangaram et al, 1993).

2.4. Coronavírus

O coronavírus bovino (BCoV) foi isolado a partir de fezes de vitelos diarreicos pela primeira vez em 1972 por Stair et al., faz parte da ordem Nidovirales, família Coronaviridae e género coronavírus. O virião possui envelope e forma esférica, e o seu genoma é constituído por uma cadeia simples de RNA (ssRNA) e é um dos maiores genomas de RNA conhecido, possui entre 27 e 39 Kilobases (kb) (Liu et al, 2006; Spagnolo & Hogue, 2000; Beer, 1999).

O genoma viral codifica cinco proteínas estruturais importantes: a proteína da espícula (S), proteína transmembranar (M), proteína da nucleocápside (N), proteína hemaglutinina-esterase (HE) e a proteína do envelope (E) (Lorenzetti et al, 2013).

Este vírus encontra-se dividido em três grupos, distribuídos entre eles através das suas propriedades genéticas e serológicas. O coronavírus bovino (BCoV) inclui-se no grupo 2, assim como os vírus de outros mamíferos, aves e o coronavírus humano (OC43). Este grupo apresenta uma característica única de todos os outros grupos, ou seja, a presença de um gene que codifica para a proteína hemaglutinina-esterase, ou seja o vírus tem a capacidade de aglutinar os eritrócitos (Liu et al, 2006; Beer, 1999).

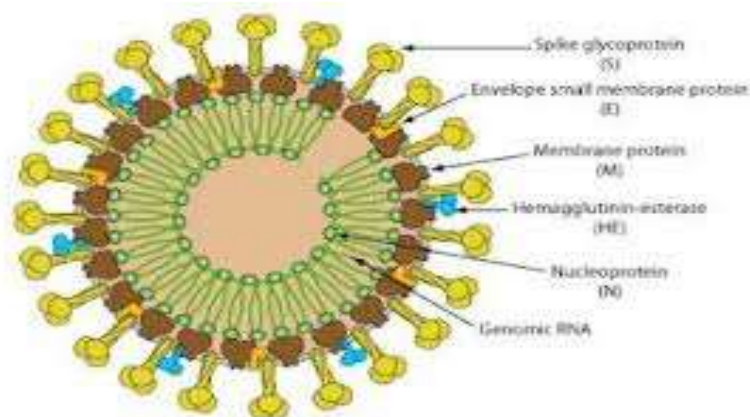


Figura 9: Virião de coronavírus⁵

⁵ Adaptado em: <http://skperdon.hubpages.com/hub/Travel-Infections>

2.4.1. Epidemiologia

O Coronavírus bovino (BCoV) é considerado um dos agentes virais mais importantes envolvidos em diarreias neonatais em todo o mundo (Lorenzetti et al, 2013). Também é encontrado em animais adultos, apresenta uma distribuição mundial, estando presente em casos de disenteria de inverno, principalmente em bovinos com aptidão leiteira, e é também um agente muito importante presente em bovinos com infecções respiratórias, incluindo o complexo respiratório bovino, neste caso pode afectar animais de todas as idades (Coetzer & Tustin, 2004).

Este vírus afecta tanto bovinos leiteiros como de carne, e os surtos de diarreias são mais comuns no inverno, pensa-se ser pelo facto do vírus ser termolábil e também devido às condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento viral, pensa-se também que os bovinos adultos são a fonte de infecção para vitelos. A transmissão é fecal-oral, sendo mais comum em animais até aos 30 dias de idade (nomeadamente entre os 3 e os 30 dias) (Coetzer & Tustin, 2004). O vírus é excretado pelos bovinos adultos, e portanto são considerados excretores assintomáticos. Esta excreção aumenta na época de partos, assim como vitelos nascidos de mães excretoras de vírus apresentam maior predisposição a desenvolverem diarreia (Smith, 1996). De salientar também a possível excreção viral a partir de vitelos saudáveis, apesar deste mecanismo se verificar com maior frequência nos casos de infecções por rotavírus (Andrews et al, 2008).

Relativamente a sua resistência, por apresentarem envelope são mais susceptíveis a agentes microbicidas, comparando com outros vírus sem envelope (Chinsangaram et al, 1993).

2.4.2. Patogénese e sinais clínicos

Como referido anteriormente as infecções com coronavírus provocam diarreia em animais jovens, apresentam semelhanças à diarreia causada pelo rotavírus, o período de incubação poder variar entre as 20h e as 30h (Andrews et al, 2008).

O vírus vai afectar as células epiteliais absortivas, principalmente a nível do jejuno distal e íleo, mas também afecta as células da superfície e das criptas do intestino

grosso causando atrofia das vilosidades intestinais e hiperplasia da cripta, ocorrendo posteriormente a lise das células das vilosidades intestinais, diminuindo assim a área de absorção, e consequentemente originando diarreia (Coetzer & Tustin, 2004; Andrews et al, 2008).

Os vitelos apresentam diarreia grave e por vezes fatal. Consequentemente os vitelos apresentam desidratação, acidose metabólica, hipercalemia e hipoglicemia. Geralmente as fezes apresentam uma cor amarelada ou esverdeadas, muito líquidas e por vezes podem conter muco, podendo persistir durante 3 ou 8 dias (Coetzer & Tustin, 2004; Andrews et al, 2008).

2.4.3. Diagnóstico

O diagnóstico do Coronavírus baseia-se na detecção do próprio vírus ou do antígeno viral no tecido intestinal ou nas fezes diarreicas (Andrews et al, 2008).

Para isso utiliza-se o método Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para a detecção do Antígeno viral em amostras fecais, este método de diagnóstico mostrou ter uma grande sensibilidade e especificidades assim como grande eficácia quando comparada à microscopia electrónica e ao teste de Hemaglutinação (Shoenthaler & Kapil, 1999). O RT-PCR demonstrou também ser muito eficaz na detecção do mRNA do coronavírus bovino (Cho et al, 2001).

2.5. Outras Coccidioses

Outras causas infecciosas de diarreia neonatal podem ser provocadas por outras coccidioses sem ser *Cryptosporidium*, que também pertencem ao filo Apicomplexa, classe *Sporozoa*, subclasse *Coccidia* e família *Eimeridae*. Estas coccidioses provocadas pelo género *Eimeria* são responsáveis por alguns surtos em vitelos principalmente em regime intensivo, como acontece mais frequentemente em bovinos de aptidão leiteira ou em engordas. Apesar de estarem descritas várias espécies em bovinos como por exemplo a *Eimeria bovis*, *E. zuernii* e a *E. alabamensis*, esta última é considerada a menos patogénica e as duas primeiras as mais patogénicas e mais frequentes na Europa,

podendo apresentar enterites graves que podem por vezes levar à morte os animais afectados (Fortes, 2004 & Gomes, 2008). Afectam principalmente animais jovens, desde neonatos até aos dois anos de idade (Quigley, 2001).

Relativamente ao ciclo biológico, este compreende duas fases, a assexuada e a sexuada, ocorrendo a esquizogonia no Intestino delgado e a esporogonia no exterior (Fortes, 2004). Os oocistos são libertados pelas fezes na forma não esporulada, esporulam posteriormente e caso existam condições favoráveis, como por exemplo a elevada humidade e temperatura, tornam-se infectantes, e caso outros animais ingeriram esses oocistos infectantes a partir de água ou alimentos contaminados ocorre a migração posterior para o intestino dos mesmos, e desta forma se forma outro ciclo (Gomes, 2008 & Quigley, 2001).

