






ARTIGO ORIGINAL

# Avaliação de diferentes métodos para estimar qualidade do colostro e transferência de imunidade passiva (TIP) em bezerras Holandesas

*Assessment of different methods to estimate colostrum quality and passive immunity transfer (PIT) in neonatal Holstein heifers*

Sylvia Marquart Fontes Novo de Oliveira <sup>1</sup>, Bruno Toledo Silva <sup>2</sup>, Stephanie Blima Paulino Leite <sup>1</sup>, Clara Satsuki Mori <sup>1</sup>, Viviani Gomes <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup> Ghent University (UGent), Gent, Bélgica

## Resumo

O objetivo deste estudo foi a comparação das metodologias mais comuns empregadas em diferentes fazendas para a avaliação da qualidade do colostro e identificação de falha na transferência de imunidade passiva (FTIP) em bezerras Holandesas. Sessenta e oito bezerras Holandesas recém-nascidas foram distribuídas em dois grupos: G1 - provenientes de propriedade com manejo de colostro adequado; G2 - oriundas de propriedade com falhas no manejo do colostro. Foram colhidas amostras de colostro fornecido para cada bezerra de cada grupo (250 ml) para a avaliação de IgG, sólidos totais, PT e albumina. Amostras sanguíneas foram obtidas às 48 horas de vida para a determinação de PT e de globulina e para a estimativa indireta de IgG por meio dos testes de turvação pelo sulfato de zinco, precipitação pelo sulfito

de sódio e coagulação do glutaraldeído. Os teores de IgG observados no colostro pelo colostrômetro (G1: 98,63 ± 15,58 mg/ml; G2: 85,66 ± 29,81 mg/ml; p = 0,09), índice Brix (G1: 27,61 ± 2,96%; G2: 22,40 ± 4,58%; p = 0,00), PT (G1: 10,42 ± 2,29g/dL; G2: 9,04 ± 2,29g/dL; p = 0,06) e albumina (G1: 1,25 ± 0,37g/dL; G2: 0,91 ± 0,38g/dL; p = 0,00) foram superiores no G1 quando comparados ao G2. A determinação de PT no soro das bezerras foi realizada por um analisador bioquímico automático, revelando taxas de FTIP (< 5,2 g/dL) somente no G2 (46,67%). Os resultados dos testes qualitativos (turvação pelo sulfato de zinco, precipitação pelo sulfito de sódio e coagulação do glutaraldeído) foram diferentes dos resultados de PT (p = 0,00) e não se mostraram eficientes para a detecção da FTIP. Esta pesquisa demonstrou que além do uso do

\* Autor correspondente: viviani.gomes@usp.br

Recebido: 1 set 2019 | Aprovado: 13 nov 2019

colostrômetro para a avaliação da qualidade do colostro, a utilização do refratrômetro Brix e níveis de PT do colostro devem ser consideradas. A identificação de FTIP no rebanho pode ser realizada seguramente por meio dos níveis séricos de PT e globulina.

**Palavras-chave:** Colostrômetro. Brix. Teste de turvação pelo sulfato de zinco. Teste de precipitação pelo sulfato de sódio. Teste de coagulação do glutaraldeído.

## Abstract

*The aim of this study was to compare in different farms the most common methodologies for assessing colostrum quality and to identify failure in passive immunity transfer (FPIT) in Holstein heifers. Sixty-eight newborn Holstein heifers were distributed into two groups: G1, the excellent colostrum management practices group; G2, the poor colostrum management practices group. Samples were obtained from the colostrum fed to each heifer of each group (250 mL) to measure immunoglobulin (Ig)G, total solids, total whey protein, and albumin levels. Blood samples were obtained at 48 h of life to determine total protein levels and to indirectly estimate IgG concentrations by zinc sulfate turbidity, sodium sulfite precipitation, and glutaraldehyde coagulation tests. Colostrum IgG levels, as measured by a colostrometer (G1: 98.63 ± 15.58 mg/ml; G2: 85.66 ± 29.81 mg/ml; p = 0.09), as well as the Brix (G1: 27.61 ± 2.96%; G2: 22.40 ± 4.58%; p = 0.00), total whey protein (G1: 10.42 ± 2.29 g/dL; G2: 9.04 ± 2.29 g/dL; p = 0.06), and albumin (G1: 1.25 ± 0.37 g/dL; G2: 0.91 ± 0.38 g/dL; p = 0.00) levels were higher for G1 than for G2. The total serum protein level from the heifers as determined by an automated biochemical analyzer, showed a FPIT rate (< 5.2 g/dL) only for G2 (46.67%). Results of the qualitative tests (zinc sulfate, sodium sulfite precipitation, and glutaraldehyde coagulation tests) were different from total serum protein levels (p = 0.00) and were not efficient to identify FTIP. The results of our study demonstrated that besides the use of colostrometer for assessing colostrum quality, the Brix refractometer and colostrum PT levels should be considered. FPIT can be safely identified in the herd by serum PT and globulin levels.*

**Keywords:** Colostrometer. Brix. Zinc sulfate turbidity test. Sodium sulfite precipitation test. Glutaraldehyde coagulation test.

## Introdução

O manejo de bezerras recém-nascidas é intensivo, desafiante e representa um investimento em saúde e produtividade. A adoção de algumas práticas nessa fase da criação pode favorecer o aumento das taxas de sobrevivência neonatal e a redução dos índices de morbidade e dos custos de produção (Godden, 2008; Santos e Bittar, 2015).

A falha na transferência de imunidade passiva (FTIP) tem sido atribuída principalmente à baixa qualidade do colostro e não ao processo de colostragem (Godden, 2008). De acordo com um levantamento realizado por Santos e Bittar (2015), somente 11% das propriedades nacionais realizavam a análise de qualidade do colostro, das quais 33% utilizavam o método visual e 67% o colostrômetro. Nas mesmas propriedades (n = 179), 60% do colostro identificado com qualidade inferior (Imunoglobulina G - IgG ≤ 50mg/ml) encontravam-se em fazendas de baixa produção (< 200L/dia) e 28% em fazendas de alta produção (> 701L/dia) (Santos et al., 2017).