As coccidioses apresentam uma distribuição mundial, surgindo mais frequentemente no Inverno, com temperaturas mais baixas e elevada humidade, condições ideais para a esporulação dos oocistos. Os sintomas mais comuns verificados em animais afectados incluem: diarreia hemorrágica, anemia, perda de peso, tenesmo, anorexia, fraqueza e emaciação, em casos mais severos as fezes podem apresentar uma consistência mais líquida e sanguinolenta e morte causada pela rápida desidratação e ocorrências de infecções secundárias (Quigley, 2001 & Fortes, 2004).

Relativamente à sua patogenia, esta é elevada pois quando os animais ingerem os oocistos esporulados vão provocar alterações nas células intestinais do hospedeiro, nomeadamente a sua destruição e atrofia das vilosidades intestinais com subsequente atrofia das células absortivas, o que faz com que haja uma diminuição da área de absorção, provocando uma diarreia por má absorção. A gravidade das lesões obtidas depende da quantidade de oocistos ingeridos assim como da capacidade de abrangência dentro do intestino do hospedeiro e naturalmente da espécie infectante (Lima, 2004). O período de incubação pode variar de 4 a 14 dias (Quigley, 2001).

O diagnóstico é obtido facilmente pela visualização dos sintomas e lesões, pela observação directa dos oocistos, após método de flutuação fecal. Ou através da autópsia observando raspados da mucosa (Fortes, 2004). No entanto também se podem utilizar métodos serológicos, de forma a detectar anticorpos anticoccideas específicos pelo método de ELISA, no entanto este é pouco utilizado (Lima, 2004).

No que diz respeito ao tratamento, este deve ser efectuado o mais precocemente possível, pois quando aparecem os sintomas já existe uma grande destruição da mucosa intestinal o que leva a que a recuperação seja mais difícil, e por vezes mesmo impossível. (Fortes, 2004) O importante nestes casos é tratar os animais que sejam susceptíveis e estejam no mesmo ambiente contaminado. Existem várias drogas que podem ser utilizadas de forma a impedir a multiplicação das coccídeas, consideradas anticoccídeas, aconselhadas a sua administração na fase de multiplicação, ou seja, no início da doença, entre elas, sulfas, amprolio, decoquinato, alguns antibióticos como monensina, e toltrazuril parecem apresentar bons resultados. Os animais devem ser tratados concomitantemente com fluidoterapia e antibióticos para as possíveis infecções secundárias que possam ocorrer (Lima, 2004).

Na prevenção o mais importante é o manejo sanitário, manter sempre que possível as instalações limpas e secas, evitar que os comedouros e bebedouros sejam contaminados com fezes, evitar a sobrepopulação de animais e separar animais por idades, a desinfecção com hipoclorito de sódio e amónia podem ajudar no controlo da doença. As administrações de drogas anticoccídeas podem ser usadas como método preventivo (Lima, 2004). Em animais em regime extensivo é mais difícil controlar esta situação, a administração destas drogas anticoccídeas podem, em alternativa, serem administradas nas suas misturas minerais assim como uma rotação nas pastagens é também aconselhável. Assim que surjam animais afectados o ideal seria separá-los de imediato dos animais saudáveis e proceder-se o mais rapidamente possível ao tratamento anti-diarreico e hidro-electrolítico (Gomes, 2008).

3. Tratamento das diarreias neonatais

Uma boa avaliação do estado físico do animal é fulcral e o primeiro passo para o estabelecimento de um tratamento eficaz que suprima as necessidades fisiológicas do animal diarreico. Independentemente do agente patogénico envolvido no quadro de diarreia, sabe-se que esta afecção vai aumentar a perda de água e electrólitos nas fezes de vitelos e diminuir consequentemente a ingestão de leite, resultando numa desidratação, acidose e distúrbios electrolíticos. Fazer uma estimativa do grau de desidratação, da gravidade da acidose, se presente, e da presença ou ausência de

hipotermia e de hipoglicemia, é o primeiro passo para o tratamento adequado a cada caso (Smith,1996; Smith, 2009).

3.1. Desequilíbrio hidro-eléctrolítico e acido-base

Distúrbios nos fluidos corporais ocorrem frequentemente em animais afectados com diarreia, causando desequilíbrios tanto a nível electrolítico como acido-base, contribuindo para a severidade da doença. Os distúrbios electrolíticos ocorrem normalmente devido a uma perda de electrólitos, ou de mudanças relativas nas suas concentrações ou então devido à perda de água, e os mais comuns são: hiponatremia, hipercalémia, hipercalcemia e hipocloremia (Radostitis et al, 2007).

Animais com diarreia apresentam um desequilíbrio de água no corpo, que faz com que mais fluido seja perdido comparativamente ao fluido que é absorvido, o que vai resultar numa redução do volume sanguíneo circulante e numa desidratação dos tecidos. A desidratação é o sinal mais comum presente em animais diarreicos, e talvez dos mais importantes, sendo causada por uma perda excessiva de líquido nas fezes, com aumento da produção fecal. A perda de líquidos dos espaços intersticiais e intracelulares resulta no ressecamento e perda de elasticidade da pele e mucosa (que pode ser avaliada fisicamente com o teste da prega de pele) e no grau de retracção do globo ocular (enftalmia). Como resposta secundária a esta perda de líquidos vai ocorrer simultaneamente redução do fluxo sanguíneo, resultando numa diminuição do volume sanguíneo (hipovolemia), esta perda de volume em circulação vai contribuir para o estado de depressão mental, o que também pode ser devido à presença concomitante de acidose, estes efeitos combinados de desidratação e acidose vão contribuir para que ocorra hipotermia nestes animais. A perda de peso e a fraqueza muscular são sinais frequentemente observados em animais desidratados (Radostitis et al, 2007).

A desidratação severa causada pela perda fecal de fluidos e electrólitos é uma frequente complicação de diarreia, podendo ser classificada em 3 tipos: Hipertónica, Hipotónica e Isotónica, sendo esta classificação baseada no teor de água, electrólitos e na osmolaridade, sendo a desidratação hipertónica considerada a verdadeira desidratação em que a osmolaridade é superior a 300 mmol/Kg e está associada a casos

de diarreia, e a hipotónica estando associada a casos de diarreias agudas secretoras (por exemplo em diarreias provocadas por *Salmonella*) (Radostitis et al, 2007). Segundo Bywater a desidratação pode ser medida em categorias ou graus de severidade, ou seja, classificou a desidratação de 1% a 5% como desidratação suave, uma desidratação de 6% a 8% uma desidratação moderada e finalmente uma desidratação de 9% a 11% como uma desidratação grave (Smith, 2009; Berchtold, 2009).

A acidose é outro sinal importante presente em casos de diarreia, e deve-se à perda excessiva de base (bicarbonato, considerado o tampão mais importante do organismo, mantendo o pH em níveis compatíveis com a vida, ou seja, entre 7,35 e 7,45), ou à acumulação de ácido endógeno ou exógeno, ou ainda à combinação de ambos os processos. Sendo assim a acidose metabólica define-se com a diminuição do pH do sangue arterial e uma redução na concentração de bicarbonato no plasma consequente a uma perda de bicarbonato ou a uma adição de iões de hidrogénio. Os animais com acidose apresentam-se deprimidos, com fraqueza muscular e relutantes à sucção, e em casos mais graves podem mesmo estar em decúbito lateral ou em estado comatoso. Os animais normalmente apresentam taquicardia, que se torna mais evidente à medida que a acidose se torna mais grave, e a pressão sanguínea diminui. Se existir uma hipercalémia concomitante, os animais podem apresentar bradicardia, bloqueio cardíaco, colapso e por fim morte (Radostitis et al, 2007; Naylor, 1987).

3.2. Fluidoterapia

A fluidoterapia é o tratamento primordial em casos de diarreias nos vitelos recém-nascidos, independentemente da sua etiologia. O objectivo desta terapia de fluidos é prevenir ou minimizar a desidratação e a perda de electrólitos através da avaliação das anormalidades presentes neste quadro, os deficits presentes e os desequilíbrios tanto electrolíticos como acido-base. Um dos factores mais importantes associados a uma baixa mortalidade em vitelos diarreicos é o uso adequado de fluidoterapia, tanto oral como intravenosa, sendo aconselhado começar a terapia de fluidos o mais cedo possível para minimizar a gravidade da doença, mesmo em animais que ainda não apresentem desidratação severa, mas que estejam visivelmente afectados com a síndrome. De salientar que os fluidos utilizados nesta terapia podem ser

classificados de acordo com a sua natureza física (cristalóides ou colóides) e de acordo com a sua osmolaridade (Hipertónicos, Hipótonicos e isotónicos). (Radostitis et al, 2007; Smith, 2009; Berchtold, 2009).

Na fluidoterapia intravenosa o objectivo é corrigir em primeiro lugar a diminuição do volume de sangue e o desequilíbrio acido-base, restaurando assim o volume sanguíneo e a função renal. Sendo assim, a via intravenosa é a via preferencial para a correcção de graves desequilíbrios acido-base e electrolíticos assim como para a hidratação principalmente em vitelos com desidratação severa, ou seja, menos de 8% (Radostitis et al, 2007; Berchtold, 2009).

Outra opção será a fluidoterapia oral, considerada pela OMS (organização mundial de saúde) como um dos avanços mais significativos do século XX, sendo aconselhada em casos menos graves de diarreia e em vitelos que apresentem um tracto gastrointestinal funcional e reflexo de sucção, tem algumas vantagens em relação à intravenosa como menor risco de hiperhidratação e de toxicidade electrolítica. O objectivo desta terapia oral é semelhante à intravenosa, ou seja, combater os deficits hidro-eléctrolítico e acido-base, assim como fornecer suporte nutricional (Smith, 2009).

Os principais requisitos de uma solução electrolítica são: suporte de sódio suficiente, proporcionar vários agentes com funções importantes no organismo, entre eles a glucose, citrato, acetato, propionato ou glicina, fornecer um agente alcalinizante para combater a acidose metabólica (por exemplo o bicarbonato) e ser capaz de fornecer energia suficiente para combater o estado de balanço negativo que normalmente os vitelos diarreicos apresentam (Smith, 2009; Berchtold, 2009).



Figura 10: Fluidoterapia intravenosa em vitelo diarreico



Figura 11: Fluidoterapia intravenosa em vitelo diarreico no campo.

3.3. Outros tratamentos utilizados nas diarreias neonatais

O uso de antibióticos é comum no tratamento de diarreias neonatais considerando o caso das diarreias por ETEC que respondem de forma muito eficaz, encurtando o período de duração da doença e causando uma melhoria efectiva na qualidade fecal, contribuindo assim para uma diminuição da mortalidade. Em diarreias causadas por agentes que não sejam bacterianos, como acontece nas virais e nas parasitárias, antibióticos podem ser usados como forma de prevenção de infecções secundárias e não como forma de tratamento direccionado ao principal agente que está a provocar a diarreia. AINES também podem ser uma escolha, ajudando na redução da gravidade de diarreia secretora causada por exemplo por E.coli, o Flunixin-meglumina pode ser uma boa opção. Por outro lado, mucopolissacarídeos têm sido defendidos como agentes que podem melhorar a absorção de electrólitos (Smith, 1996).

4. Prevenção das diarreias neonatais

A prevenção das diarreias neonatais passa por um conjunto de factores, relacionados não só com o próprio vitelo, como também com o meio ambiente envolvente. Em primeiro lugar, e um dos factores mais importantes na prevenção e sobrevivência dos neonatos é a transferência de imunidade passiva através da correcta toma de colostro, nas primeiras 6 horas de vida do vitelo, como já foi abordado anteriormente (Feitosa et al, 2001; Andrews et al, 2008).

O manejo é outro factor importante a ter em conta na prevenção das diarreias neonatais, diminuindo a exposição do vitelo a agentes infecciosos ou diminuir os factores de risco como por exemplo a elevada densidade animal, o stress, mistura de vitelos diarreicos com vitelos saudáveis, condições ambientais adversas (frio, chuva, correntes de ar). Em animais estabulados o ideal será mantê-los isolados, em viteiros individuais até pelo menos 1 mês de vida. A correcta higiene dos viteiros assim como um bom controlo sanitário é fulcral e se possível manter sempre os locais limpos e o mais seco possível (Bicknell & Noon, 1993; Wattiaux). Em animais em extensivo, o ideal será rodar os pastos principalmente na altura dos partos, com o objectivo de diminuir a contaminação fecal nas áreas de parição, assim como a densidade populacional nesses pastos também deve ser o mais baixa possível, evitando-se assim a ocorrência de novas infecções (Coetzer & Tustin, 2004; Andrews et al, 2008).

Relativamente à nutrição, além da toma de colostro obrigatória para a prevenção de diarreias, deve-se evitar a sobrealimentação assim como mudanças bruscas na alimentação, pois pode agravar o quadro clínico da diarreia. Quando se utiliza leite de substituição, este deve ser de alta qualidade nutricional e com boa quantidade de gordura, pois a gordura é altamente digerível (Wattiaux).

Em casos de diarreias por *Cryptosporidium* a prevenção passa por rotação de pastos, locais limpos e secos com o objectivo de diminuir a ingestão de oocistos que existam no meio ambiente, apesar dos oocistos serem muito resistentes à maioria dos desinfectantes, pensa-se que podem ser destruídos pela solução de amónia a 5% assim como a solução de formalina a 10% também parece ser eficaz na sua eliminação (Coetzer & Tustin, 2004).

Outro ponto importante na prevenção das diarreias neonatais é a vacinação das vacas em gestação e aplica-se às diarreias neonatais causadas pela E.coli e às virais (rotavírus e coronavírus), vacinação aconselhada das mães antes do parto para que assim a imunização possa passar via colostro aos vitelos (Kahn, 2007). Existem no mercado vacinas inactivadas combinadas para estes três agentes, aconselhada a administração de um a três meses antes da data prevista de parição (Andrews et al, 2008).