Um programa de manejo adequado para a colostragem contempla o fornecimento de colostro de qualidade (IgG > 50mg/ml) em volume equivalente a 10 - 15% do peso vivo da bezerra, dividido em duas mamadas (Godden, 2008). O ideal é que o colostro seja oferecido o mais rápido possível após o nascimento, pois a permeabilidade do epitélio intestinal às macromoléculas decresce gradualmente a partir da sexta hora de vida até a interrupção completa da absorção das Igs, entre 18 e 24 horas (Michanek et al., 1989).

A transferência de imunidade passiva (TIP) deve ser monitorada entre 24 - 48h após a ingestão de colostro, sendo a mensuração da proteína total (PT) (≥ 5,2g/dL) o principal teste usado a campo para avaliar a FTIP, pois possui forte correlação com a dosagem da IgG (≥ 1000mg/dL) (Calloway et al., 2002). Os testes semiquantitativos e qualitativos de turvação pelo sulfato de zinco, precipitação pelo sulfato de sódio e coagulação do glutaraldeído também são indicados pela literatura clássica, apesar do seu pouco uso a campo (Allison, 2012). No Brasil, contudo, apenas 2% das propriedades leiteiras monitoram a FTIP (Santos e Bittar, 2015).

A identificação de práticas inadequadas de manejo e fornecimento do colostro em fazendas de pequena, média e alta produção no Brasil poderia nortear medidas adicionais a serem tomadas para redução de taxas de FTIP e, conseqüentemente, de morbidade e de mortalidade de bezerras. Assim, o objetivo desta pesquisa foi comparar métodos distintos empregados em diferentes fazendas para avaliação da qualidade do colostro e identificação de FTIP em bezerras Holandesas.

## Material e métodos

O delineamento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (n° 2934/2013) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) - Universidade de São Paulo (USP). O presente estudo foi realizado de agosto de 2014 a agosto de 2015, em cinco fazendas localizadas nas seguintes cidades do estado de São Paulo: Araras (fazenda 1), Tambaú (fazenda 2), Bragança Paulista (fazenda 3), Aguai (fazenda 4) e Itobi (fazenda 5).

### Seleção das fazendas

A fazenda 1 (G1, n = 53) foi considerada a propriedade com manejo de colostro mais adequado, considerando-se os dados levantados por meio de questionário aplicado aos colaboradores dos bezerreiros ao início desta pesquisa. Esta propriedade adotava o sistema de partos assistidos durante as 24 horas do dia; a ordenha das vacas era realizada imediatamente após a parição na maternidade, utilizando-se equipamento de ordenha exclusivo, sendo assim independente da rotina de ordenha dos animais lactantes. As bezerras recebiam volume equivalente a 4 - 6 L de colostro entre a 2ª e 6ª hora de vida; e o colostro excedente era congelado em freezer a -20 °C.

As fazendas 2 a 5 foram agrupadas em um único grupo denominado G2 (n = 15). Em geral, os partos não eram assistidos durante a noite e a madrugada; a ordenha das vacas recém-paridas dependia da rotina de ordenha dos animais lactantes. As bezerras recebiam volume entre 2 a 4 L de colostro; o momento da mamada não era controlado porque

a colostragem era realizada a partir da visualização das bezerras nascidas à noite/madrugada pelos colaboradores no período diurno, e o colostro excedente não era congelado.

### Qualidade imunológica do colostro

Para determinação da qualidade imunológica do colostro, 250 ml do colostro fornecido a cada bezerra foi submetido à análise por meio do colostrômetro, do refratômetro Brix e da mensuração da concentração de PT e de albumina.

#### *Colostrômetro*

Foram acondicionados 250 ml da amostra em uma proveta para posterior submersão do hidrômetro e, em seguida, realizou-se a leitura no colostrômetro (Colostrometer™, Biogenics®, 09359 Highway, Mapleton, Oregon, EUA). O colostro foi considerado de boa qualidade quando apresentou uma graduação de IgG superior a 50 mg/ml.

#### *Índice Brix*

Utilizou-se refratômetro óptico com escala entre 0 a 32% (Modelo 300001; SperScientific, Scottsdale, AZ). Foi adotado o ponto de corte equivalente a 21% para distinguir colostro com baixa ou boa qualidade (> 50mg/ml de IgG) (Quigley et al., 2013).

#### *Proteína total (PT) e albumina*

A mensuração da PT e albumina foi realizada por um analisador bioquímico automático (RX Daytona, Randox, Washington DC), utilizando-se kits comerciais (TP4001; AB3800, Randox Laboratories Ltd., Reino Unido) segundo a metodologia descrita pelo fabricante. O soro do colostro foi obtido previamente por meio da técnica de acidificação da caseína conforme os procedimentos descritos por Wu e Xu (2009).

### Transferência de imunidade passiva (TIP)

A TIP foi avaliada por meio das concentrações de PT (Calloway et al., 2002) e de globulinas (Todd et al., 2018), assim como pelos testes de turvação pelo

sulfato de zinco (TSZ), de precipitação pelo sulfito de sódio (PSS) e de coagulação do glutaraldeído (CG) (Allison, 2012). Para tanto, as amostras de sangue das bezerras foram colhidas às 48 horas de vida em tubos siliconizados sem anticoagulante, por meio de punção da veia jugular, utilizando-se sistema a vácuo. O soro sanguíneo foi obtido por meio da centrifugação das amostras por 20 minutos a 1200 x g, sendo posteriormente alíquotado em microtubos e armazenado a -20 °C.

#### *Concentrações de PT e de globulina*

Mensurações de PT e albumina foram realizadas em analisador bioquímico automático conforme técnica anteriormente descrita para o colostro. O teor de globulina foi obtido através da subtração entre a PT e a albumina (Todd et al., 2018). Os pontos de corte usados na interpretação dos dados para PT e globulina foram, respectivamente, 5,2 g/dL (Calloway et al., 2002) e 2,9 g/dL (Todd et al., 2018).

#### *Teste de turvação pelo sulfato de zinco (TSZ)*

Foram distribuídos 6 ml da solução de sulfato de zinco em tubos de ensaio, ao qual foi adicionado 0,1 ml de soro sanguíneo. Os tubos foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente (23 °C) por uma hora. Após este período, as misturas foram agitadas e, em seguida, os tubos posicionados na frente de um texto impresso. A reação foi considerada positiva e interpretada como caso de TIP de sucesso quando a turvação era suficiente para tornar o texto ilegível (Allison, 2012).

#### *Teste de precipitação pelo sulfito de sódio (PSS)*

Três soluções de sulfito de sódio foram preparadas, utilizando-se 14, 16 e 18 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> anidro/100 ml de água destilada. Uma alíquota de 0,1 ml de cada amostra foi adicionada a um volume de 1,9 ml de cada uma das três soluções de estoque. A mistura foi agitada e mantida em repouso durante uma hora. A interpretação do resultado negativo era ausência de precipitação (turvação, sem sinais visíveis de flocos), e do resultado positivo era presença de flocos de precipitação. O teor de Igs foi

estimado de acordo com as reações nas diferentes concentrações de sulfito de sódio: reação positiva apenas para a solução a 18% equivalia ao teor < 500 mg/dL; reação positiva para as soluções a 16 e 18%, teor 500 a 1500 mg/dL; reação positiva para as soluções 14, 16 e 18%, teor > 1500mg/dL. Os resultados obtidos no intervalo < 500 mg/dL devem ser considerados e interpretados como casos de FTIP (Allison, 2012).

#### *Prova de coagulação do glutaraldeído (CG)*

Adicionou-se 0,5 ml de soro sanguíneo em 50µL de glutaraldeído 10% em tubos de ensaio. Esta mistura foi homogeneizada e incubada em temperatura ambiente, e suas leituras foram feitas a cada 1 hora. As reações foram consideradas positivas [coagulação completa (> 600 mg/dL de gama globulina)], intermediária [coagulação incompleta (400 - 600 mg/dL de gama globulina)] e negativa [coagulação ausente (< 400 mg/dL de gama globulina)]. Os resultados obtidos < 600mg/dL devem ser considerados e interpretados como casos de FTIP (Allison, 2012).

#### **Análise estatística**

Utilizou-se o programa estatístico SPSS 19.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.). As análises foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  e tendência de significância estatística para valores de  $p$  entre 0,05 e 0,10. Parâmetros quantitativos do colostro (colostrômetro, índice Brix, PT e albumina) e do soro sanguíneo dos bezerros (PT e globulinas) foram submetidos ao teste de normalidade e as comparações entre os grupos foram realizadas pelo Teste t. Posteriormente, as variáveis foram agrupadas e submetidas à análise de Correlação de Pearson. Os coeficientes de correlação ( $r$ ) foram considerados fracos quando  $r = 0,1$  até  $0,3$ ; moderados quando  $r = 0,4$  até  $0,6$ ; e fortes quando  $r = 0,7$  até  $1,0$  (Dancey e Reidy, 2006). Os dados qualitativos (TSZ, PSS e CG) foram submetidos a cálculos de frequências e teste de Qui-quadrado para comparação entre os grupos e testes. As frequências também foram comparadas aos valores de PT sérica  $\geq 5,2$  g/dL.

## Resultados

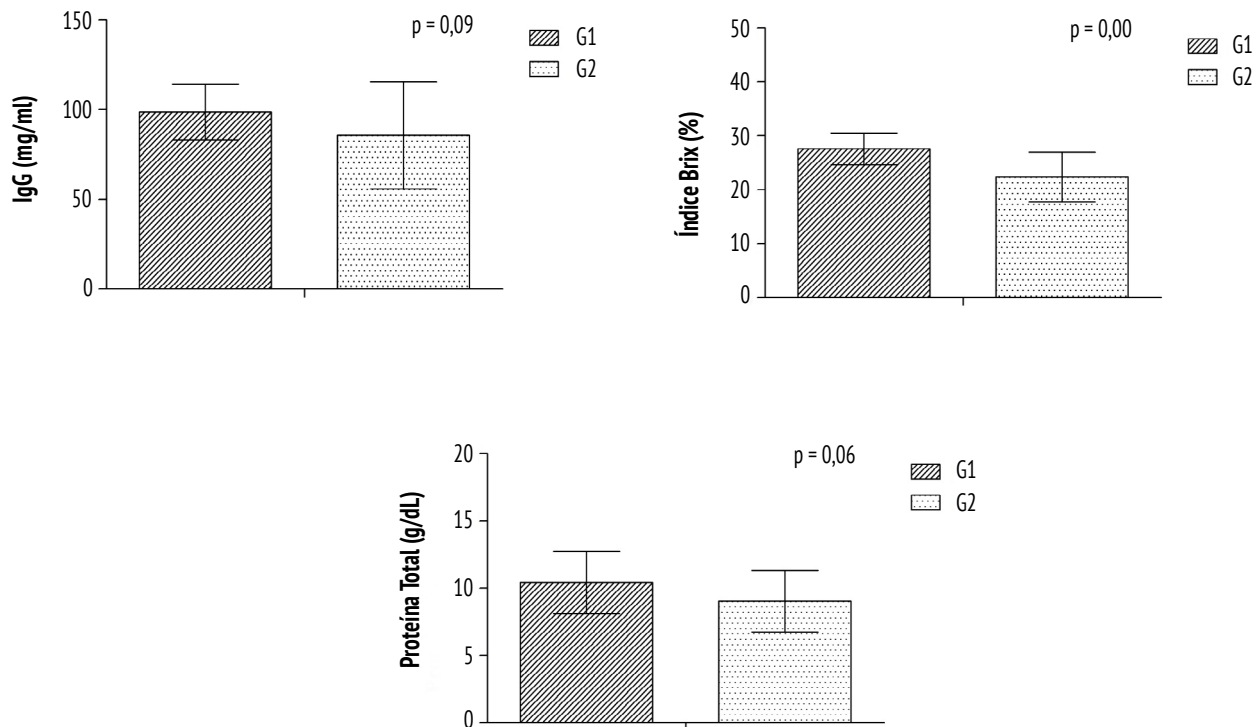
### Qualidade do colostro

Os valores médios e desvio padrão dos teores de IgG estimados pelo colostrômetro, índice Brix, PT do colostro e albumina estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 1.