III. ESTUDO DOS AGENTES PREVALENTES E MEDIDAS PREVENTIVAS DAS DIARREIAS NEONATAIS EM VITELOS NA REGIÃO A SUL DO TEJO

1. Objectivos:

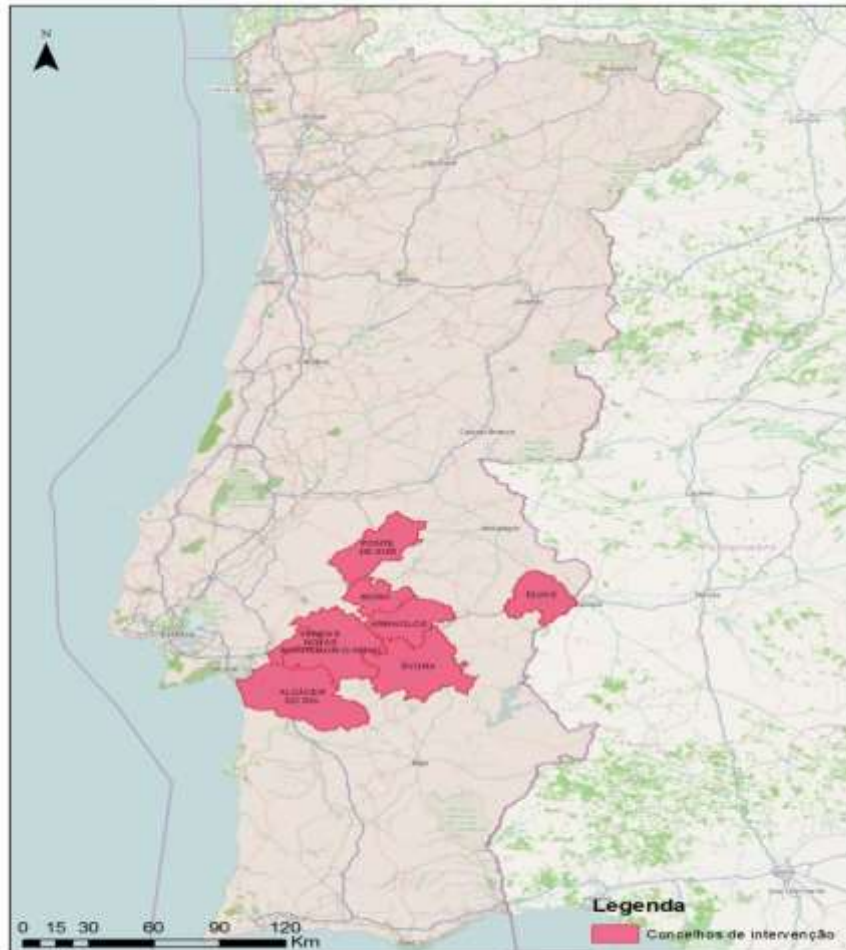
- Calcular e apresentar a prevalência dos casos de diarreias neonatais na região a sul do Tejo
- Determinar as etiologias mais comuns que provocam essas diarreias na mesma região.
- Apresentar e analisar as medidas preventivas aplicadas por parte dos produtores nas suas explorações.
- Determinar e analisar os factores que possam interferir com a mortalidade por diarreias neonatais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização da amostra

Para a discussão dos resultados deste estudo é necessário ter em conta todas as suas limitações inerentes ao estudo realizado. Foram analisadas 37 explorações de vários distritos, entre eles Évora, Portalegre e Setúbal, ou seja, maioritariamente da região do Alto Alentejo. Todas as colheitas de amostras foram obtidas entre Janeiro de 2011 e Março de 2014 e cedidas pelo laboratório Coprapec em Montemor-o-Novo. Adicionalmente procedeu-se à identificação de 60 produtores destes concelhos e maioritariamente das mesmas explorações de onde se obtiveram as amostras, e outros circundantes para aplicação de um questionário referente às diarreias neonatais com o

objectivo de obtermos uma percepção válida na forma de como é feita a prevenção, ou a ausência da mesma por parte destes.



Mapa 1: Localização geográfica da amostra

2.1.2. Método de diagnóstico das amostras

As amostras foram cedidas pela COPRAPEC (laboratório de diagnóstico de Montemor-o-Novo, onde foram submetidas técnicas de flutuação fecal com posterior coloração Ziehl-Neelsen para confirmação de *Cryptosporidium* e outras coccídeas e com técnicas de ELISA-ag para confirmação das diarreias por Rotavírus, Coronavírus e *E. coli*.

2.2. Análise Estatística

Para efeitos de análise estatística utilizou-se o *software* SPSS versão 20 (c) IBM Corp. (c) SPSS (r) STATISTICS para análise descritiva, nomeadamente no cálculo de medidas de tendência central e de dispersão, de variáveis numéricas e tabelas de contingência e frequências, para as variáveis categóricas. Adicionalmente para a estatística inferencial utilizou-se o teste Exacto de Fisher para avaliar a relação das variáveis dicotómicas, assim como o teste de Qui-quadrado para avaliar a relação das variáveis categóricas. Adicionalmente recorreu-se ao *software* ArcGIS (c) ESRI (r) para o desenvolvimento das representações geográficas das explorações.

3. Resultados e Discussão

3.1. Número de colheitas

Para execução deste estudo foram colhidas amostras durante quatro anos seguindo a distribuição ilustrada no gráfico que se segue.

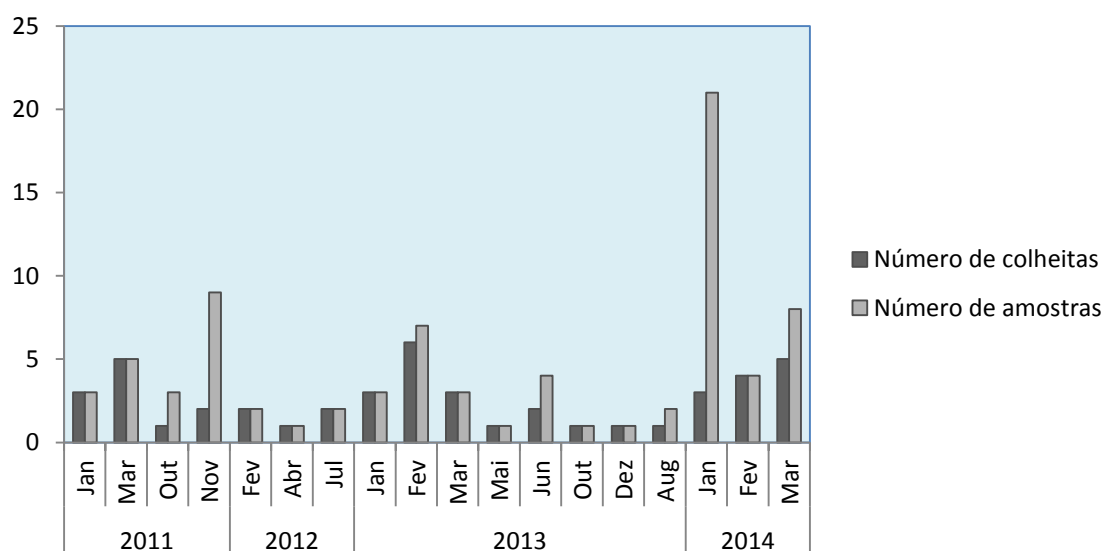


Gráfico 1: Frequência de colheitas relacionadas com o número de amostras inerentes às colheitas