Os teores de IgG encontrados por meio do colostrômetro entre as propriedades 1 a 5 variaram de 70 a 140 mg/ml de colostro. A concentração média de IgG encontrada no grupo 1 ( $98,63 \pm 15,58$  mg/ml) apresentou tendência para maior valor em relação àqueles obtidos no G2 ( $85,66 \pm 29,81$  mg/ml) ( $p = 0,09$ ). Todas as amostras do grupo 1 (53/53, 100%) apresentaram teores de IgG  $> 50$  mg/ml, enquanto 13,33% (2/15) das amostras do grupo 2 oriundas de fazendas com falhas no manejo de colostragem foram reprovadas.

O índice Brix do colostro apresentou variação de 15 a 32% entre as propriedades estudadas. Os valores médios encontrados para o G1 ( $27,61 \pm 2,96\%$ ) foram diferentes dos do G2 ( $22,40 \pm 4,58\%$ ) ( $p = 0,00$ ). Todas as amostras do G1 (53/53, 100%) apresentaram valores ( $> 21\%$ ) acima do recomendado por Quigley et al. (2013), enquanto 40% (6/15) daquelas obtidas no G2 foram reprovadas.

A PT mensurada do soro do colostro apresentou variação entre as propriedades estudadas de 4,43 a 16,01 g/dL, observando-se tendência ( $p = 0,06$ ) para maiores valores na propriedade G1 ( $10,42 \pm 2,29$  g/dL) em relação ao G2 ( $9,04 \pm 2,29$  g/dL). Para a albumina, a amplitude de variação nas cinco propriedades foi de 0,0 a 2,4g /dL, obtendo-se maiores valores também no G1 ( $1,25 \pm 0,37$  g/dL) em relação ao G2 ( $0,91 \pm 0,38$  g/dL) ( $p = 0,00$ ).



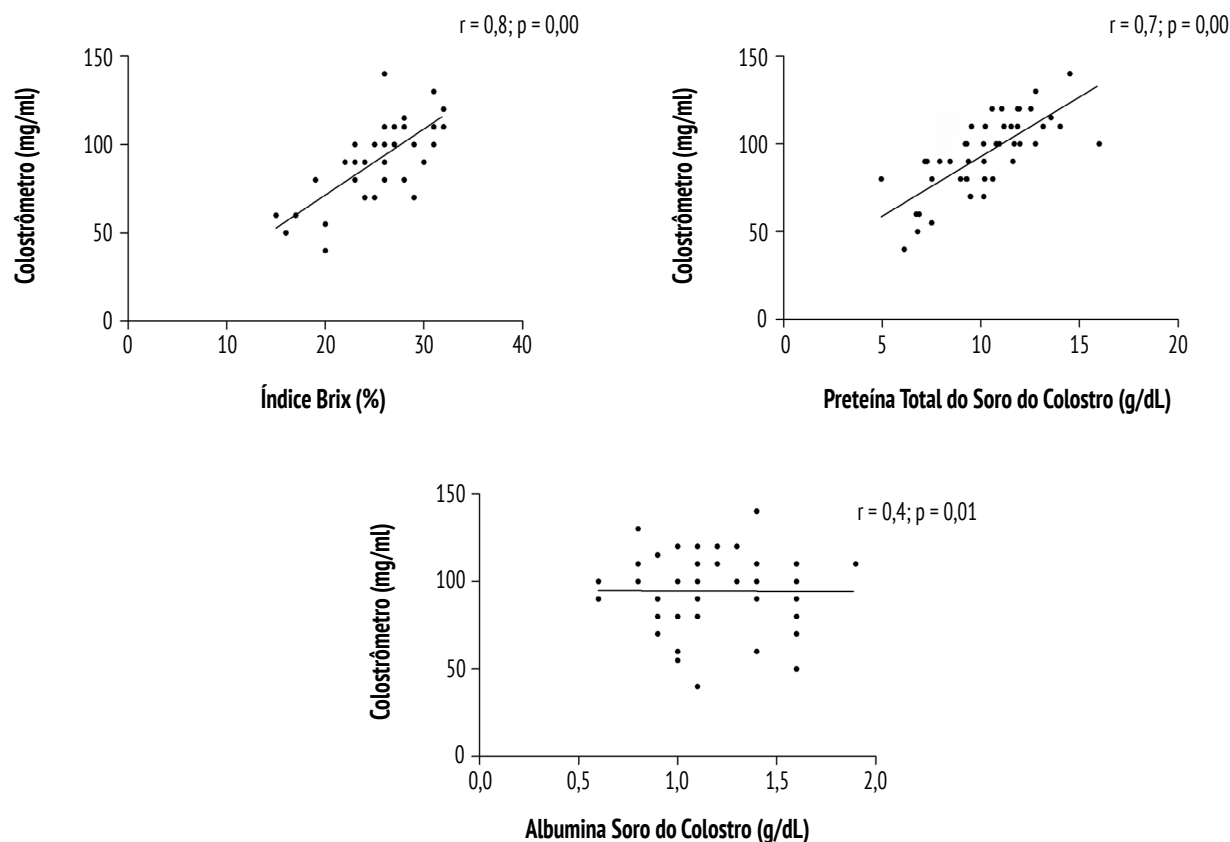
**Figura 1** - Médias e desvio padrão dos teores de IgG, Índice Brix e proteína total do colostro na fazenda modelo (G1) em relação às demais (G2).

**Tabela 1** - Médias e desvio padrão, valores mínimos e máximos e valor de p referente ao teste t para os teores de IgG, índice Brix, proteína total e albumina do colostro da fazenda modelo (G1) em relação às demais (G2)

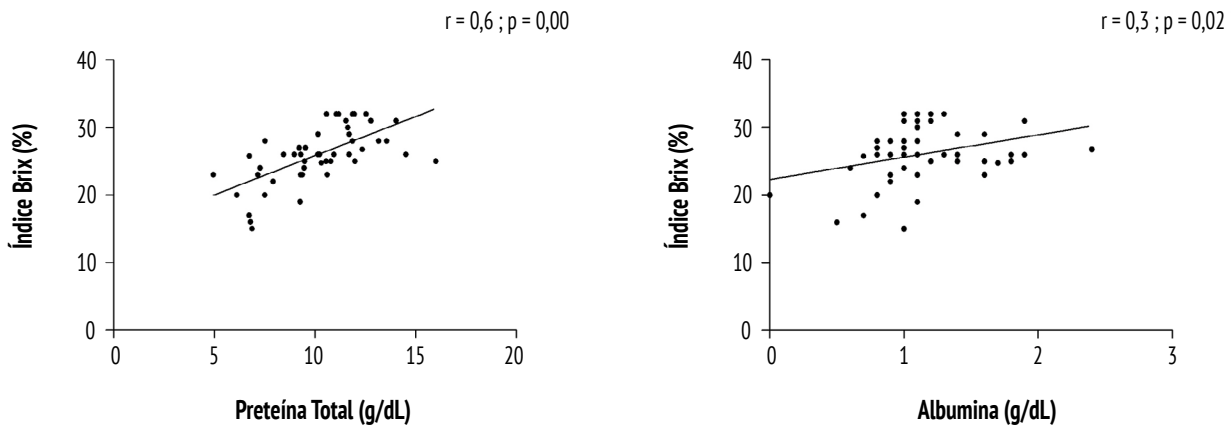
	Variável	Grupos	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	p
Colostro	Colostrômetro IgG (mg/ml)	G1	98,63	15,58	70,00	120,00	0,09
		G2	85,66	29,81	40,00	140,00	
	Índice Brix (%)	G1	27,61	2,96	23,00	32,00	0,00
		G2	22,40	4,58	15,00	31,00	
	Proteína Total (g/dL)	G1	10,42	2,29	4,43	16,01	0,06
		G2	9,04	2,29	6,11	14,51	
	Albumina (g/dL)	G1	1,25	0,37	0,60	2,40	0,00
		G2	0,91	0,38	0,00	1,80	

Os coeficientes de correlação de Pearson entre os teores de IgG estimados pelo colostrômetro e índice Brix ( $r = 0,8$  e  $p = 0,00$  - Figura 2) e entre os teores de IgG e PT obtida no soro do colostro ( $r = 0,7$  e  $p = 0,00$  - Figura 2) foram considerados fortes. As

correlações entre índice Brix e PT ( $r = 0,6$  e  $p = 0,00$  - Figura 3) e entre IgG e albumina ( $r = 0,4$  e  $p = 0,01$  - Figura 2) demonstram-se moderadas, enquanto o coeficiente entre índice Brix e albumina ( $r = 0,3$  e  $p = 0,02$  - Figura 3) foi considerado fraco.



**Figura 2** - Correlação de Pearson entre a IgG estimada pelo colostrômetro e o Índice Brix, concentração de proteína e albumina do soro do colostro.



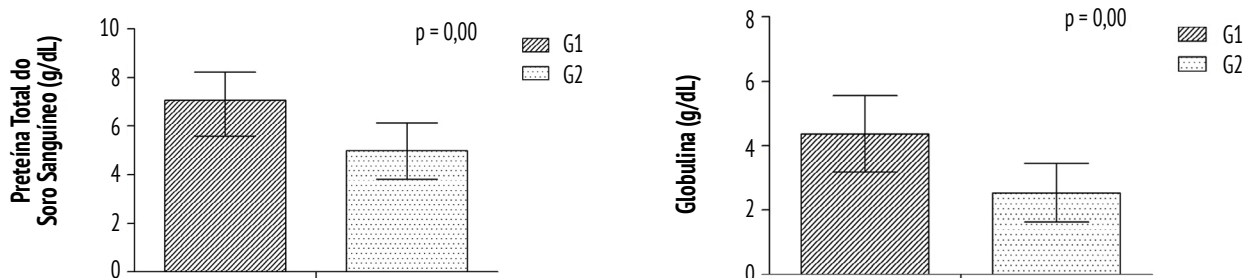
**Figura 3** - Correlação de Pearson entre Índice Brix e concentração de proteína e albumina do soro do colostro.

### Transferência de Imunidade Passiva

Os valores médios e desvio padrão da concentração de PT e globulinas do soro sanguíneo das bezerras estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 4. Na análise bioquímica do soro sanguíneo, observou-se variação da PT entre 2,42 a 9,69 g/dL. Os valores de PT determinados por dosagem bioquímica foram diferentes entre o G1 ( $7,07 \pm 1,15$  g/dL) e o G2 ( $4,99 \pm 1,16$  g/dL) ( $p = 0,00$ ) (Tabela 2 e Figura 4). Considerando-se o ponto de corte equivalente a  $\geq 5,2$ g/dL, todas as bezerras

do G1 (100%) apresentaram TIP adequada. Em contrapartida, quase metade das bezerras do G2 (7/15, 46,67%) apresentou FTIP.

A globulina presente nas amostras variou entre as propriedades de 1,12 g/dL a 7,29 g/dL, observando-se diferenças entre os valores obtidos para o G1 ( $4,37 \pm 1,18$  g/dL) e para o G2 ( $2,54 \pm 0,91$  g/dL) ( $p = 0,00$ ) (Tabela 2 e Figura 4). Uma bezerra pertencente ao G1 (1/53; 1,89%) e nove pertencentes ao G2 (9/15; 60%) apresentaram FTIP ao considerar-se o ponto de corte equivalente a 2,9 g/dL.



**Figura 4** - Média e desvio padrão dos teores da proteína total do soro sanguíneo e globulina na fazenda modelo (G1) em relação às demais (G2).

**Tabela 2** - Médias, desvio padrão, valores mínimos e máximos e valor de p referente ao teste t para os teores da proteína total do soro sanguíneo e globulina na fazenda modelo (G1) em relação às demais (G2)

	Variável	Grupos	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	p
Soro Sanguíneo	Proteína Total (g/dL)	G1	7,07	1,15	5,45	9,69	0,00
		G2	4,99	1,16	2,42	6,57	
	Globulina (g/dL)	G1	4,37	1,18	2,85	7,29	0,00
		G2	2,54	0,91	1,12	3,98	

Com relação aos testes qualitativos e semiquantitativos que avaliaram a TIP, pôde-se verificar que o TSZ apresentou 100% das reações positivas no G1 e G2, não sendo possível observar diferenças entre os grupos ( $p = 0,59$ ).