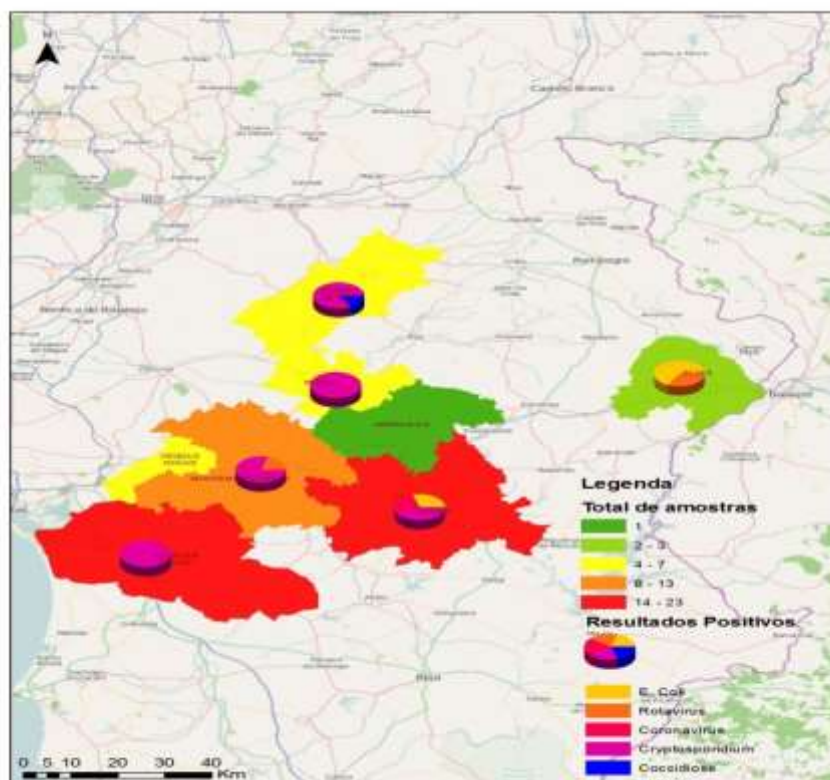
O gráfico 1 ilustra as frequências de colheitas (n=46) e o número de amostras inerentes às colheitas (n=80) efectuadas em 37 explorações e sugere que a maioria das colheitas enviadas para análise ocorre predominantemente durante o Inverno. A tabela 2 que se segue expõe o número de amostras (n) associado a cada colheita estratificando por ano e de acordo com a estação

Tabela 2: Colheitas efectuadas por ano, relacionadas com a estação do ano (n=número de amostras)

Ano	Estação	n	colheitas
2011	Outono	12	3
	Inverno	7	7
	Primavera	1	1
	Sub-total	20	11
2012	Inverno	2	2
	Primavera	1	1
	Verão	2	2
	Sub-total	5	5
2013	Outono	1	1
	Inverno	14	13
	Primavera	5	3
	Verão	2	1
	Sub-total	22	18
2014	Inverno	33	12
	Sub-total	33	12
Total Geral		80	46

3.2.Distribuição geográfica

As 37 explorações utilizadas neste estudo encontram-se distribuídas entre 8 concelhos: Alcácer do Sal (n=2), Arraiolos (São Gregório) (n=1), Elvas (n=2), Évora (n=14), Montemor-o-Novo (Montemor, Escoural e Lavre) (n=11), Mora (n=2), Ponte de Sor (n=3) e Vendas Novas (n=2). O gráfico (Mapa) que se segue ilustra o número de amostras total por cada concelho assim como a proporção dos resultados positivos dos diferentes agentes causadores de diarreia neonatal.



Mapa 2: Distribuição geográfica dos casos de diarreias neonatais, por concelho, e agentes prevalentes nos mesmos.

3.3. Avaliação das amostras

A proporção de resultados positivos, face à pesquisa de um agente, é maior nas infecções por *Cryptosporidium* (61,5%), seguindo-se as diarreias por *E. coli* (16,2%), coronavírus (8,1%), coccidioses (6,7%) e por último rotavírus com uma percentagem de apenas 5,4% do total de amostras avaliadas para esse agente.

Tabela 3: Relação dos resultados positivos com a localização geográfica das explorações.

Explorações no Concelho	E. coli		Rotavírus		Coronavirus		Cryptosporidium		Outras Coccidioses	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
ALCÁÇER DO SAL	2	0	2	0	2	0	1	100	2	0
ARRAIÓLOS	1	0	1	0	1	0				
ELVAS	3	66,7	3	33,3	3	0				
ÉVORA	14	28,6	14	0	14	21,4	10	60	4	0
MONTEMOR-O-NOVO	9	0	9	11,1	9	0	6	66,7		
MORA	1	0	1	0	1	0	2	50	3	0
PONTE DE SOR	6	0	6	0	6	0	6	83,3	4	25
VENDAS NOVAS	1	0	1	0	1	0	1	0	2	0
Total Geral	37	16,2	37	5,4	37	8,1	26	61,5	15	6,7

n - representa o número de amostras enviados para pesquisa de agente; %-representa a proporção de resultados positivos face ao número de amostras

A tabela 3 descreve a relação entre a proporção dos positivos e a localização das explorações, ao nível do concelho, em estudo. Em Alcácer do Sal apenas uma

exploração registou o único resultado positivo obtido – um caso de *Cryptosporidium*. As explorações localizadas em Elvas procederam submeteram amostras apenas para *E. coli*, rota e corona vírus, tendo sido verificado resultados positivos para *E. coli* e rotavírus. As explorações em Évora foram, a par com Alcácer do Sal, as que registaram maior número de pesquisas. Verificou-se neste concelho que 60% das amostras submetidas para pesquisa de *Cryptosporidium* foram positivas. Registaram-se, ainda, nas explorações, desta localização, elevados valores positivos de *E. coli* (28,6%) e Coronavírus (21,4%). As explorações com localização em Mora ou Montemor-o-Novo registaram essencialmente presenças positivas de *Cryptosporidium*. As explorações em Ponte de Sor registaram resultados positivos a coccidioses que não por *Cryptosporidium*. As explorações localizadas em Vendas Novas e Arraiolos não registaram qualquer resultado positivo.

3.4. Relação da Estação do ano e diarreias nos vitelos

As colheitas efectuadas, para efeito de identificação do agente responsável pela diarreia, ocorrem essencialmente no período de Outono e Inverno, conforme previamente demonstrado na tabela 2. Contudo, como existem outras colheitas efectuadas ao longo do ano, propôs-se avaliar esta relação. Para proceder com a avaliação reclassificamos os meses de colheita em meses com maior ou menor precipitação.

Tabela 4: Relação entre os meses com maior ou menor precipitação e os agentes que causam as diarreias.

	E. coli			Rotavirus			Coronavírus			Cryptosporidium			Outras coccidioses		
	Negativo n	Positivo n	valor de p	Negativo n	Positivo n	valor de p	Negativo n	Positivo n	valor de p	Negativo n	Positivo n	valor de p	Negativo n	Positivo n	valor de p
Meses com menos precipitação	8	1	0,704	9	0	0,410	8	1	0,074	3	2	0,340	2	0	0,685
Meses com mais precipitação	26	2		26	2		28	0		7	14		12	1	

Embora a maior parte dos agentes tenha apresentado resultados positivos com maior frequência nos meses com mais precipitação, o teste Exacto de Fisher e o teste de Qui-quadrado sugerem que não existe relação estatisticamente significativa entre os meses de maior precipitação e *E.coli* ($p=0,704$), Rotavírus ($p=0,410$), Coronavírus ($p=0,074$), *Cryptosporidium* ($p=0,340$) e outras coccidioses ($p=0,685$).

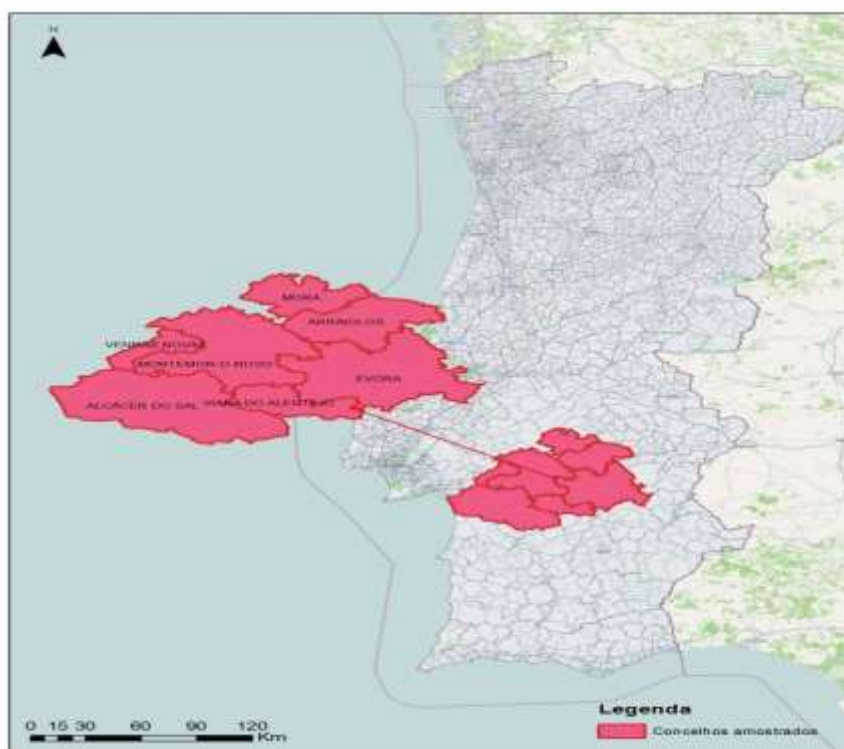
3.5. Percepção dos produtores

Para a avaliação desta percepção por parte dos produtores, procederam-se a 60 inquéritos explorações distribuídas entre 7 concelhos. A figura abaixo ilustra o total, dos

efectivos dos inquiridos, agrupado ao nível do concelho e o número médio de vacas destas explorações.

Tabela 5: Localização dos inquéritos efectuados aos produtores, número de vacas por cada efectivo (n = número de amostras)

Concelho	n	Nº vacas dos efectivos	Nº médio de vacas por efectivo
ALCÁ CER DO SAL	3	650	217
ARRAIOLOS	10	1940	194
ÉVORA	7	1120	160
MONTEMOR-O-NOVO	29	3905	135
MORA	7	800	114
VENDAS NOVAS	2	550	275
VIANA	2	1600	800
Total Geral	60	10565	176



Mapa 3: Localização da amostra (inquéritos efectuados aos produtores)

As explorações dos inquiridos são compostas por 68,3% (n=41) de vacas cruzadas e 31,7% (n=19) de raças puras. A principal raça, incluindo cruzamentos, das explorações inquiridas é a Mertolenga (n=22), seguindo-se de Limousine (n=20), Charolesa (n=10), Blonde D'aquitaine (n=3), as raças Holstein Frisia, Alentejana (n=2) e apenas uma exploração da raça Saler.

3.5.1. Avaliação da percepção no número de vitelos mortos por diarreia/ano e a raça, a área e o local de parto, a toma correcta de colostro e época de chuvas:

Tabela 6: Relação entre as mortes de vitelos por ano e a raça.

		Mortes vitelos com diarreia/ano			Total
		<5	entre 5 e 10	> 10	
Raça	Pura	15	1	3	19
	Cruzado	33	6	2	41
Total		48	7	5	60

Tabela 7: Relação entre o local de parto com as mortes de vitelos por ano

		Mortes vitelos com diarreia/ano		Total
		<5	5 ou mais mortes por ano	
Local de partos	Estábulos	1	1	2
	Pasto	46	11	57
Total		47	12	59

Tabela 8: Relação da área de parto com as mortes de vitelos por ano

Mortes vitelos com diarreia/ano						
<5			5 ou mais mortes por ano			
	Média	s	área mínima	Média	s	área mínima
área de parto	135	429	5	175	248	30

Tabela 9: Relação com a toma de colostro e as mortes de vitelos por diarreia/ano

		Mortes vitelos com diarreia/ano		
		<5	5 ou mais mortes por ano	Total
Controlo colostro	Não	45	11	56
	Sim	1	1	2
Total		46	12	59

Tabela 10: Relação entre os cuidados a ter nas épocas de chuva com as mortes de vitelos por ano com diarreia.

		Mortes vitelos com diarreia/ano		
		<5	5 ou mais mortes por ano	Total
Cuidados chuva	Não	46	10	56
	Sim	2	2	4
Total		48	12	60

3.5.2. Avaliação da percepção no número de vitelos mortos por diarreia/ano e o tamanho do efectivo

A tabela abaixo sugere que o número de explorações com mortalidade inferior a 5 (n=48) apresenta um tamanho de efectivo médio ($\bar{x}=141$; $s=139$) inferior às explorações com registos mais elevados de mortalidade (n=12) – estas com um número médio de efectivo de 315 vacas ($s=279$).

Tabela 11: Relação do tamanho do efectivo com a mortalidade

Mortes vitelos com diarreia/ano					
<5			5 ou mais mortes por ano		
Média	s	Min/Max	Média	s	Min/Max
141	139	10 / 700	315	279	100 / 900

O teste de Mann-Whitney corrobora a observação da estatística descritiva, sugerindo assim que existem diferenças estatisticamente significativas no tamanho do efectivo entre explorações com baixos e elevados casos de mortalidade por diarreia neonatal (valor de $p=0,01$).

3.5.3. Avaliação da percepção no número de vitelos mortos por diarreia/ano e a profilaxia na exploração

Tabela 12: Relação entre a profilaxia instituída e as mortes de vitelos por ano.

		Mortes vitelos com diarreia/ano		
		<5	5 ou mais mortes por ano	Total
Profilaxia	Não	43	6	49
	Sim	5	6	11
Total		48	12	60

Em relação à profilaxia, 11 explorações fazem vacinação, contudo apesar dessa acção uma grande proporção (6 em 11) apresenta 5 ou mais mortes por ano.

O teste Exacto de Fisher sugere que existe uma relação estatisticamente significativa entre a profilaxia e o número de mortes por diarreia neonatal (valor de $p=0,005$). A relação contudo é inversa à esperada, isto é, registou-se um elevado número de explorações que não faz profilaxia e apresenta mortalidades inferiores a 5.

4. Conclusões

Com este estudo concluiu-se que as diarreias neonatais continuam a afectar muitas das explorações de Bovinos, principalmente de carne. Concluiu-se também que na área geográfica onde se incidiu o estudo os agentes responsáveis pelas diarreias neonatais mais comuns são as provocadas pelo *Cryptosporidium* spp., seguindo-se as provocadas por *E.coli*, e menos comuns as virais e diarreias provocadas por outras coccidioses.