A estimativa dos teores de Igs no teste de PSS demonstrou que 11,32% das bezerras do G1 não apresentaram reação ao teste, e que 11,32, 30,19 e 47,17% apresentaram, respectivamente, concentrações de IgG > 1500 mg/dL, entre 500 a 1500 mg/dL, e < 500 mg/dL, de acordo com as reações observadas em diferentes concentrações da solução de sulfito de sódio. Apenas uma bezerra do G2 apresentou reação no teste, sendo sua concentração de IgG estimada em < 500 mg/dL (1/15, 6,67%). Com base nos resultados deste método de avaliação, houve diferença ( $p = 0,00$ ) entre as taxas de animais que obtiveram sucesso na TIP do G1 (22/53 - 41,51%) e do G2 (0/15 - 0%).

No teste CG, 51/53 (96,23%) amostras de soro proveniente das bezerras do G1 apresentaram coagulação completa (> 600 mg/dL de gama globulina) e 2/53 (3,77%) apresentaram coagulação incompleta (400 - 600 mg/dL de gama globulina). Observou-se 100% de amostras positivas no grupo G2 para CG. Não foi possível observar diferenças entre os grupos experimentais ( $p = 0,64$ ).

As frequências de bezerras que apresentaram boa TIP nos testes TSZ, PSS e CG foram comparadas entre si dentro do mesmo grupo experimental e com a frequência de animais com PT  $\geq 5,2$  g/dL, pelo teste Qui-quadrado. Assim, em ambos os grupos pôde-se verificar diferenças entre PSS e CG ( $p = 0,00$ ) e entre PSS e TSZ ( $p = 0,00$ ). Não houve comportamento diferente em G1 e G2 entre os testes CG e TSZ ( $p = 0,36$ ). Ademais, as frequências de bezerras que apresentaram boa TIP nos testes TSZ, PSS e CG se

apresentaram diferentes dos resultados positivos de PT, em ambos os grupos ( $p = 0,00$ ).

## Discussão

Esta pesquisa verificou a qualidade imunológica do colostro em amostras provenientes de cinco propriedades leiteiras e, posteriormente, avaliou a TIP em suas bezerras Holandesas.

Considerando-se a composição do colostro, o presente estudo se baseou na gravidade específica do mesmo pelo colostrômetro (IgG > 50 mg/ml; Fleenor e Stott, 1980), teores de sólidos totais pelo refratômetro Brix (> 21%; Quigley et al., 2013), PT e albumina. Estudos anteriores demonstraram que o teor médio de sólidos totais do colostro é de aproximadamente 23,9%, sendo cerca de 14% representados pela caseína (4,8%), albumina (0,9%) e Igs (6%) (Foley e Otterby, 1978). Dentre as Igs, estima-se que cerca de 90% sejam da classe G, 5% sejam IgA e 7% sejam IgM, sendo suas concentrações correspondentes a 10078, 413,8 e 625 mg/dL, respectivamente (Gomes, 2008).

De acordo com os achados, apenas uma (G1) das cinco fazendas investigadas (20%) utilizava o colostrômetro para a avaliação da qualidade do colostro. A utilização do mesmo corrobora ainda com o levantamento nacional realizado por Santos e Bittar (2015), no qual apenas 20% das fazendas de alta produção (> 700 L) avaliavam a qualidade do colostro, sendo o colostrômetro também o método mais utilizado por elas (71%).

As concentrações médias de IgG determinadas nos grupos G1 e G2 por meio do colostrômetro estão acima do valor médio de 82,3 mg/ml verificado em estudo recente realizado por Bartier et al.



(2015). Ademais, somente 13,33% das amostras de G2 demonstraram concentração < 50 mg/ml, semelhante à frequência de 14,1% observada no estudo mencionado. Provavelmente o grande número de fazendas utilizadas pelos autores representou maior variabilidade em condições ambientais, práticas nutricionais e manejo, que são conhecidos por afetar a densidade específica do colostro estimada pelo colostrômetro (Morin et al., 2001; Godden, 2008). Este fato também explicaria a tendência a maiores teores de IgG do G1 em relação ao G2, visto as diferenças de manejo apresentadas entre as fazendas de cada grupo.

Assim como o colostrômetro, o refratômetro Brix vem sendo altamente indicado a campo para estimar a qualidade do colostro (Quigley et al., 2013) e, portanto, a aplicação deste recurso nas amostras de colostro do presente estudo foi considerada. Os achados da presente pesquisa revelaram que o valor médio do índice Brix para o G1 (27,61%) foi discretamente superior aos descritos anteriormente em estudos de Quigley et al. (2013) e Bartier et al. (2015) para colostro de vacas Holandesas (23,8% e 24,3%, respectivamente). No entanto o valor médio encontrado em G2 (22,4%) foi levemente inferior quando comparado aos referidos estudos, demonstrando ainda cerca de 40% das amostras com concentração inadequada de sólidos totais (< 21%), enquanto Quigley et al. (2013) encontraram apenas 7,1%. A taxa demonstrada por Bartier et al. (2015) foi de 34,3%, provavelmente porque estabeleceram ponto de corte em 23% para melhor estimativa de IgG. Os valores obtidos pelo método Brix podem ter sido influenciados por fatores como a nutrição, que alteram também o teor de sólidos totais (Morin et al., 2001), e que possivelmente corroboraria com as diferenças encontradas entre grupos experimentais e estudos supramencionados.

Os valores médios relativos à PT do soro do colostro no G1 (10,42 g/dL) e G2 (9,04 g/dL) se mostraram próximos aos dados de PT descritos na literatura, que variam de 9,3 a 25,9 g/dL (Morin et al., 2001). Em contrapartida, as concentrações de albumina verificadas no colostro de G1 (1,25 g/dL) e G2 (0,91 g/dL) foram superiores aos valores encontrados em estudo de Samarütel et al. (2016) (0,12 g/dL), provavelmente devido às diferentes metodologias de análise deste estudo e

as empregadas na literatura. O estudo de Kehoe et al. (2007) alerta que os teores de PT do colostro sofrem pouca influência da alimentação e mais da paridade da matriz. A justificativa para as diferenças apresentadas entre G1 e G2 para ambos os componentes do colostro estaria vinculada ao tempo de colheita do colostro em relação ao parto (Contarini et al., 2014) e ao volume do colostro produzido (Godden, 2008).

Osteores de IgG determinados pelo colostrômetro demonstraram ainda melhor correlação com índices Brix e concentrações de PT do que com albumina. Uma correlação positiva entre teores de albumina e IgG2 presentes no colostro foi verificada anteriormente (Samarütel et al., 2016). Diferentes práticas nutricionais e de manejo adotadas para as vacas do presente estudo provavelmente afetaram os teores de gordura e outras fontes protéicas do colostro além de IgG, e explicariam os coeficientes de correlação encontrados (Morin et al., 2001). Outro achado interessante seria a moderada associação de Brix com PT do soro do colostro, pois esperava-se maior correlação entre sólidos totais e teor de PT do que com IgG (Quigley et al., 2013). Assim, a maior correlação de Brix com IgG do colostrômetro poderia ser explicada pela técnica de obtenção do soro utilizada neste estudo, que permitiu a exclusão da caseína e possivelmente favoreceu melhor correlação com níveis de Ig.

A PT do soro sanguíneo é comumente utilizada para a avaliação indireta da TIP, devido à alta correlação apresentada com a concentração de IgG no sangue (Calloway et al., 2002). Além disso, o uso de PT para estimativa da TIP apresenta vantagens em comparação com a medição IgG por imunodifusão radial (RID), visto que a técnica é limitada pelo elevado custo, demanda de mão de obra especializada (Godden, 2008) e disponibilidade de kits comerciais no Brasil. O ponto de corte comumente utilizado para PT é de 5,2 g/dL para bezerros saudáveis (equivalente a 1000 mg/dL de IgG sérica; Calloway et al., 2002) e leva em consideração os riscos de morbidade e mortalidade em bezerros (Windeyer et al., 2014).

A média dos níveis de PT encontrados para G1 (7,07 g/dL) foi superior a encontrada nos estudos de Feitosa et al. (2001) (6,55 g/dL), Windeyer et al. (2014) (6,0 g/dL), Hernandez et al. (2016) (5,8 g/dL),

Leite et al. (2017) (6,61 g/dL), Todd et al. (2018) (6,2 g/dL) e Elsohaby et al. (2019) (5,24 g/dL), enquanto que a média de PT do G2 (4,99 g/dL) foi inferior em relação aos estudos retromencionados. Ademais, os achados deste estudo não sugerem FTIP para o G1, porém 46,67% das amostras do G2 apresentaram concentrações de PT  $\leq$  5,2 g/dL, indicando a falha na TIP destas fazendas. Estes dados corroboram com os relatados na literatura, com taxas de FTIP que variam de 1,3 a 43,3% (Windeyer et al., 2014; Hernandez et al., 2016; Todd et al., 2018; Elsohaby et al., 2019). Fatores como idade dos bezerros, número de animais e fazendas selecionadas em cada estudo, no entanto, devem ser levados em consideração na comparação com os resultados do presente estudo (Godden, 2008).

A principal diferença na prevalência de FTIP demonstrada entre G1 e G2 está provavelmente nas práticas de manejo do colostro empregadas nestas fazendas (Godden, 2008). As fazendas do G2 já haviam demonstrado anteriormente a presença de colostro de baixa qualidade quando submetidas à avaliação pelo colostrômetro (13,33%) e Brix (40%) e, portanto, já se esperavam taxas de FTIP provavelmente maiores quando comparadas com a fazenda que fornecia colostro de alta qualidade (G1). Contudo, a colostragem das bezerras do G2 foi, em sua maioria, por meio de mamada natural até o dia seguinte ao nascimento, quando se fornecia colostro por mamada controlada. Estudos prévios demonstram não só a diminuição gradual da permeabilidade do intestino às macromoléculas entre 6 e 18 horas de vida (Michanek et al., 1989), como também aumento das taxas de FTIP em bezerras que recebem colostro de forma natural e não controlada (Besser et al., 1991).

A concentração de globulina sérica não é comumente utilizada para a avaliação da FTIP em bezerros (Todd et al., 2018). Baseada nos níveis de globulina do presente estudo, a FTIP estaria presente em 1,89% das amostras do G1 e em 60% do G2. A literatura sugere, no entanto, um aumento de 10% nas taxas de detecção de FTIP quando os teores de globulina são utilizados como parâmetro de avaliação da TIP em bezerros (Todd et al., 2018), provavelmente devido a variações nos teores de albumina.

Resultados imprecisos e variáveis foram identificados nos testes TSZ, CG e PSS. As amostras

submetidas ao teste TSZ não demonstraram a presença de FTIP em nenhum dos grupos, enquanto o teste CG, por sua vez, revelou FTIP somente em duas bezerras (3,77%) pertencentes ao G1. Em contrapartida, 58,49 e 100% das bezerras de G1 e G2, respectivamente, foram classificadas com FTIP no teste PSS. As reações verificadas nos testes TSZ e PSS representam a precipitação de proteínas de alto peso molecular, incluindo as Igs, enquanto a interpretação do coágulo no teste CG caracteriza a gelificação das gamaglobulinas (Weaver et al., 2000). A maneira subjetiva e semiquantitativa de estimar Igs reflete a baixa especificidade destes testes e, conseqüentemente, resultados inconsistentes (Tyler et al., 1996). Este fato justificaria as diferenças encontradas na comparação entre os testes, principalmente com PT por meio da análise bioquímica.