Relativamente à relação entre os meses com maior e menor precipitação e a ocorrência de casos de diarreias neonatais, concluiu-se que apesar de não haver significância estatística que o valor de p da avaliação de *Cryptosporidium* spp. é próximo do nível de significância e que apenas mais um caso positivo seria o suficiente, numa simulação estatística, para comprovar a associação entre os meses de maior precipitação e a ocorrência deste agente, pois segundo *Bicknell & Noon; Wattiaux et Smith* as condições adversas associadas ao Inverno como a elevada precipitação e humidade e baixas temperaturas predispõem ao aparecimento das diarreias neonatais.

No que diz respeito à influência da raça na ocorrência de mortes por diarreias neonatais, Embora não se verifiquem diferenças estatisticamente significativas, nas explorações com mortalidades classificadas acima de 10, temos para as raças puras uma proporção de 15,79% (3/19) contra 4,87% (2/41).

Relativamente à área disponível de parto, concluiu-se que áreas maiores de parto apresentam maiores mortes por diarreias neonatais, pode justificar isto o facto de haver menos controlo na detecção dos animais afectados em áreas maiores uma vez que esta conclusão mostrou-se contrária à bibliografia que segundo *Coetzer & Tustin e Andrews et al* áreas menores seriam mais afectadas devido à maior carga microbiana nela existente principalmente na altura dos partos.

Quando se procedeu à análise relativa aos cuidados com a chuva, ou seja, a existência de abrigos em épocas chuvosas que pudessem abrigar os animais, concluiu-se que cerca de 93% (56/60) dos inquiridos não toma cuidados com a chuva, embora na nossa amostra se tenha verificado que o agente de diarreia neonatal mais prevalente na região em estudo, *Criptosporidium* spp, ocorra sete vezes mais (14positivos nos meses de maior precipitação/2 positivos nos meses sem precipitação) nas alturas de chuva o

que está de acordo com *Smith* que diz que um maior cuidado nas épocas chuvosas no que diz respeito ao abrigo dos animais seria importante como medida de prevenção ao aparecimento das diarreias neonatais.

Na questão da profilaxia efectuada por parte dos produtores e apesar de existir uma relação estatisticamente significativa entre a profilaxia (vacinação) e o número de mortes por diarreia neonatal, essa relação contudo é inversa à esperada, isto é, registou-se um elevado número de explorações que não faz profilaxia e apresenta mortalidades inferiores a 5 e as explorações que fazem profilaxia com um número de mortes mais elevado, sugere-se que se deva ao facto da existência de falhas por parte dos produtores, ou seja, nas vacinações por exemplo, segundo *Radostitis et al*, as vacas devem ser vacinadas de 6 a 3 semanas pré-parto com vacina contra o Rotavírus e Coronavírus, sendo o tempo ideal até no máximo 4 semanas pré-parto pois presume-se que o anticorpo local é o mais importante do que o anticorpo humoral, e sabendo que a ingestão de colostro contendo níveis elevados de anticorpos contra o coronavírus é vantajoso e quando possível tal colostro deve ser dado ao vitelo nos primeiros 3 dias de vida, adquirindo assim a imunidade passiva e apresentando desta forma uma prevenção das diarreias, tal processo não foi cumprido no estudo efectuado, pois mostra falta de conhecimento e alguma negligência por parte dos produtores. Outra hipótese para além do protocolo das vacinas não estar a ser o correcto pode ser que se tenha começado a vacinar porque há elevada mortalidade. O que se tem que avaliar, num estudo futuro, em explorações com protocolos instalados há mais de dois anos e nestes conferir se as mortalidades são efectivamente superiores. Se forem superiores, a explicação possível será a falha então no protocolo vacinal.

Outra conclusão estatisticamente significativa foi a relação entre o tamanho do efectivo e a mortalidade, o que sugere então que efectivos maiores possuam maior número de mortes assim como efectivos menores apresentam menores número de mortes, o que me leva a concluir e a sugerir que para futuro os produtores possam fazer divisões de áreas de pasto de forma a minimizar o número de mortes, pois assim têm um melhor controlo dos animais e também menos stress e menor densidade animal.

5. Bibliografia

Andrews, A.M., Blowey, R.W., Boyd, H., Eddy, R.G. (2008) *Medicina Bovina, doenças e criação de bovinos* (2ª ed., pp. 161-187) São Paulo: Roça.

Baracat, R., Neto, R., Daniele, C., Bessi, R., Packer, I. (1997). Fornecimento Prolongado de Colostro e Protecção passiva em bezerros recém-nascidos. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília*, v.32, n.11, 1215-1220.

Barbosa, E., Figueiredo, H., Garcia, A., Lobato, Z., Lage, A. (1998). Rotavírus do Grupo A em bezerros lactentes no estado de Minas Gerais. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.28, n.3, 435-439.

Beer, J. (1999) *Doenças Infeciosas em animais domésticos* (pp. 74-77, 219-221) Roca.

Berchtold, J. (2009). Treatment of calf diarrhea: Intravenous Fluid Therapy. *Vet clin Anim* 25, 73-99

Bresciani, K., Aquino, M., Zucatto, A., Inácio, S., Neto, L., Coelho, N., ... Meireles, M. (2013). Criptosporidiose em animais domésticos: Aspectos epidemiológicos. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.34, n.5, 2387-2402.

Bicknell, E. J., Noon, T. H. (1993). Neonatal Calf Diarrhea. *Animal Care and Health Main Maintenance*, 19-24.

Boto, A. (2008). *Estudo Epidemiológico e molecular da infecção por rotavírus numa população pediátrica*. Tese de Mestrado em Microbiologia Clínica. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina de Lisboa.

Campillo, M.C., Vasquez, F.A.R., Fernandez, A.R.M., Acedo, C.S., Rodriguez, S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romero, H.Q., Varela, M.C. (1999) *Parasitologia Veterinária* (3ª ed., pp. 213-220) Madrid: McGraw-Hill – Interamericana

Cho, K., Hasoksuz, M., Nielsen, R., Chang, K., Lathrop, S., Saif, L. (2001) Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Archives of virology* 146 (12), 2401-2419.

Chinsangaram, J., Akita, G., Castro, A., Osburn, B. (1993) PCR detection of group A bovine rotaviruses in feces. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 516-521.

Coetzer, J.A.W. & Tustin, R.C. (2004) *Infectious Diseases of Livestock* (2th, pp. 332-359, 795-803, 1560-1577). Cape Town, South Africa. Oxford.

Cunningham, J.G. (2004) *Tratado de Fisiologia Veterinária* (3ª ed., pp. 263-287) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Dyce., Sack., Wensing. (2002) *Tratado de Anatomia veterinária* (3ª ed., pp. 127-133) São Paulo: Elsevier.

Ederli, B., Carvalho, C., Sales, L. (2004) Ocorrência da Infecção por *Cryptosporidium* em bezerros na microrregião de campos dos Goytacazes no Norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *J. Vet. Parasitol*, 13, 2, 45-48.

Estes, M., Cohen, J. (1989) Rotavirus Gene Structure and Function. *Microbiology Reviews*, vol.53, n.4, 410-449.

Feitosa, F., Shimamura, G., Roberto, T., Mendes, L., Peiró, J., Féres, F., ... Meireles, M. (2008) Importância de *Cryptosporidium spp.* Como causa de diarreia em bezerros. *Pesq. Vet. Bras.* 28 (10), 452-456.

Feitosa, F., Birgel, E., Ciarlini, P., Mendes, L., Perri, S. (2001) Transferência de imunidade passiva colostrar e a morbidade e mortalidade de bezerros neonatos. *Rev. Educ. contin. CRMV-SP, fascículo 2*, 9-12.

Feitosa, F. (1999) Importância da transferência da imunidade passiva para a sobrevivência de bezerros neonatos. *Continuous education jornal CRMV-SP*, 017-022.

Fortes, E. (2004) *Parasitologia Veterinária* (4ª ed., pp. 47-61, 116-118) Cone Editora.

Foster, D. M. and G. W. Smith (2009). "Pathophysiology of diarrhea in calves." *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 25(1): 13-36, xi.

Francis, D. (2002) Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *Journal of Swine Health and production*, volume 10, number 4, 171-175.

Freitas, P., Uyemura, S., Sila, D., Samara, S., Buzinaro, M. (2011) Rotavírus Bovino: Factores de risco, prevalência e caracterização antigénica de amostras em rebanhos leiteiros no estado de São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.4, 820-827.

Gamez, H., Rigobelo, E., Fernandes, S., Marin, J., Ávila, F. (2006) Diarreia Bovina: Estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados de bezerros da região de Ribeirão Preto – SP, Brasil. *ARS Veterinária, Jaboticabal, SP*, Vol.22, n1, 022-030.

Gomes, M. J. S. S (2008) *Coccidioses em vitelos na região de Montemor-o-velho*. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária.

Holland, R. E. (1990) Some infections causes of diarrheas in young farm animals. *Clinical Microbiology reviews*, 345-375.

Jerez, J., Brandão, P., Buzinaro, M., Gregori, F., Rosales, C., Ito, F., Sakai, T. (2002) Detecção de Rotavírus e Coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarreia criados em vários municípios do estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.69, n.2, 19-23.

Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2004) *Histologia Básica* (10ª ed., pp. 229-316) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kahn, C.M. (2007) Enfermedades Intestinales en Ruminants. In: *El Manual Merck de Veterinária* (5ª ed., pp. 223-228) Barcelona: Merial.

Knipe, D.M & Howley, P.M. (2007) *Fields Virology* (5th ed., pp. 1305-1327, 1917-1957) Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.

KÖNIG, H.E., Liebich, H. (2004) *Anatomia dos Animais Domésticos* (pp. 58-68) Porto Alegre: Artmed.

Lima, J. D. (2004). Coccidiose dos ruminantes domesticos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13.

Liu, L., Häggglund, S., Hakhverdyan, M., Alenius, S., Larsen, L., Belák, S. (2006) Molecular Epidemiology of Bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. *Journal of clinical microbiology*, 957-960.

Lorenzetti, E., Lene, R., Ribiro, J., Souza, V., Alfieri, A., Alfieri, A. (2013) Diarreia Neonatal por coronavírus bovino (BCoV) em rebanhos bovinos de corte. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.34, n.6, suplemento 2. 3795-3800.

Martins, D. (2011) *Investigação Nosológica de Diarreias neonatais Indiferenciadas em vitelos no concelho de Odemira*. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária.

Martins-Vieira, M., Brito, L., Heller, L. (2009) Oocistos de *Cryptosporidium Parvum* em fezes de bezerro infectado experimentalmente. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.6, 1454-1458.

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M., ... Ranst, M. (2008) Recommendations for the classification of group A rotaviruses A all 11 genomic RNA segments. *Arq. Virol.* 153 (8), 1-14. MCGUIRK, S.M., 2008, "Disease management of dairy calves and heifers" in The Veterinary clinics of North America, Food animal practice

Montassier, D., Oliveira, R., Fuentes, D., Samara, S., Jerez, J., Buzinaro, M. (2008) Avaliação da imunidade passiva em bezerros nascidos de vacas imunizadas com vacina contra rotavírus. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.60, n.5, 1089-1096.

Nagy, B., Fekete, P. (1999) Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30, 259-284.

Naylor, J. (1987) Severity and Nature of Acidosis in Diarrheic Calves Over and Under One Week of Age. *Can Vet J* Volume 28, No. 4, 168-172.

Quigley, J. (2001). Revisión sobre la Coccidiosis en becerros (Vol. 17, pp. 1-6).

Radostitis, O.M., Gay, C.C., Kenneth, W.H., Constable, P.D. (2007) *Veterinary Medicine, textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (10th ed., pp. 73-100, 847-855) Saunders Elsevier.

Reck, M. (2009) *Diarreia Neonatal Bovina*. Monografia (Graduação), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, faculdades de Veterenária.

Santos, J. (2011) *Avaliação e Prevenção de Diarreias neonatais em vitelos de Raça Maronesa*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Schoenthaler, S.L., Kapil, S. (1999) *Development and Applications of a Bovine Coronavirus Antigen Detection Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY pp.130-132.

Smith, B.P. (1996). Disorders and Management of the neonate. In: B.P. Smith, *Large Animal Internal Medicine* (2th ed., pp. 395-414) St. Louis: Mosby.

Smith, D. (2012) Field Disease Diagnostic Investigation of Neonatal Calf Diarrhea. *Vet. Clin. Food. Anim.* 28, 466-478.

Smith, G. (2009) Treatment of calf diarrhea: Oral fluidtherapy. *Vet Clin Food Anim* 25 , 55–72

Spagnolo, J., Hogue, B. (2000) Host protein interactions with the 3' End of bovine coronavirus defective genome replication. *Journal of Virology*, 5053-5065.

Teixeira, W., Coelho, W., Soutello, R., Oliveira, F., Homem, C., Nunes, C., Meireles, M. (2011). Diagnóstico de Criptosporidiose em amostras fecais de bezerros por imunofluorescência direta e microscopia de contraste de fase. *Ciência rural, Santa Maria*, v.41, n.6, 1057-1062.

Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. (1996) *Parasitologia Veterinária* (2^a ed., pp. 203-204) Glasgow, Scotland: Guanabara Koogan

Ussman, A. (2011). *Medição de proteínas séricas e imunoglobulinas como indicador da transferência de imunidade passiva em vitelos*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária.

Wattiaux, M.A. Diarreia Neonatal. *Babcock Institute*, p.121-123.

Wolff, M., Sattar, S., Adegbunrin, O., Tetro, J. (2005). Environmental survival and microbicide inactivation of coronaviruses. *Coronaviruses with special emphasis on first insights concerning SARS*, 201-212.

Questionário aos Produtores

- 1) Qual o número de vacas do efectivo: _____.
- 2) Quantos vitelos nascem por ano:
 - 2.1) < 10
 - 2.2) Entre 10 e 30
 - 2.3) > 30
- 3) Quantos vitelos morrem com diarreias neonatais:
 - 3.1) <5
 - 3.2) Entre 5 e 10
 - 3.3) > 10
- 4) Qual a raça do seu efectivo? _____.
- 5) Qual a área disponível de pasto? _____.
- 6) As mães são vacinas para as diarreias neonatais? _____.
 - 5.1) Se sim qual a vacinação implementada: _____.
- 7) Relativamente aos partos onde ocorrem? Pasto ou estábulos?
_____.
- 8) Tem controlo na toma de colostro por parte do vitelo nas primeiras horas de vida do mesmo? _____.
- 9) Tem algum cuidado nas épocas de chuva relativamente aos partos? _____.
 - 9.1) Se sim, qual? (por exemplo se muda os animais para abrigos da chuva) _____.
- 10) Já fez alguma prevenção de diarreias neonatais? _____.
 - 10.1) Se sim, qual? _____.