Embora muitos dos fatores associados à FTIP tenham sido identificados, as taxas de FTIP demonstradas por este estudo ainda são muito altas. As condições em que o estudo foi conduzido, porém, nos permitem afirmar que as taxas de FTIP, principalmente do G2, estariam associadas ao processo de colostragem das bezerras, visto que a qualidade do colostro fornecido foi garantida na maioria das amostras. A avaliação do índice Brix e PT do soro do colostro demonstraram-se práticas e confiáveis para monitoramento da qualidade do colostro pela alta correlação com níveis de IgG determinados pelo colostrômetro. Métodos simples e quantitativos, como teores de PT e globulina do soro sanguíneo, são indicados para a identificação de bezerras com FTIP e deverão ser inclusos na rotina de manejo das fazendas.

## Conclusão

Esta pesquisa concluiu que além do colostrômetro, o uso do refratômetro Brix e PT do soro do colostro são seguramente recomendados como ferramenta auxiliar na avaliação da qualidade do colostro devido à alta correlação demonstrada entre os testes. Para a garantia de adequada avaliação da TIP em bezerras, os teores de PT e globulina do soro sanguíneo demonstraram ser os parâmetros mais confiáveis.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo Auxílio à Pesquisa (Processo no 2013/06152-7) e bolsa de mestrado (Processo no 2013/02484-5), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa PIBIC (Processo no 2014/ 2412).

## Referências

- Allison RW. Avaliação Laboratorial das Proteínas do Plasma e do Soro Sanguíneo. In: Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW. Veterinary hematology and clinical chemistry. 2 ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2012. p. 407-8.
- Bartier AL, Windeyer MC, Doepel L. Evaluation of on-farm tools for colostrum quality measurement. J Dairy Sci. 2015;98(3):1878-84.
- Besser TE, Gay CC, Pritchett L. Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. J Am Vet Med Assoc. 1991;198(3):419-22.
- Calloway CD, Tyler JW, Tessman RK, Hostetler D, Holle J. Comparison of refractometers and test endpoints in the measurement of serum protein concentration to assess passive transfer status in calves. J Am Vet Med Assoc. 2002;221(11):1605-8.
- Contarini G, Povolo M, Pelizzola V, Monti L, Bruni A, Passolungo L, et al. Bovine colostrum: changes in lipid constituents in the first 5 days after parturition. J Dairy Sci. 2014;97(8):5065-72.
- Dancey C, Reidy J (EE.). Estatística sem matemática para psicologia: usando SPSS para Windows. Porto Alegre: Artmed; 2006. 608 p.
- Elsohaby I, McClure JT, Waite LA, Cameron M, Heider LC, Keefe GP. Using serum and plasma samples to assess failure of transfer of passive immunity in dairy calves. J Dairy Sci. 2019;102(1):567-77.
- Feitosa FLF, Birgel EH, Mirandola RMS, Perri SHV. Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva em bezerros através da determinação de proteína total e de suas frações eletroforéticas, imunoglobulinas G e M e da atividade da gama-glutamyltransferase no soro sanguíneo. Cienc Rural. 2001;31(2):251-5.
- Fleener WA, Stott GH. Hydrometer test for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. J Dairy Sci. 1980; 63(6):973-7.
- Foley JA, Otterby DE. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: a review. J Dairy Sci. 1978;61(8):1033-60.
- Godden S. Colostrum Management for Dairy Calves. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2008;24(1):19-39.
- Gomes V. Fatores imunológicos do colostro bovino: células, imunoglobulinas e atividade bactericida dos fagócitos para a *Escherichia coli* enterotoxigênica [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008. 106 p.
- Hernandez D, Nydam DV, Godden SM, Bristol LS, Kryzer A, Ranum J, et al. Brix refractometry in serum as a measure of failure of passive transfer compared to measured immunoglobulin G and total protein by refractometry in serum from dairy calves. Vet J. 2016;211:82-7.
- Kehoe SI, Jayarao BM, Heinrichs AJ. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. J Dairy Sci. 2007; 90(9):4108-16.
- Leite RF, Baccili CC, Costa e Silva CP, Novo SMF, Baldacim VAP, Benites NR, et al. Transferência de imunidade passiva em bezerras alimentadas com colostro de vacas com mastite subclínica. Arq Inst Biol. 2017;84:e0022015.
- Michanek P, Ventorp M, Weström B. Intestinal transmission of macromolecules in newborn dairy calves of different ages at first feeding. Res Vet Sci. 1989;46(3):375-9.
- Morin DE, Constable PD, Maunsell FP, McCoy GC. Factors associated with colostrum specific gravity in dairy cows. J Dairy Sci. 2001;84(4):937-43.

- Quigley JD, Lago A, Chapman C, Erickson P, Polo J. Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. *J Dairy Sci.* 2013;96(2):1148-55.
- Samarütel J, Baumrucker CR, Gross JJ, Dechow CD, Bruckmaier RM. Quarter variation and correlations of colostrum albumin, immunoglobulin G1 and G2 in dairy cows. *J Dairy Res.* 2016;83(2):209-18.
- Santos G, Silva JT, Santos FHR, Bittar CMM. Nutritional and microbiological quality of bovine colostrum samples in Brazil. *R Bras Zootec.* 2017;46(1):72-9.
- Santos G, Bittar CMM. A survey of dairy calf management practices in some producing regions in Brazil. *R Bras Zootec.* 2015;44(10):361-70.
- Todd CG, McGee M, Tiernan K, Crosson P, O'Riordan E, McClure J, et al. An observational study on passive immunity in Irish suckler beef and dairy calves: tests for failure of passive transfer of immunity and associations with health and performance. *Prev Vet Med.* 2018;159:182-95.
- Tyler JW, Hancock DD, Parish SM, Rea DE, Besser TE, Sanders SG, et al. Evaluation of three assays for failure of passive transfer in calves. *J Vet Intern Med.* 1996;10(5):304-7.
- Weaver DM, Tyler JW, VanMetre DC, Hostetler DE, Barrington GM. Passive transfer of colostrum immunoglobulins in calves. *J Vet Intern Med.* 2000;14(6):569-77.
- Windeyer MC, Leslie KE, Godden SM, Hodgins DC, Lissemore KD, LeBlanc SJ. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifers calves up to 3 months of age. *Prev Vet Med.* 2014;113(2):231-40.
- Wu M, Xu Y. Isolation and purification of lactoferrin and immunoglobulin G from bovine colostrum with serial cation-anion exchange chromatography. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2009;14(2):155-60.